

Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

PEDECIBA Biología

Subárea Neurociencias

**EFFECTOS NEUROQUÍMICOS Y COMPORTAMENTALES
INDUCIDOS POR PASTA BASE DE COCAÍNA
INHALADA EN RATAS**

LIC. MARTÍN GALVALISI

Orientadora: Dra. Cecilia Scorza

Co-orientador: Dr. Juan Andres Abin-Carriquiry

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

ÍNDICE

ABREVIATURAS	4
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	7
I. ANTECEDENTES GENERALES	7
1. PASTA BASE DE COCAÍNA	7
2. TIPOS DE MUESTRAS DE PBC	9
3. DEPENDENCIA A PBC	9
3.1. CONSUMO DE PBC Y PERFIL CLÍNICO CARACTERÍSTICO	10
3.2. VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE LA PBC	11
4. COCAÍNA: MECANISMO DE ACCIÓN	14
5. SUSTRATO NEUROBIOLÓGICO DE DROGAS DE ABUSO	16
5.1. RELEVANCIA DEL SISTEMA DOPAMINÉRGICO DEL ATV	19
II. ANTECEDENTES PARTICULARES	21
1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE MUESTRAS DE PBC INCAUTADAS EN EL URUGUAY	21
2. CAFEÍNA: MECANISMO DE ACCIÓN	22
3. ROL DE LA COCAÍNA Y CAFEÍNA EN EL EFECTO FARMACOLÓGICO DE PBC	25
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	28
HIPÓTESIS	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
MATERIALES Y MÉTODOS	30
1. DROGAS	30
2. ANIMALES	30
3. ANÁLISIS QUÍMICO DE MUESTRAS DE PBC	30
3.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS	31
3.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN DE ARREGLO DE DIODOS	31
3.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PBC	33
4. VOLATILIZACIÓN DE PBC Y CAFEÍNA	34
4.1. DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN	34
4.2. CÁMARA INHALATORIA.....	34
4.3. PROCEDIMIENTO DE VOLATILIZACIÓN E INHALACIÓN.....	35
5. ESTUDIOS COMPORTAMENTALES	36
5.1. EFECTO ESTIMULANTE	36
5.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE COCAÍNA Y CAFEÍNA	37
5.3. PROCEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE PLASMA E INYECCIÓN DE MUESTRAS EN GC-MS	39
6. ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS	40
6.1. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA	40
6.2. MICRODIÁLISIS INTRACEREBRAL	41
6.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE DIÁLISIS.....	42
6.4. LOCALIZACIÓN DE LAS CÁNULAS DE DIÁLISIS	42
7. ANÁLISIS DEL HUMO DE PBC Y CAFEÍNA	42
8. ANÁLISIS DE DATOS	43

RESULTADOS.....	44
1. ANÁLISIS QUÍMICO DE MUESTRAS DE PBC INCAUTADAS EN URUGUAY ENTRE LOS AÑOS 2007-2014 ..	44
2. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR PBC Y CAFEÍNA VOLATILIZADA	47
2.1. EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR LA VOLATILIZACION DE MUESTRAS DE PBC CON DIFERENTE CONTENIDO EN COCAINA Y CAFEINA	47
2.1.1. EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR PBC CON ALTO CONTENIDO EN COCAÍNA Y CAFEÍNA	48
2.1.2. EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR PBC CON ALTO CONTENIDO EN COCAÍNA Y SIN CAFEÍNA ...	49
2.1.3. EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR PBC CON BAJO CONTENIDO EN COCAÍNA Y ALTO CAFEÍNA .	50
2.1.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE COCAÍNA Y CAFEÍNA EN ANIMALES TRATADOS CON PBC VOLATILIZADA	51
2.2. EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR CAFEÍNA VOLATILIZADA.....	52
2.3. INFLUENCIA DE LA CAFEÍNA EN EL EFECTO ESTIMULANTE DE PBC VOLATILIZADA	54
3. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO NEUROQUÍMICO INDUCIDO POR PBC Y CAFEÍNA VOLATILIZADA	56
3.1. EFECTO NEUROQUÍMICO INDUCIDO POR PBC VOLATILIZADA E INFLUENCIA DE LA CAFEINA	56
3.2. EFECTO NEUROQUÍMICO INDUCIDO POR CAFEÍNA VOLATILIZADA	59
4. ANÁLISIS DEL HUMO DE PBC Y CAFEÍNA	60
DISCUSIÓN	64
ANÁLISIS QUÍMICO DE MUESTRAS DE PBC INCAUTADAS EN URUGUAY ENTRE LOS AÑOS 2007-2014	64
EFECTO ESTIMULANTE Y NEUROQUÍMICO DE PBC VOLATILIZADA	66
EFECTO ESTIMULANTE Y NEUROQUÍMICO DE CAFEÍNA VOLATILIZADA	70
CONCLUSIONES.....	74
PERSPECTIVAS	76
ANEXO	77
TRABAJO CIENTÍFICO	92
REFERENCIAS	93
FINANCIACIÓN.....	100

ABREVIATURAS

AB: Ácido benzoico

AEME: Anhidro ecgonina metil ester

ATV: Área Tegmental Ventral

CA: Campo Abierto

CICAD: Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas

CMCHTs: Carbometoxicicloheptatríneos

CPF: Corteza Prefrontal

DA: Dopamina

DAT: Transportador de Dopamina

DOPAC: Ácido 3,4-dihidroxi-fenilacético

GC-MS: Cromatografía de Gases acoplada a Espectrometría de Masas

Gpe: Globo pálido externo

Gpi: Globo pálido interno

HPLC-DAD: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección de Arreglo de Diodos

HPLC-DE: Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección Electroquímica

MAO: Monoamino oxidasa

NAcc: Núcleo Accumbens

NEMs: Neuronas Espinosas Medias

PBC: Pasta Base de Cocaína

SDS: Severidad de dependencia

SIM: *Selected ion monitoring*

SNpc: Sustancia Nigra pars compacta

SNpr: Sustancia Nigra pars reticulata

SNC: Sistema Nervioso Central

STN: Núcleo Subtalámico

TIC: *Total ion current*

RESUMEN

La Pasta Base de Cocaína (PBC) es una droga ilegal de abuso que se consume en Uruguay desde el año 2002. Está clasificada como una cocaína fumable debido a que contiene el alcaloide cocaína en su forma de base determinando así un punto de volatilización bajo y haciéndola sublimable. El consumo crónico de PBC genera una fuerte y rápida dependencia, lo que conlleva un fuerte impacto en la salud de los usuarios. Existen evidencias que indican que la velocidad con la que una droga alcanza el cerebro aumenta significativamente la vulnerabilidad a su dependencia. Este hecho resalta la importancia de la vía de administración en el consumo de PBC, dado que la inhalación pulmonar es una de las vías que facilita la llegada de la PBC al cerebro, lo que podría explicar la rápida instauración de la dependencia en sus consumidores. Sin embargo, en el transcurso de estos años hemos demostrado que la composición química es otro factor que debe ser considerado en los efectos farmacológicos de la PBC. En el mismo sentido, hemos instalado el concepto de que la presencia y cantidad de adulterantes (activos) en la PBC podrían potenciar su acción farmacológica, siendo cafeína uno de sus principales adulterantes. Sin embargo, hasta el momento de la realización de esta tesis el factor composición química no había sido testeado bajo la misma vía de administración que utilizan los usuarios.

En este contexto, esta Tesis propone en primer lugar, realizar un análisis químico de muestras de PBC incautadas desde 2007 a 2014. En segundo lugar abordar el estudio de la combinación de dos factores importantes - la vía de administración, inhalación pulmonar y el contenido químico - en el efecto estimulante y neuroquímico de diferentes muestras de PBC incautadas en el Uruguay. En tercer lugar, estudiar el papel de la cafeína en ambos efectos, así como su efecto *per se* por la vía inhalada.

Los resultados obtenidos del análisis químico de muestras de PBC demostraron la existencia de una gran variabilidad en la pureza y composición de las mismas, siendo cafeína, fenacetina y, en menor medida, aminopirina los adulterantes encontrados. A su vez, se detectó la presencia de trans y cis-cinnamoilcocaína en todas las muestras, lo que confirma que todas ellas correspondían a PBC.

Los resultados comportamentales y neuroquímicos demostraron la capacidad de la PBC volatilizada de generar un efecto estimulante y de incrementar significativamente los niveles de DA extracelular en el NAcc *shell*. A su vez, se evidenció la capacidad potenciadora de la cafeína en ambos efectos. Por su parte, cafeína volatilizada indujo *per se* un efecto estimulante dosis-dependiente y un incremento significativo en los niveles de DA extracelular en el NAcc *shell*.

El conjunto de resultados de este trabajo aportan información relevante que demuestra la incidencia de la vía de administración junto al de la composición química en el efecto farmacológico de PBC. A su vez, contribuyen al conocimiento sobre la dinámica del tráfico de PBC y al impacto de la PBC en la salud de sus consumidores.

INTRODUCCIÓN

I. ANTECEDENTES GENERALES

1. PASTA BASE DE COCAÍNA

La Pasta Base de Cocaína (PBC) es una droga ilegal de abuso que aparece circunscrita a principios de la década de los 70 al área Andina en países como Perú, Colombia y Bolivia y que se instala en el Uruguay a partir de año 2002. A pesar de ser una de las drogas menos consumidas en el Uruguay (1.1 % - prevalencia de vida), respecto a otras drogas de abuso, genera un gran impacto en la salud de los individuos que la consumen y en su entorno. Se concentra en áreas geográficas y socioeconómicas de bajos recursos, alcanzando un consumo del 4 % en algunas zonas de Montevideo (JND 2006; JND 2012). La PBC es una droga psicoestimulante que se obtiene como producto intermedio en el proceso de extracción y purificación del alcaloide cocaína a partir de las hojas de coca del arbusto *Erythroxylum coca*. En este proceso existen varias etapas de purificación y refinamiento, las cuales finalizan generalmente con la obtención de cocaína en su forma de clorhidrato (Figura 1).

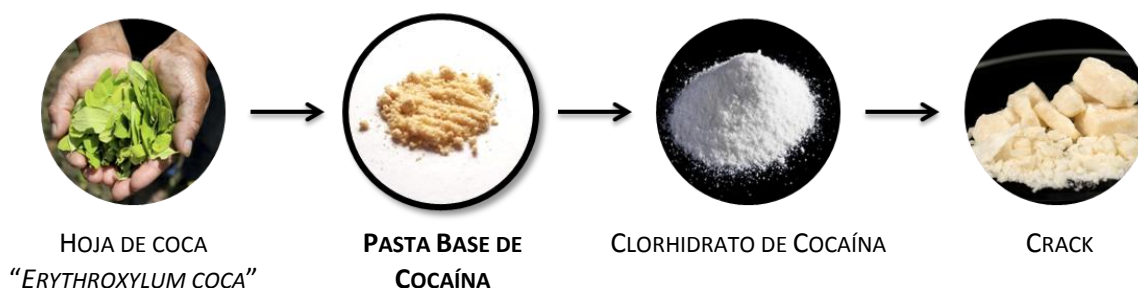


Figura 1. Esquema de las diferentes formas de consumo de cocaína. Se muestra que PBC constituye un producto previo en el proceso de elaboración y purificación del alcaloide cocaína en su forma de clorhidrato, a diferencia del crack (otra cocaína fumable) que es un producto posterior a este.

La producción de PBC se realiza generalmente mediante la maceración de las hojas de coca en una solución con ácido sulfúrico, amoníaco u otros productos alcalinos y solventes orgánicos como kerosene y gasoil. Finalizado este proceso, la PBC tiene la apariencia de un polvo de consistencia pastosa y color blanco, amarillento o amarronado (Figura 2), conteniendo porcentajes variables de cocaína en su forma de

base e impurezas que surgen del procesamiento químico como por ejemplo, impurezas provenientes de los solventes y otros metabolitos de la planta (ElSohly y cols. 1991; Castaño 2000; JND 2007).

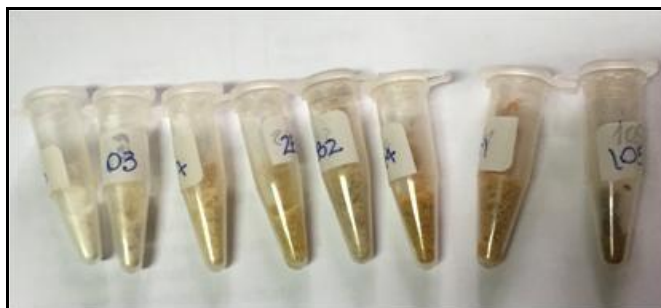


Figura 2. Muestra representativa de la variedad de colores que presentan las diferentes muestras de PBC. Estas muestras corresponden a incautaciones realizadas en Uruguay entre 2014 y 2015.

A su vez, como todas las drogas ilícitas, la PBC se vende con el agregado de sustancias adulterantes. Los adulterantes son sustancias agregadas con el fin de aumentar el volumen de la droga principal, imitar o potenciar su acción. Existen adulterantes inactivos y activos. Los adulterantes inactivos o diluyentes son aquellas sustancias utilizadas exclusivamente con el fin de aumentar el volumen de la droga y así aumentar el rédito económico del que las vende. En general no poseen un gran impacto sobre la salud del consumidor, siempre que estén agregados a bajas dosis. Los más utilizados son la lactosa, manitol, talco y polvo de ladrillo (Gostic y cols. 2009; Evrard y cols. 2010). Estas sustancias son baratas, fácilmente accesibles y generalmente legales. Por otra parte, los adulterantes denominados activos poseen la capacidad de imitar o potenciar los efectos de la droga y/o facilitar su administración (Brunt y cols. 2009; Cole y cols. 2011; Broséus y cols. 2016). Los estudios realizados demuestran que los adulterantes activos son generalmente aquellas sustancias con una fácil disponibilidad, siendo la cafeína, fenacetina, levamisol y lidocaína alguno de los más comúnmente encontrados en las drogas ilegales de abuso, tales como cocaína clorhidrato, metanfetamina, ecstasy, heroína, etc. (Evrard y cols. 2010; Chang y cols. 2010; Cole y cols. 2011; Broséus y cols. 2016; Vidal Giné y cols. 2016).

2. TIPOS DE MUESTRAS DE PBC

La PBC se comercializa principalmente bajo cuatro formas: “ladrillo” para el tráfico internacional, “tiza” y “roca” para el tráfico nacional y “gota” o “chasqui”, que es la forma que se vende dosificada al consumidor (Figura 3).

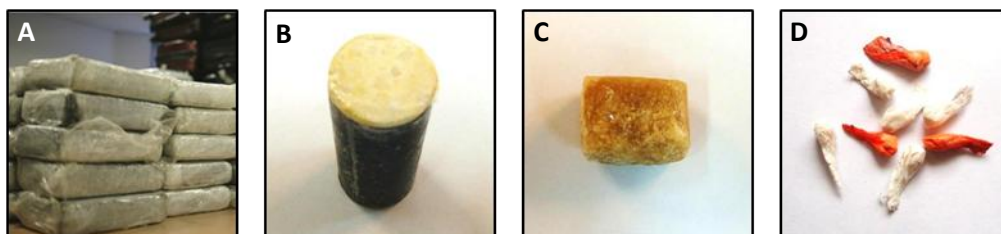


Figura 3. Muestras representativas de PBC en su formato ladrillo (A), tiza (B), roca (C) y gota (D).

Si bien es difícil constatar exactamente la cantidad que contiene cada muestra, se considera que cada gota posee entre 0,2 a 0,5 gramos de PBC (Pascale y cols. 2010). Se estima que los consumidores dependientes de PBC alcanzan a consumir más de 20 dosis por día, lo que daría un consumo diario de hasta 10 gramos, una cantidad importante si se considera que entre los consumidores de cocaína (clorhidrato) el máximo suele estimarse entre 2-3 gramos por día. Se piensa que el alto consumo de dosis por día está asociado a la corta duración del efecto que produce la droga, el cual es seguido por una profunda angustia y disforia en los consumidores, sensaciones que intentan evitar mediante el continuo consumo de la droga (Pascale y cols. 2014).

3. DEPENDENCIA A PBC

La dependencia o adicción a drogas de abuso es una enfermedad crónica del cerebro caracterizada por el consumo y la búsqueda compulsiva de la droga, la pérdida del autocontrol y la aparición de un estado emocional negativo (disforia, ansiedad, irritabilidad), cuando es impedido el acceso a la droga (Koob y Volkow 2010). La vulnerabilidad a la recaída puede persistir durante años de abstinencia, lo que implica que, a largo plazo, la adicción cause cambios perdurables en la función cerebral, como resultado del consumo crónico de la droga (Volkow y Baler 2014). Para la mayoría de las drogas de abuso, es importante mencionar que no todos los individuos que se

exponen a su consumo desarrollan dependencia a la sustancia. Por lo tanto, la exposición a largo plazo a las drogas es una condición necesaria, pero no suficiente para desarrollar dependencia. En el caso específico de PBC, hasta nuestro conocimiento no existen trabajos publicados que reporten un consumo recreacional o esporádico de PBC. Únicamente se ha reportado que el 53 % de quienes consumieron PBC en el último año presentan signos de dependencia. Dicha relación es extremadamente alta en comparación con otras drogas de abuso (34 % para cocaína; 16,6% para marihuana; 5,5 % para alcohol), posicionando a PBC como la droga de abuso con el mayor potencial adictivo de nuestro país (JNC 2012). Los últimos datos de la Junta Nacional de Drogas (2015) muestran que el 58,6 % de las consultas realizadas a los centros de asistencia a consumidores son debido al consumo de PBC (JND 2015). Este dato señala una mayor percepción de riesgo de parte de los usuarios de PBC en relación a otras drogas de abuso.

Factores genéticos, epigenéticos, ambientales y alteraciones en el Sistema Nervioso Central (SNC) durante el desarrollo juegan un rol fundamental en la vulnerabilidad a la adicción a drogas (Volkow y cols. 2011; Volkow y Baler 2014). Tampoco se conoce aún cuales son los mecanismos que expliquen la transición entre un consumo recreacional y/o abusivo y un consumo dependiente.

En particular, el fenómeno del consumo de PBC en Uruguay data del 2002 por lo que existen escasos datos epidemiológicos que señalen los factores de vulnerabilidad específicos que inciden en el fenómeno de la PBC. Sin embargo, datos proporcionados por el Centro Asistencial y de Referencia en Drogas “Portal Amarillo”, indican que factores socio-económicos y ambientales, co-morbilidad con trastornos afectivos y antecedentes de consumo de familiares, son algunos de los encontrados (Triaca y cols. 2009).

3.1. CONSUMO DE PBC Y PERFIL CLÍNICO CARACTERÍSTICO

La PBC es una forma básica de cocaína, que a diferencia del clorhidrato de cocaína posee un punto de volatilización bajo. Esta propiedad le confiere la capacidad de ser fumada, definiéndose así, al igual que el crack, como una cocaína fumable. La PBC se consume mediante pipas u otros dispositivos similares como latas o inhaladores, y

puede fumarse mezclada con otras drogas como tabaco y marihuana en forma de cigarrillo (Castaño 2000; Pascale y cols. 2014).

La vía de administración inhalatoria determina que la PBC volatilizada se absorba y alcance el SNC en pocos segundos, generando un potente y veloz efecto euforizante y psicoestimulante (Samaha 2005; Lizasoain y cols. 2002). En esta etapa inicial de euforia se produce un *flash* placentero e intenso de corta duración acompañado de una disminución de las inhibiciones, cambios en los niveles de atención, hiperexcitabilidad e hipersensibilidad sensorial (olfatoria, auditiva). Además existen alteraciones psicomotrices (hipertonía muscular y estereotipias), aumento de la presión arterial, temperatura corporal, frecuencia respiratoria y cardíaca. Luego de algunos minutos esta etapa de euforia cae bruscamente y es reemplazada por una marcada angustia, ansiedad e inseguridad, seguido de una profunda depresión (en ocasiones con ideación suicida), apatía e indiferencia sexual. Esta etapa de disforia lleva a que el individuo posea un deseo incontrolable por seguir consumiendo, desencadenando el fenómeno de búsqueda de la droga o *craving* (Pérez 2003; Pascale y cols. 2010; Pascale y cols. 2014).

Con el consumo crónico de PBC se establece una rápida y fuerte dependencia asociada a una marcada disminución del peso corporal, con anorexia, irritabilidad y alteraciones tanto en algunas funciones cognitivas (atención, memoria, razonamiento) como en el ciclo sueño-vigilia. A su vez, los consumidores pueden presentar un alto nivel de impulsividad y agresividad así como la rotura de los códigos sociales con el fin de obtener la droga, al mismo tiempo que la aparición de psicosis paranoide y alucinaciones. Estas alteraciones establecen un perfil clínico característico de los consumidores de PBC, el cual se diferencia del observado luego del consumo crónico de cocaína clorhidrato (Castaño 2000; JND 2006; Pascale 2014).

3.2. VÍA DE ADMINISTRACIÓN DE LA PBC

La inhalación de sustancias en su forma volatilizada es una vía de administración extremadamente potente, que se caracteriza por la absorción rápida y efectiva de la droga desde la mucosa nasal y los extensos capilares alveolares pulmonares, al flujo sanguíneo. La inhalación resulta en un inmediato aumento de los niveles de la droga

en sangre arterial, accediendo directamente al cerebro, al tiempo que se evita el primer pasaje hepático y la consecuente metabolización de la droga.

Se sabe que las diferentes vías de administración de cocaína (oral, esnifada, fumada o intravenosa) producen patrones farmacocinéticos diferenciales, lo que repercute de manera notable en los efectos conductuales que produce. La Figura 4 muestra las diferencias temporales de las concentraciones plasmáticas de cocaína luego de la administración de dosis equipotentes de cocaína por sus diferentes vías de administración a voluntarios sanos.

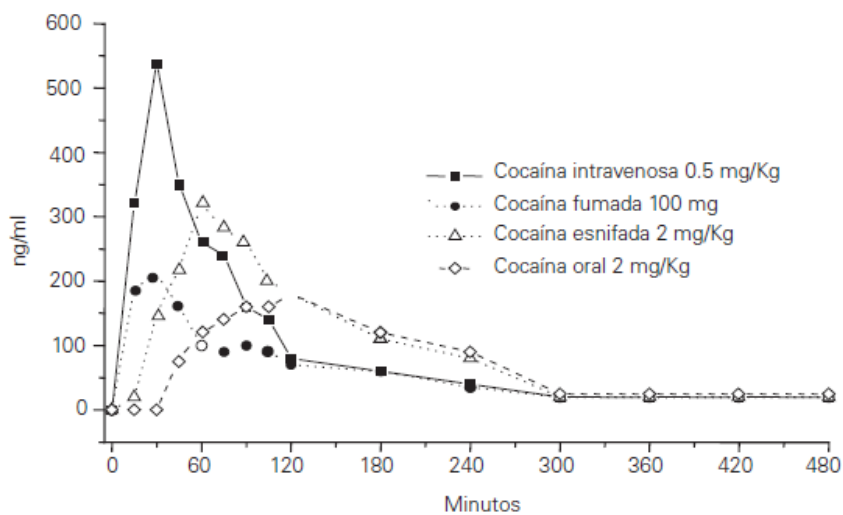


Figura 4. El gráfico representa las variaciones temporales en los niveles plasmáticos de cocaína en humanos, administrada a dosis equipotentes y a través de diferentes vías. Tomado de Lizasoain y cols. 2002.

Como se puede observar, la absorción por la mucosa nasal, después de esnifar, y la absorción a través del tracto digestivo, luego de su administración oral, es similar y más lenta que cuando la cocaína es fumada o administrada por vía intravenosa. Las vías de administración fumada e intravenosa son consideradas las más rápidas, dado que inducen un rápido aumento de los niveles plasmático de la cocaína, produciendo un pico a los 30 minutos, a diferencia de las vías de administración intranasal u oral, las cuales alcanzan sus máximos valores recién a los 60 y 120 minutos, respectivamente (Lizasoain y cols. 2002). Para el caso de PBC aún no hay evidencias reportadas que muestren la biodisponibilidad de la droga o sus componentes en plasma o en cerebro.

Sin embargo, dado que la PBC es una forma fumable de cocaína, los datos de cocaína fumada de la Figura 4 podrían extrapolarse a lo correspondiente para PBC, explicando en cierta manera, el patrón de consumo de los usuarios. La forma fumada de cocaína puede ser eficaz en su efecto, aunque menos eficiente, dado que posee baja biodisponibilidad en relación a las diferentes vías de administración. La diferencia entre la biodisponibilidad de la cocaína fumada y la administrada por la vía intravenosa podría adjudicarse a que durante la volatilización no se aspira la mayor parte del humo generado, y de lo aspirado no todo se absorbe, existiendo una buena parte del humo que se vuelve a expirar. Además, podría haber una incompleta volatilización de la cocaína fumada o a una mayor destrucción por la pirolisis.

Existen evidencias clínicas y preclínicas que sugieren que cuanto mayor es la velocidad con la cual una droga accede al SNC, mayor es el riesgo de abuso de dicha sustancia y su poder adictivo, aunque aún no están del todo claras las razones de este fenómeno (Samaha y Robinson 2005; Volkow y cols. 2011). Se ha argumentado que ésta puede ser la razón por la que el crack, otra cocaína fumable, es más adictiva que la cocaína esnifada (Hatsukami y Fischman 1996). En base a esto, la Figura 5 muestra la severidad de la dependencia de la cocaína consumida por tres vías diferentes: intranasal, fumada e inyectada, en comparación con otras dos drogas altamente adictivas como son la heroína y la anfetamina o metanfetamina (Gossop y cols. 1992).

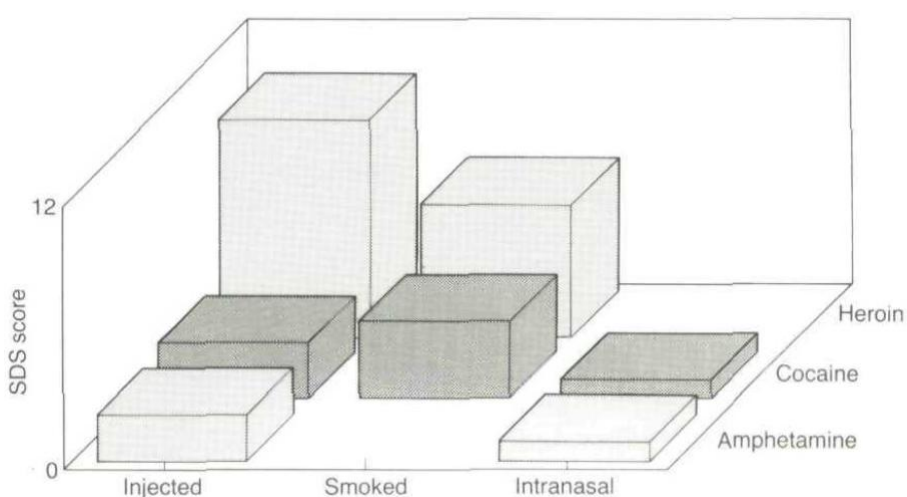


Figura 5. Relación entre la vía de administración y la severidad de dependencia producida por cocaína, anfetamina y heroína. La puntuación total de la escala de severidad de dependencia (SDS) fue calculada en base a cinco elementos, cada uno de los cuales se puntuó en una escala de cuatro puntos (0-3). Tomado de Gossop y cols. 1992.

Se puede observar que la inhalación pulmonar es la vía que induce un mayor grado de severidad en relación a la dependencia.

4. COCAÍNA: MECANISMO DE ACCIÓN

La cocaína, un alcaloide tropánico, es un estimulante del SNC, un supresor del apetito y un anestésico local. Específicamente, la cocaína es considerado un agonista dopaminérgico indirecto, el cual se une con gran afinidad al transportador de dopamina (DAT), bloqueándolo e inhibiendo de esta forma la recaptación de la dopamina (DA; Figura 6). Este bloqueo resulta en un aumento de la disponibilidad del neurotransmisor en la hendidura sináptica, aumentando la actividad dopaminérgica, particularmente en el sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, el cual forma parte del circuito motivacional o de recompensa (ver más adelante). Este sistema está conformado por las neuronas dopaminérgicas ubicadas en el área tegmental ventral (ATV) y sus proyecciones hacia el núcleo accumbens (NAcc) y corteza prefrontal (CPF) (Carboni y cols. 1989; Lizasoain y cols. 2002; Nestler 2005). Es la estimulación dopaminérgica la responsable de la mayoría de los efectos inducidos por la cocaína, tanto psicomotores como reforzadores (Moratalla 2008, Volkow y cols. 1995).

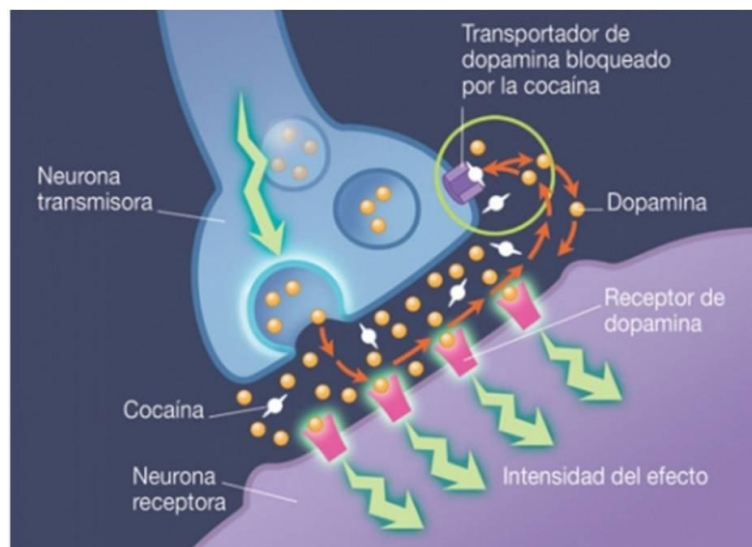


Figura 6. Mecanismos de acción de la cocaína. La cocaína inhibe la recaptación de dopamina uniéndose al DAT e inhibiendo su actividad, aumentando así la disponibilidad de ésta en la hendidura sináptica y promoviendo su transmisión vía receptores dopaminérgicos.

La cocaína también bloquea la recaptación de otras monoaminas como la serotonina y la noradrenalina, aunque el sistema dopaminérgico es el principal sustrato neuronal de los efectos reforzadores de la conducta adictiva inducida por cocaína, al igual que de la mayoría de las drogas de abuso (Di Chiara e Imperato, 1988; Moratalla 2008).

Algunos estudios sugieren que la velocidad con que la droga accede al cerebro es un factor muy importante para generar sus efectos reforzadores (Volkow y cols. 2011). Se ha demostrado que las diferentes vías de administración de cocaína producen un efecto recompensante diferente, medido en niveles equivalentes al bloqueo del DAT. Cuando la cocaína entra rápidamente en el sistema (fumado o intravenosa) produce efectos subjetivos más fuertes (ej. “high” y “liking”) en comparación a cuando ingresa al sistema por una vía más lenta (esnifada) (Hatsukami y Fischman 1996; Volkow y cols. 2000). Estos resultados indican que las diferencias en los efectos reforzadores y subjetivos de la cocaína en función de la vía de administración no se deberían a diferencias en el nivel alcanzado del bloqueo de DAT, sino que en la velocidad con la que la droga alcanzan el cerebro (Volkow y cols. 2000).

Otros estudios apuntan que las diferencias en la velocidad a la que se administra una droga determina la capacidad de producir el fenómeno de sensibilización comportamental (Samaha y Robinson 2005). Este fenómeno refleja los cambios plásticos y duraderos en las áreas que integran el circuito motivacional, como son la CPF, el NAcc y el ATV, asociadas al proceso adictivo (Pierce y Kalivas 1997). Existen resultados que muestran que los procesos neuroadaptativos iniciados por drogas adictivas son sensibles a la velocidad a la cual son administradas. Debido a esto, algunos autores postulan que la razón por la cual es importante la velocidad de absorción de las drogas en el desarrollo de la adicción estaría relacionada con la capacidad de inducir formas de plasticidad neuro-conductual que contribuyen al uso compulsivo y excesivo de las drogas (Samaha y Robinson 2005).

Tomando en cuenta todas éstas evidencias, se ha reportado que la vía de administración de la PBC podría explicar el perfil clínico observado en los consumidores el cual parece establecerse más rápido e intensamente que el observado en las personas adictas a cocaína clorhidrato (Ferrando y cols. 2009), sin

embargo, hasta la fecha no existen estudios preclínicos que reporten efectos de la PBC bajo la vía inhalada y que puedan colaborar con la interpretación a nivel clínico.

Estudios clínicos de imagenología molecular (SPECT), han demostrado la presencia de hipoactividad acentuada en circuitos prefrontales-subcorticales, estructuras límbicas y corteza de asociación relacionada en pacientes adictos a PBC durante el consumo activo. Dichas alteraciones probablemente corresponden a fenómenos de neuroadaptación inducidos por el desbalance dopaminérgico provocado por el consumo crónico de la droga. Los trastornos funcionales acentuados en la corteza prefrontal podrían relacionarse con predisposición a la conducta agresiva, particularmente durante el consumo o en la abstinencia relativamente precoz (Ferrando y cols. 2009).

5. SUSTRATO NEUROBIOLÓGICO DE DROGAS DE ABUSO

Las áreas cerebrales que conforman los ganglios basales son los sustratos neurales claves que controlan la actividad motora (efecto psicoestimulante) y el aprendizaje asociativo al efecto recompensante de las drogas de abuso. Disfunciones en el sistema de ganglios basales lleva a patologías tan devastadoras como la enfermedad de Parkinson, la Corea de Huntington, en los que el control motor se ve seriamente afectado, y a la adicción de drogas de abuso (Albin y cols. 1989; Graybiel 2000; Wickens y cols. 2003; Hyman y cols. 2006). Regiones como el ATV (en particular el sistema dopaminérgico) y el NAcc, que conforman el mencionado circuito motivacional conjuntamente con otras regiones cerebrales (CPF, Amígdala, hipocampo, etc.), poseen un solapamiento funcional en el control motor dado que pertenecen al sistema de ganglios basales en los que el estriado dorsal y la sustancia nigra pars compacta poseen un rol relevante. Sumado a esto, tanto el efecto eufórico o psicomotriz inducido por drogas psicoestimulante, así como la respuesta motivacional por el consumo, conlleva un componente motor, de búsqueda de la droga hasta su obtención, que implica la confluencia en la activación de las mismas regiones cerebrales, situación difícil de discriminar experimentalmente.

En particular, las bases neurobiológicas del efecto reforzador de las drogas de abuso incluyen a regiones y sistemas que integran el circuito motivacional o de recompensa (Kalivas y Volkow 2005; Koob y Volkow 2010), el que participa específicamente 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 el inicio y mantenimiento de respuestas conductuales vinculadas con los reforzadores naturales (comida, sexo), así como también con los efectos psicoactivos de drogas de abuso (Fernández-Espejo 2002; Kalivas y Volkow 2005).

El circuito motivacional incluye un conjunto de regiones interconectadas, diseñadas para optimizar la respuesta conductual frente a la recompensa y a asociaciones aprendidas con el efecto recompensante de la droga (Figura 7). A su vez, compromete varios sistemas de neurotransmisión (dopaminérgico, GABAérgico, glutamatérgico y peptidérgico), dentro de los que el dopaminérgico destaca particularmente.

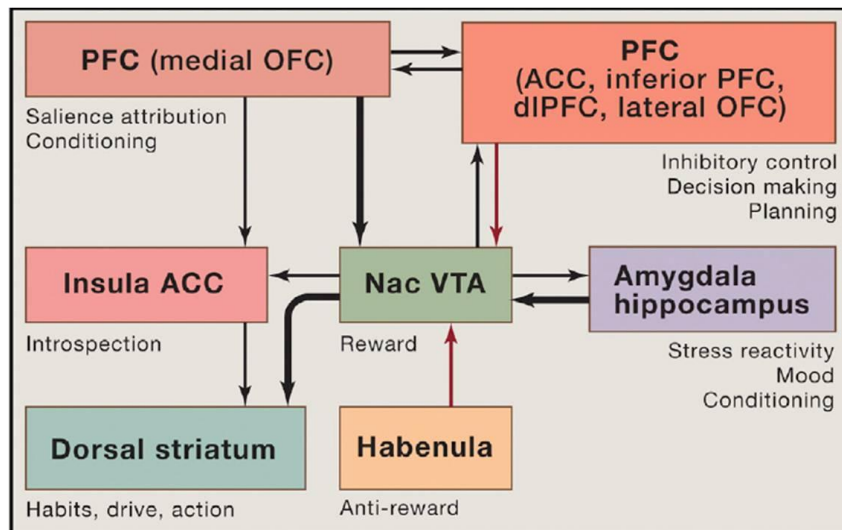


Figura 7. El esquema muestra la relación funcional entre las regiones que conforman el llamado circuito motivacional o de recompensa. NAc, núcleo accumbens; VTA, área tegmental ventral; PFC, corteza prefrontal; OFC, corteza orbitofrontal; ACC, corteza cingulada anterior; dIPFC, PFC dorsolateral. Tomado de Volkow y Morales 2015.

El ATV es una de las principales regiones involucradas en las propiedades reforzadoras de las drogas de abuso, conteniendo entre un 60 y 65 % de neuronas dopaminérgicas. Estas neuronas proyectan y modulan la amígdala, el NAcc y la CPF, formando el

sistema dopaminérgico mesocorticolímbico, involucrado en el control de la emoción, el comportamiento, la recompensa y la cognición (Fernández-Espejo 2002; Koob y Volkow 2010). La liberación de DA por parte de las neuronas del ATV sobre el circuito se da como respuesta a eventos motivacionalmente relevantes (Robinson y Berridge 1993). Esto promueve el inicio de respuestas comportamentalmente adaptativas, las cuales facilitan los cambios celulares que establecen asociaciones aprendidas con el estímulo (Jay 2003). De esta manera, el organismo puede emitir más eficazmente una respuesta adaptativa del comportamiento cuando el estímulo se repite.

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 (núcleo central de la amígdala y núcleo de la stria terminalis) también participa de este sistema, aunque de manera indirecta a través de sus conexiones con el ATV. La liberación de GABA y péptidos como el factor liberador de corticotropina sobre el ATV aporta información sobre estrés y aspectos ambientales e interoceptivos de valencia negativa (Cleck y Blendy 2008).

Por su parte, el NAcc es un sitio fundamental en la mediación de los efectos reforzadores de estímulos psicomotores, y se caracteriza por ser una estructura heterogénea conformada por dos subregiones anatómica y funcionalmente distintas: una región medial y ventral denominada *shell* y una región más lateral denominada *core* (David y cols. 1998). El NAcc *shell* es un núcleo importante en la modulación del valor motivacional de un estímulo y contribuye en establecer asociaciones entre estímulos motivacionales y percepciones ambientales concurrentes (Bassareo y Di Chiara 1999; Sellings y Clarke 2003). Por otro lado, el NAcc *core* media la expresión de comportamientos aprendidos en respuesta a contextos que predicen estímulos motivacionalmente relevantes (Ito y cols. 2000; Kalivas y Volkow 2005).

Mientras que la amígdala está involucrada en los comportamientos motivados por el miedo y el NAcc en aquellos comportamientos mediados por la recompensa, la CPF no

tiene una mayor vinculación con la determinación de si un estímulo es positivo o negativo (Kalivas y Volkow 2005). Esta estructura es reclutada por estímulos motivacionalmente relevantes, así como por señales que predicen dichos estímulos, y determina la realización e intensidad de la respuesta conductual (Breiter y cols. 1997). Conjuntamente con los aferentes dopaminérgicos, la activación de la CPF por los estímulos recompensantes está fuertemente influenciada por la predictibilidad de dicha recompensa (Berns y cols. 2001; Volkow y cols. 2003).

5.1. RELEVANCIA DE LAS NEURONAS DOPAMINÉRGICAS DEL ATV

Las neuronas dopaminérgicas localizadas en el ATV y que proyectan al NAcc juegan un rol clave en el procesamiento de los estímulos relacionados con la recompensa, incluidos aquellos asociados con las drogas de abuso (Wise 2008). A pesar de que las drogas adictivas presentan una gran diversidad molecular y actúan sobre diversos receptores y estructuras, existe una propiedad común, que es que luego de su administración aguda, aumentan la liberación de DA en el NAcc (Di Chiara e Imperato, 1988; Robinson y Berridge 1993; Di Chiara, 2002; Fernández-Espejo 2002; Kalivas y Volkow 2005). Se postula que las drogas de abuso imitan las descargas fásicas de las neuronas dopaminérgicas que llevan a un aumento rápido de DA y por lo tanto al mecanismo a través del cual el cerebro realiza las señales de recompensa (Volkow y Morales 2015).

Las neuronas dopaminérgicas del ATV descargan tanto de forma tónica (1-8 Hz) como transitoriamente (<500 ms) de forma fásica (>15 Hz), siendo esta última la que produce mayores aumentos de DA. Aunque en un principio se creía que las señales dopaminérgicas estaban relacionadas con la recompensa, estudios más recientes han revelado que estaría más relacionada con la predicción de la recompensa. Específicamente, estos resultados han demostrado que las descargas fásicas de DA se desencadenan por señales que predicen una recompensa, mientras que permanecen apagadas frente a una recompensa inesperada o novedosa (Volkow y Morales 2015).

Las neuronas del ATV proyectan predominantemente al NAcc, donde la DA interactúa con los receptores de DA D₁ y D₂, expresados principalmente en las neuronas espinosas medianas (NEMs). Las NEMs que expresan los receptores D₁ proyectan sus

señales a través de la vía directa del estriado, mientras que aquellos que expresan los receptores D_2 lo hacen por medio de la vía indirecta. Las vías directas e indirectas tienen papeles distintos en la modulación de la recompensa y la motivación. La vía directa está asociada con la recompensa, mientras que la indirecta está asociada con el castigo (Hikida y cols. 2010; Kravitz y cols. 2012). Debido a esto, la estimulación de los receptores de DA de la vía directa median directamente la recompensa, mientras que la inhibición mediada por los receptores de DA de la vía indirecta se oponen a las respuestas aversivas. Esto podría explicar porque se obtiene la máxima recompensa de una droga cuando la DA se une tanto a los receptores D_1 como D_2 .

Para que una droga produzca un efecto reforzador, esta tiene que producir aumentos grandes y rápidos de DA para poder estimular tanto los receptores D_1 de baja afinidad como los D_2 , activando así la vía directa e inhibiendo la indirecta. Esto podría explicar porque las vías de administración que logran niveles más rápidos y altos de droga en el cerebro (como la vía inhalatoria) son mas reforzadores y adictivos que aquellas drogas con una vía de administración más lenta (Volkow y Morales 2015).

Los aumentos de DA que son lo suficientemente grandes para activar los receptores D_1 , como aquellos inducidos por drogas de abuso en el NAcc, pueden inducir aprendizaje asociativo (Zweifel y cols. 2009). De esta forma, se genera un condicionamiento de los estímulos (contextuales y ambientales) asociados con la droga, que los hace ser capaz de estimular la liberación de DA del ATV hacia el NAcc. Se cree que el aumento de DA producido por estos estímulos asociados a la droga refleja la expectativa de recibir una recompensa. Estas respuestas condicionadas están mediadas por las neuronas glutamatérgicas provenientes de la amígdala, el hipocampo y la CPF que proyectan sobre las NEMs. El aumento de los niveles de DA luego de la exposición a un estímulo condicionado asegura que el individuo tenga la motivación para realizar los comportamientos necesarios para obtener el reforzador, ya sea este uno natural o farmacológico.

II. ANTECEDENTES PARTICULARES

1. COMPOSICIÓN QUÍMICA DE MUESTRAS DE PBC INCAUTADAS EN EL URUGUAY

Interesados en los factores que podrían explicar los efectos farmacológicos inducidos por la PBC, en primera instancia se evaluó el rol de la composición química. Para llevar a cabo este estudio, se realizó un análisis del contenido químico de 10 muestras de PBC provenientes de incautaciones policiales en Montevideo entre el 2007 y 2010 (Tabla 1). Estas muestras 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 se realizó en la Plataforma de Cromatografía de Alta resolución del IIBCE en colaboración con el Polo Tecnológico de Pando (Facultad de Química, Udelar), mediante el uso de las técnicas de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) y cromatografía líquida de alta resolución con detección de arreglo de diodos (HPLC-DAD).

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

Tabla 1. Análisis cuantitativo de 10 muestras de PBC realizado por HPLC-DAD. Los datos están expresados como Medias ± EEM. La cuantificación de cocaína, cis y trans-cinamoilcocaína 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, el análisis realizado determinó que cocaína (en su forma de base) fue el principal alcaloide presente en la PBC, y su contenido varió entre un 20 y 70 %. También se encontraron otros alcaloides presentes en la planta de coca, tales como la ecgonina y la trans y cis-cinamoilcocaína, los cuales aparecieron en un muy bajo porcentaje (0.1 - 4 %) en relación con la cocaína (López-Hill y cols. 2011). La presencia de estos alcaloides son indicativos de que la muestra incautada es pasta base de cocaína, dado que se pierden en el proceso de purificación y refinamiento hasta la obtención del clorhidrato de cocaína (Figura 1). La composición hallada coincidió con la descrita para muestras incautadas de PBC provenientes de Perú y Colombia y analizadas en los respectivos países (ElSholy y cols. 1991).

Dado que las drogas de abuso se venden frecuentemente adulteradas se analizó la presencia de adulterantes en las muestras de PBC incautadas. Cafeína fue el único adulterante encontrado y su contenido varió entre 1 y 15 %. 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). Cabe destacar además que la cafeína tiene la capacidad de ser volatilizada (Gostic y cols. 2009), hecho que explica su uso como adulterante en las muestras de PBC.

Si bien estos estudios nos permitieron tener una primera aproximación del contenido químico presente en las muestras de PBC del Uruguay, el número de muestras analizadas fue poco numeroso, por lo que fue necesario continuar con el análisis de nuevas incautaciones con mayor número de muestras para obtener un mejor correlato de la composición de las PBC consumidas en el Uruguay.

2. CAFEÍNA: MECANISMO DE ACCIÓN

La cafeína, un alcaloide del grupo de las xantinas, es la droga psicoactiva más popular del mundo. La razón de su popularidad se encuentra en sus propiedades psicoestimulantes y en la ausencia de importantes efectos secundarios negativos luego de su consumo agudo y crónico (Fisone y cols. 2004). Debido a esto, no existen restricciones sobre el consumo de cafeína y no se encuentra clasificada como droga de abuso en la DSM-IV (Fredholm y cols. 1999). Sin embargo, algunos autores han

señalado a la cafeína como una “droga de abuso atípica” y la posibilidad de que el abuso, la dependencia y la abstinencia a la cafeína deberían ser añadidos a los manuales de diagnóstico, ha sido considerado seriamente (Daly y Fredholm 1998; Hughes y cols. 1998).

La cafeína es un antagonista competitivo no selectivo de los receptores de adenosina y produce su efecto psicoestimulante contrarrestando los efectos tónicos de la adenosina endógena (Fredholm y cols. 1999; Ferre 2016). El efecto psicoestimulante depende en gran medida de la capacidad de la adenosina de modular la función de múltiples sistemas de neurotransmisores, dentro de los que destaca el sistema dopaminérgico. La adenosina se une a cuatro tipos de receptores metabotrópicos (A_1 , A_{2A} , A_{2B} y A_3), siendo los receptores A_1 y A_{2A} los que presentan una mayor afinidad, y sobre los cuales la cafeína ejerce sus principales efectos (Ferre 2010). Estos dos receptores tienen efectos farmacológicos opuestos: la activación de los receptores A_1 reducen los niveles de AMP cíclico, produciendo un efecto inhibitorio, mientras que la de los receptores A_{2A} los aumentan, generando un efecto excitatorio (Londos y cols. 1980; Astrid y cols. 1992; Fisone y cols. 2004).

El patrón de distribución en el cerebro de los receptores A_1 y A_{2A} difiere notablemente. La mayoría de los receptores de adenosina A_1 se encuentran localizados en las terminales pre-sinápticas de numerosas regiones del cerebro, donde al ser estimulados por adenosina inhiben la liberación de varios neurotransmisores, dentro de los que se encuentran la DA, el glutamato y la acetilcolina (Fredholm y cols. 1988; Solinas y cols. 2002). Se cree que la inhibición producida sobre los receptores A_1 es la responsable de los efectos positivos producidos por la cafeína sobre la excitación, la vigilancia y la atención (Fisone 2003).

En contraste con la amplia distribución de los receptores A_1 , la expresión de los receptores A_{2A} en el cerebro está limitada a regiones muy innervadas por fibras dopaminérgicas, como es el caso del cuerpo estriado (Jarvis y Williams 1989; Fisone y cols. 2004; Cauli y Morelli 2005). En el estriado, los receptores A_{2A} están altamente expresados post-sinápticamente en una gran población de NEMs. Hay evidencias que indican que la cafeína produce su efecto estimulante en la actividad motora al actuar

sobre estas neuronas del estriado (Figura 8). En particular, la mayoría de los efectos bioquímicos y comportamentales de la cafeína se han relacionado con su capacidad de reducir la inhibición ejercida por la adenosina endógena en la transmisión de DA estriatal (Fisone y cols. 2004). Una gran cantidad de evidencias indican la existencia de una relación antagónica compleja entre los receptores A_{2A} de adenosina y los receptores de DA D_2 , en las neuronas de proyección estriatal. Estudios realizados muestran que la activación de receptores de adenosina A_{2A} reduce la afinidad de los receptores de DA D_2 por sus agonistas (Ferre y cols. 1991). Esto nos sugiere que la cafeína estimula la actividad motora contrarrestando el control inhibitorio que ejercen los receptores de adenosina A_{2A} sobre los receptores de DA D_2 estriatales (Fisone y cols. 2004; Yacoubi y cols. 2000).

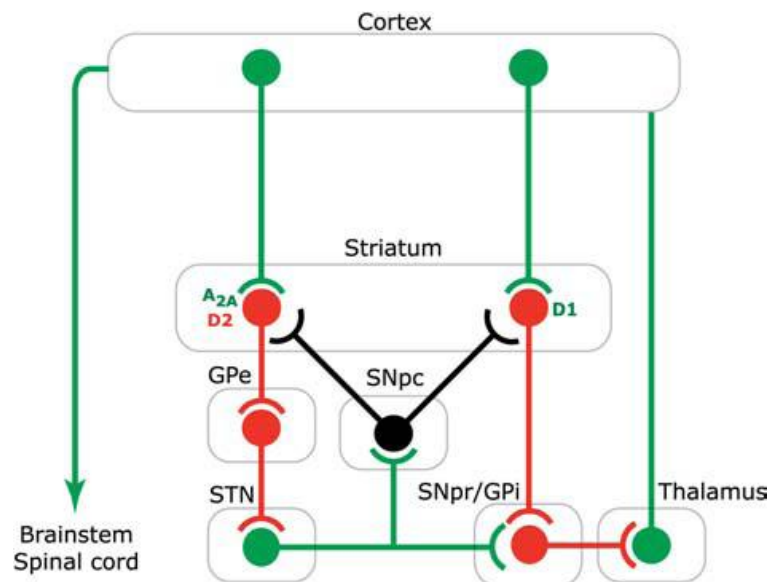


Figura 8. Diagrama ilustrativo de la organización funcional de los ganglios basales. Los inputs excitatorios (glutamatérgicos), inhibitorios (GABAérgicos) y modulatorios (dopaminérgicos) se muestran como líneas verdes, rojas y negras, respectivamente. La dopamina activa, mediante los receptores D_1 , la vía directa mientras que inhibe, mediante los receptores D_2 , la vía indirecta. Ambas vías desinhiben las neuronas glutamatérgicas tálamo-corticales, promoviendo la actividad motora. La cafeína produce su efecto estimulante psicomotor mediante el bloqueo de los receptores de adenosina A_{2A} , impidiendo así que la adenosina inhiba el efecto de la DA sobre los receptores D_2 . Gpe: globo pálido externo; Gpi: globo pálido interno; STN: núcleo subtalámico; SNpc: sustancia negra pars compacta; SNpr: sustancia negra pars reticulata. Tomado de Fisone y cols. 2004.

3. ROL DE LA COCAÍNA Y CAFEÍNA EN EL EFECTO FARMACOLÓGICO DE PBC

La relevancia de la variabilidad de la composición química en el efecto farmacológico de la PBC fue evaluada mediante el estudio de la acción estimulante inducida por diferentes muestras de PBC. La acción estimulante se determinó mediante el registro de la distancia recorrida (como índice de la actividad locomotora) inducida por la administración sistémica intraperitoneal (i.p.) aguda de diferentes muestras inyectadas a dosis equivalentes en cocaína base. Los resultados indicaron que dos de las muestras de PBC estudiadas (PBC 1 y 7, Tabla 1) indujeron un aumento en la distancia recorrida respecto del grupo control, el cual fue superior además, del inducido por el grupo tratado con cocaína pura. A través de estos experimentos, se pudo determinar que cocaína fue el principal componente responsable de la aparición del efecto estimulante inducido por las diferentes muestras de PBC, y que cafeína, cuando está presente en determinadas proporciones, es capaz de actuar en forma aditiva con la cocaína potenciando su efecto estimulante (López-Hill y cols. 2011; Prieto y cols. 2012). Estos resultados también demostraron que las impurezas (cis y trans-cinnamoilcocaína) presentes en las muestras de PBC, no contribuyeron en el efecto estimulante producido por PBC. Estos datos resaltaron la importancia de considerar el contenido químico y las características de los adulterantes a la hora de estudiar las acciones de la PBC en el SNC.

Por otra parte, a nivel neuroquímico, el efecto estimulante inducido por la PBC 1 (Tabla 1) se relacionó con un aumento en la transmisión dopaminérgica en el NAcc (Meikle y cols. 2009), propiedad que comparten todas las drogas de abuso y que refleja un aumento en la actividad del sistema dopaminérgico mesolímbico (Carboni y cols. 1989; Robinson y Berridge 1993; Koob y Le Moal 2006).

A partir de estos resultados se pudo demostrar la importancia de la composición química de las muestras estudiadas como factor determinante en la propiedad estimulante de la droga, siendo la cantidad de cocaína y la presencia de su principal adulterante, cafeína, los responsables de dicha propiedad.

A pesar de esto, restaba conocer los factores que explicaran la alta dependencia inducida por PBC, por lo que se profundizó 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 la cocaína y cafeína en la capacidad de inducir el fenómeno de sensibilización comportamental (Prieto y cols. 2015), fenómeno neurobiológico que refleja los cambios duraderos que subyacen a la búsqueda de la droga, la asociación con el contexto y la recaída. Este fenómeno ocurre tanto en humanos como en animales de experimentación, y aparece luego de la administración repetida de una droga psicoestimulante, la que provoca una potenciación del efecto hiperlocomotor cuando el animal es re-expuesto a la droga luego de un período de abstinencia (Robinson y Berridge 1993; Pierce y Kalivas 1997; Vanderschuren y Pierce 2010). Para evaluar dicho fenómeno inducido por PBC, se cuantificó la actividad locomotora de los animales en un campo abierto (CA), tratados repetidamente con una muestra de PBC (PBC 1, Tabla 1) y su sucedáneo en cocaína y cafeína, utilizando dos protocolos de administración repetida (5 y 3 días) y un período de abstinencia de 5 días (Prieto y cols. 2015). Se utilizaron animales controles y tratados con una solución de cocaína pura a dosis equivalentes en cocaína base.

Los resultados mostraron que tanto la muestra de PBC como cocaína pura fueron capaces de inducir el fenómeno de sensibilización comportamental luego de 5 días de tratamiento, aunque la expresión de la misma fue mayor en el grupo pre-tratado con PBC. A su vez, en el grupo tratado con el sucedáneo de la PBC, la presencia de cafeína fue capaz de potenciar y acelerar la sensibilización inducida por cocaína, de forma tal que la combinación de ambas sustancias fue capaz de inducir la sensibilización con tan sólo 3 días de tratamiento. Para cocaína en cambio, el protocolo de 3 días no fue suficiente para inducir este fenómeno (Prieto y cols. 2015). Los controles pretratados con salino y desafiados con los diferentes tratamientos no alcanzaron a desarrollar ni a expresar la sensibilización.

Por otra parte, con el fin de evaluar el comportamiento de búsqueda de la droga y la motivación de los animales por obtener el sucedáneo de PBC (combinación de cocaína y cafeína) en comparación con cocaína pura se utilizó el modelo de autoadministración intravenosa (Prieto y cols. 2016). Este modelo intenta reflejar aspectos motivacionales de la droga autoadministrados por el propio animal, en semejanza con lo que ocurre en usuarios de drogas (Robinson y Berridge 2008).

Los experimentos demostraron que los animales tratados con cocaína y la combinación de cocaína y cafeína exhibieron eficientemente el comportamiento de autoadministración, lo que demostró el poder reforzador de ambos tratamientos. A su vez, bajo el régimen progresivo (protocolo en el que al animal se le hace mas espaciado el acceso a la droga), el *breaking point* (medida que indica el grado de esfuerzo que el animal está dispuesto a realizar por obtener la droga) de la combinación cocaína y cafeína fue más alto que el de cocaína sola, evidenciando una mayor motivación por la obtención de la droga (Prieto y cols. 2016). El grupo tratado con cafeína únicamente, no exhibió el comportamiento de auto-administración, confirmando el bajo poder reforzador de la cafeína a la dosis ensayada y por la vía intravenosa.

El conjunto de estos estudios resaltaron la importancia de la variabilidad en la composición química en la determinación del efecto estimulante y en la propiedad motivacional y reforzadora de la PBC (propiedades asociadas al potencial adictivo) demostrando que la cafeína presente en las muestras podría colaborar a la fuerte dependencia que produce en los consumidores. Sin embargo, la PBC es una cocaína fumable por lo que nos propusimos comenzar a realizar estudios pre-clínicos que evalúen los efectos de la PBC y de sus adulterantes reproduciendo la vía de administración utilizada en humanos.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

PBC suministrada por la vía inhalatoria pulmonar induce un efecto estimulante que se potencia por la presencia de cafeína. A su vez, el efecto estimulante se asocia a un aumento en la transmisión dopaminérgica en el NAcc.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar el efecto estimulante y neuroquímico inducido por la inhalación pulmonar de diferentes muestras de PBC, evaluando el papel de la cafeína en ambos efectos así como su efecto *per se* por la vía inhalatoria.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar químicamente una serie de muestras de PBC incautadas en Uruguay entre los años 2007-2014.

1.1. Identificar los componentes presentes en las muestras de PBC mediante la técnica de GC-MS.

1.2. Cuantificar los componentes presentes en las muestras de PBC mediante la técnica de HPLC-DAD.

2. Caracterizar el efecto estimulante inducido por PBC y cafeína volatilizada.

2.1. Determinar el efecto estimulante inducido por la volatilización de muestras de PBC con diferente contenido en cocaína y cafeína. Analizar los niveles plasmáticos de cocaína y cafeína de los animales tratados.

2.2. Determinar el efecto estimulante *per se* de cafeína mediante una curva dosis-respuesta. Analizar los niveles plasmáticos de cafeína de los animales tratados.

2.3. Determinar la influencia de la cafeína en el efecto estimulante de las muestras de PBC adulteradas o no con cafeína. Analizar los niveles plasmáticos de cocaína y cafeína de los animales tratados.

3. Caracterizar el efecto neuroquímico inducido por PBC y cafeína volatilizada.

3.1. Evaluar los cambios en los niveles extracelulares de DA en el NAcc *shell* de animales expuestos a muestras de PBC volatilizada con contenido diferente en cocaína y cafeína. Determinar la influencia de la cafeína en el efecto neuroquímico.

3.2. Determinar el efecto *per se* de cafeína sobre los niveles extracelulares de DA en el NAcc *shell*.

4. Analizar la composición química del humo de las muestras de PBC y cafeína volatilizada.

4.1. Evaluar por GC-MS la aparición de posibles productos de combustión en el humo de muestras de PBC.

4.2. Evaluar por GC-MS la aparición de posibles productos de combustión en el humo de muestras de cafeína.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. DROGAS

Se utilizaron muestras de PBC de diferentes incautaciones proporcionadas por el Instituto Técnico Forense con la autorización de la Junta Nacional de Drogas y del Ministerio de Salud Pública, a través de la Comisión de Lucha contra las Toxicomanías. Cafeína se obtuvo de Sigma-Aldrich (Alemania) y cocaína y cafeína deuterada de Cerilliant (USA).

2. ANIMALES

Se utilizaron 90 ratas macho, cepa Wistar, de 2-3 meses de edad y un peso de 250-330 gr. Los animales fueron criados en el Bioterio del IIBCE, alojados en grupos de a 5 en cajas de plástico transparentes (50 x 37.5 x 21 cm) y mantenidos en condiciones controladas de temperatura (22 ± 2 °C), ciclo de luz-oscuridad (07:00-19:00 h) y comida y agua *ad libitum*. Todos los experimentos se llevaron a cabo 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. Los experimentos fueron realizados en el cuarto de experimentación del Departamento de Neurofarmacología Experimental con condiciones de luz y temperatura iguales a las del Bioterio.

3. ANÁLISIS QUÍMICO DE MUESTRAS DE PBC

Se analizó químicamente una serie de 27 muestras de PBC incautadas en el período 2007-2014 con el fin de identificar y cuantificar el nivel de pureza de su principal alcaloide, cocaína, así como el de las sustancias utilizadas como adulterantes. Cabe señalar que las muestras que integran la Tabla 1 mostrada en la sección Introducción han sido analizadas nuevamente con el fin de profundizar en la identificación de otros adulterantes no estudiados anteriormente. Dicho análisis se realizó mediante los siguientes métodos analíticos:

3.1. CROMATOGRAFÍA DE GASES ACOPLADA A ESPECTROMETRÍA DE MASAS

El GC-MS es un método analítico que combina las características de la cromatografía de gases y de la espectrometría de masas para separar, identificar y cuantificar el contenido de muestras volátiles y semi-volátiles. La separación de dichas sustancias depende de la diferente distribución de las sustancias estudiadas entre la fase móvil y la estacionaria que conforman el sistema cromatográfico. Una vez separadas las sustancias son fragmentadas y analizadas en función de su patrón de fragmentación, el cual puede ser comparado con información contenida en una base de datos de espectros de masas para su identificación. Mediante el uso de esta técnica se identificaron los principales componentes presentes en las muestras de PBC.

En el presente trabajo se utilizó un equipo GC-MS-QP 2010 Ultra (Figura 8), con inyector automático (AOC-20i. Shimadzu Corporation) y con una columna HP-5MS (30 m largo x 0.25 mm diámetro interno x 0.25 μ m de espesor de fase; Agilent J & W GC Columns). Se utilizó helio como gas carrier a un flujo de columna de 0.93 ml/min y los cromatogramas se analizaron con el software GCMSolution Versión 2.71.



Figura 9. Equipo de GC-MS utilizado para la identificación de los componentes presentes en la PBC. También se utilizó para identificar y cuantificar los niveles plasmáticos de cocaína y cafeína en los animales tratados con PBC y cafeína volatilizada.

3.2. CROMATOGRAFÍA LÍQUIDA DE ALTA RESOLUCIÓN CON DETECCIÓN DE ARREGLO DE DIODOS

El HPLC es una técnica de separación basada en la retención diferencial de los componentes de una muestra disueltos en la fase móvil al pasar por la fase estacionaria. La interacción entre el soluto de la fase móvil y la fase estacionaria

determina la separación de los componentes a identificar. El detector de arreglo de diodos (DAD) está dentro de la espectrofotometría ultravioleta. Este consta de una lámpara de erbio como fuente de luz, el cual permite registrar la absorbancia simultánea en todo el rango UV/VIS, con una resolución óptica de 1.2 nm y un rango de 190 a 800 nm. La muestra a estudiar es atravesada por una luz blanca (todas las λ) y el policromador dispersa la luz en las diversas λ que la componen, haciéndolas incidir en la fila de fotodiodos. En cada diodo incide una λ diferente, que manda la información al sistema de análisis de datos. Mediante el uso de esta técnica se cuantificaron los principales componentes presentes en las muestras de PBC. El uso de soluciones estándares de los componentes conocidos presentes en la muestra de PBC permitió la cuantificación de los mismos.

En el presente trabajo se utilizó un equipo HPLC Waters (Figura 10), con inyector automático (Waters 717 plus), bomba binaria (Waters 1525), detector de arreglo de diodos (Waters 2998) y con una columna Luna-C18 (5μ , 100 Å (150*4.6 mm), Phenomenex). Se utilizó metanol 90 % (A) y buffer (ácido acético / acetato de sodio, pH=3.65: agua bi-destilada (5:95); octil sulfato de sodio (SOS) 0.86 mM) (B) como fase móvil según el siguiente gradiente: de 0 a 20 minutos se pasa de 30 % a 100 % de A, un período isocrático de 14 minutos con 100 % de A y se restablecen las condiciones iniciales por 10 minutos. Los cromatogramas fueron analizados mediante el software Empower Pro a la longitud de onda óptima para cada analito.



Figura 10. Equipo de HPLC-DAD utilizado para la cuantificación de los componentes presentes en la PBC.

3.3. PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS DE PBC

Se preparó una solución concentrada (SCi) a partir de la toma de 50 mg de cada muestra de PBC y se disolvió en 5 ml de metanol (J.T. Baker, calidad HPLC). Para cada técnica se procedió diferencialmente:

- **GC-MS:** Se tomó un volumen de 20 μ l de SCi y se diluyó en 980 μ l de cloroformo (J.T. Baker, calidad HPLC), inyectando posteriormente 1 μ l de dicha solución en el GC-MS (Figura 11).

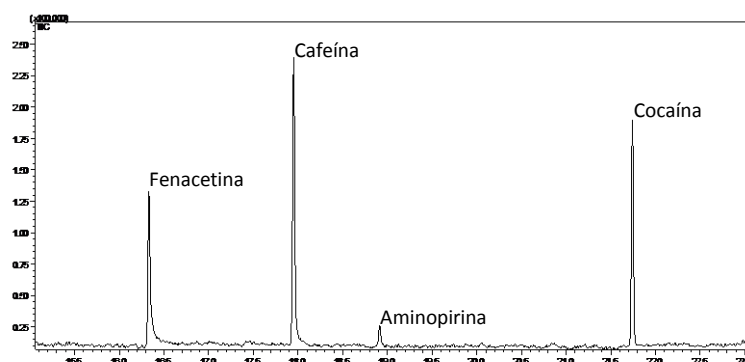


Figura 11. Perfil cromatográfico representativo de una muestra de PBC analizada en el GC-MS.

- **HPLC-DAD:** Se tomó un volumen de 20 μ l de SCi y se diluyó en 980 μ l de fase móvil, inyectando posteriormente 20 μ l de dicha solución en el HPLC-DAD (Figura 12).

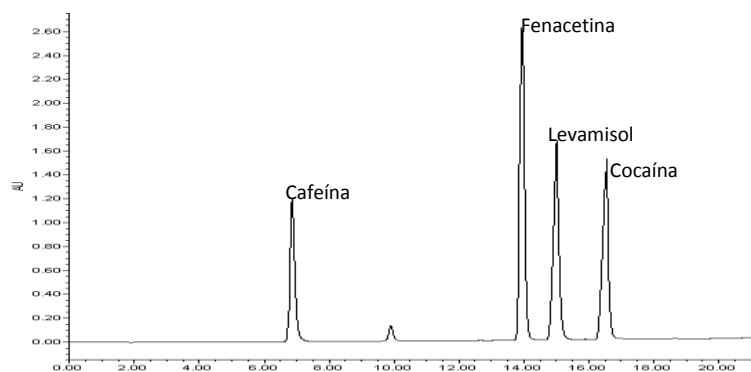


Figura 12. Perfil cromatográfico representativo de las soluciones estándares ensayadas en el HPLC-DAD.

4. VOLATILIZACIÓN DE PBC Y CAFEÍNA

4.1. DOSIS Y VÍA DE ADMINISTRACIÓN

Tanto las muestras de PBC como la cafeína fueron volatilizadas utilizando un dispositivo similar a aquellos utilizados por los consumidores de PBC (Figura 13). Las dosis de las diferentes PBC fueron calculadas en base a su contenido en cocaína base, siendo éstas equiparadas a 50 mg de cocaína. La cafeína fue administrada a tres diferentes dosis (10.5, 25 y 50 mg), teniendo como referencia la dosis máxima de 50 mg de cocaína ensayada para PBC.

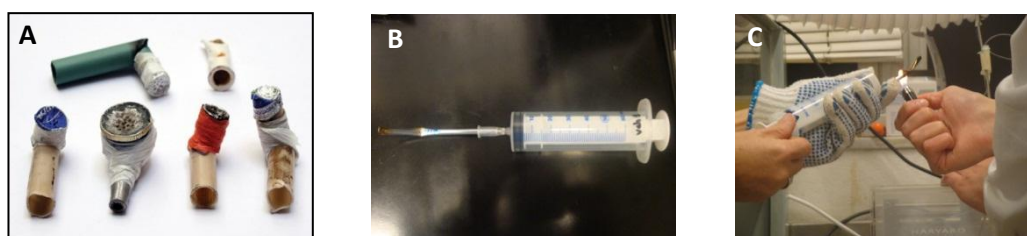


Figura 13. Dispositivos caseros utilizados por los consumidores de PBC **(A)**. Dispositivo utilizado durante el protocolo para llevar a cabo la volatilización de la PBC y la cafeína **(B)**. Mecanismo mediante el cual se llevó a cabo la volatilización de las diferentes muestras **(C)**.

4.2. CÁMARA INHALATORIA

Para la realización de los experimentos conductuales se diseñó una cámara inhalatoria de material acrílico, rectangular de 23 x 15 x 10 cm con una capacidad de 3.331 cm³ para la exposición de los animales a la volatilización de las drogas (Figura 14). El diseño de dicha cámara se basó en diferentes trabajos ya publicados adaptados a nuestras condiciones (Jardim y cols. 2010; Yamada y cols. 2010). La cámara posee una válvula de entrada, el cual permite la colocación de una jeringa de 60 ml. mediante la cual se inyectó el humo generado por la droga volatilizada.

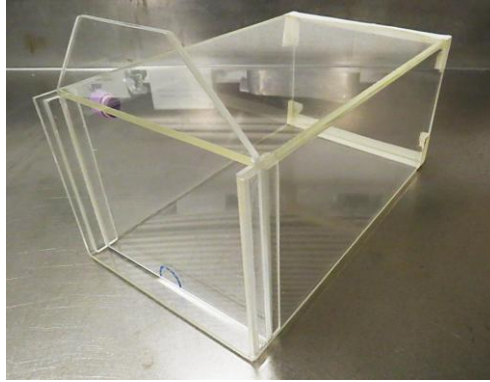


Figura 14. Cámara inhalatoria de acrílico diseñada para llevar a cabo la exposición de los animales al humo de la droga en los experimentos comportamentales.

4.3. PROCEDIMIENTO DE VOLATILIZACIÓN E INHALACIÓN

La volatilización de las drogas se realizó mediante el uso de un tubo de metal; en uno de sus extremos se colocó la droga a ser quemada, mientras que en el otro se colocó una jeringa para realizar el vacío necesario para extraer el humo de la volatilización (Figura 13B). El humo generado fue inmediatamente inyectado en la cámara inhalatoria, con la previa introducción del animal.

Todo el procedimiento se realizó bajo una campana de extracción de aire. Para estandarizar la exposición de los animales a las diferentes drogas, se utilizó el mismo volumen de inyección, el mismo tiempo de exposición dentro de la caja y para cada PBC estudiada (con o sin la presencia de adulterantes) se volatilizaron cantidades equivalentes de cocaína base. Los animales permanecieron expuestos al humo durante 10 min en la caja. El grupo control se dejó por 10 min libre de humo en el interior de la caja (Figura 15).



Figura 15. Los experimentos fueron realizados bajo campana **(A)**. Los animales fueron colocados dentro de una cámara inhalatoria **(B)**, donde fueron expuestos en forma aguda al humo de las diferentes muestras de PBC y a las diversas dosis de cafeína volatilizada **(C)**.

5. ESTUDIOS COMPORTAMENTALES

5.1. EFECTO ESTIMULANTE

El estudio del efecto estimulante se realizó mediante la evaluación de la actividad locomotora horizontal y la actividad exploratoria vertical (número de *rearings*) de los animales inmediatamente después de la volatilización de las distintas drogas a estudiar. Para ello se utilizó el modelo de CA (Figura 16), el cual consiste en una caja cuadrada (60 x 60 cm) con paredes de acrílico rojas de 40 cm de alto, en el cual se colocó a los animales por un período de 30 minutos para observar su conducta. Los animales no son habituados por lo que el CA constituye un ambiente novedoso para el animal, favoreciendo su exploración. Esta característica hace que el CA sea extensamente utilizado para el análisis de la actividad locomotora (Archer 1973; Razafsha y cols. 2013).

Los experimentos fueron filmados mediante una cámara asociada a un software de video-seguimiento (Ethovision XT 7) el cual permite cuantificar parámetros tales como la distancia recorrida (m) y la velocidad del movimiento (m/s).

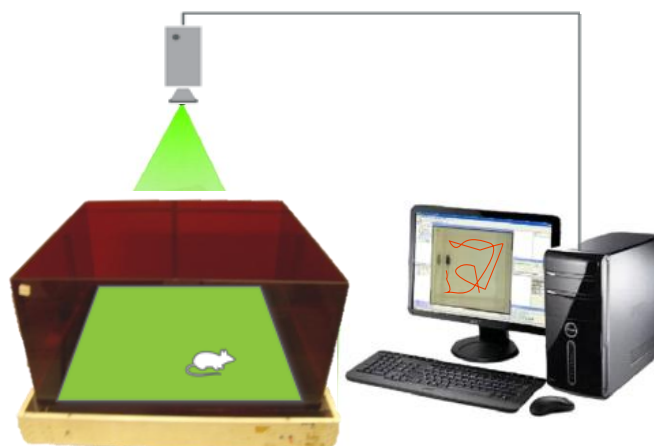


Figura 16. Modelo de CA asociado a un software de video-seguimiento mediante una cámara de video.

5.2. VALIDACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS DE LOS NIVELES PLASMÁTICOS DE COCAÍNA Y CAFEÍNA

El análisis de drogas de abuso así como adulterantes o impurezas de muestras de venta callejera (cocaína, cafeína, fenacetina, etc.) ha sido estudiado ampliamente gracias al uso de diferentes técnicas analíticas. El análisis por GC-MS es uno de los más comúnmente utilizados para este tipo de fines y su principal ventaja es la alta sensibilidad que confiere la técnica.

Para llevar a cabo la cuantificación de los niveles plasmáticos de cocaína y cafeína utilizando la técnica de GC-MS se realizó la puesta a punto del método, la cual se realizó por medio de dos pasantías locales, una en el Polo Tecnológico de Pando y la otra en el Departamento de Biología Molecular del IIBCE.

Para la puesta a punto del método se analizaron diferentes parámetros (estándares internos, solventes, temperatura del inyector, detector y fuente de iones, rampas de temperatura, etc.) para obtener los mejores resultados a la hora de analizar las muestras de plasma. Dichos procedimientos se realizaron sin la utilización de muestras de plasma. Las pruebas se llevaron a cabo utilizando soluciones estándares de cocaína y cafeína, con el agregado de sus respectivos estándares internos, con el fin de determinar una curva de calibración para la cocaína y cafeína.

Un estándar interno es un compuesto muy similar, pero no idéntico, al analito de interés en la muestra a analizar. Este compuesto se añade en cantidades constantes a la muestra y se utiliza para determinar la concentración del analito en cuestión.

En primera instancia las pruebas se llevaron a cabo utilizando atropina y difenilamina como los estándares internos de cocaína y cafeína respectivamente. A pesar de que ambos compuestos mostraron ser correctos estándares, presentaban ciertas dificultades a la hora de realizar las pruebas en plasma. En base a esto, decidimos realizar los trámites necesarios para comprar los compuestos deuterados, de cocaína y cafeína, los cuales constituyen los estándares internos más adecuados y utilizados en la bibliografía especializada.

Una vez que contamos con la cocaína y cafeína deuterada se procedió a determinar el tiempo de retención y los iones de los diferentes compuestos a analizar en las corridas,

para luego poder identificarlos a la hora de analizar nuestras muestras. Para ello, se prepararon estándares de los diferentes compuestos a analizar (cocaína, cafeína, cocaína-D3, y cafeína-D3) en concentraciones de 0.5 mg/ml y se corrieron por GC-MS mediante el método de *total ion current* (TIC) y *split* (1/25). Los tiempos de retención y los iones seleccionados se muestran en la Tabla 2.

COMPUESTO	TIEMPO DE RETENCIÓN (MIN)	IONES SELECCIONADOS
Cafeína	18.027	<u>194</u> -109
Cafeína-D3	18.073	<u>197</u> -111
Cocaína	21.873	<u>182</u> -82
Cocaína-D3	21.854	<u>185</u> -85

Tabla 2. Tiempos de retención e iones seleccionados para la clasificación y cuantificación de cada analito. Los iones fueron seleccionados en base a su abundancia y a la relación masa-carga (m/z). Debido a su reproducibilidad y falta de interferencia, se seleccionaron en lo posible iones de masa alta. Los iones subrayados fueron los utilizados posteriormente para la cuantificación.

También se llevo a cabo la evaluación de diferentes solventes para determinar cual nos brindaba los mejores resultados. Se realizaron estándares en metanol, diclorometano y cloroformo para analizar tanto la solubilidad de los compuestos como los cromatogramas obtenidos, evaluando la reproducibilidad y resolución de las corridas. En base a los resultados obtenidos se determino que cloroformo era el solvente más adecuado para nuestro estudio.

Una vez determinado los tiempos de retención y el solvente a utilizar se llevo a cabo las curvas de linealidad mediante el método de *selected-ion monitoring* (SIM) y *splitless* (Figura 17). Los resultados mostraron curvas lineales, las cuales se mantuvieron constantes a lo largo de los días analizados.

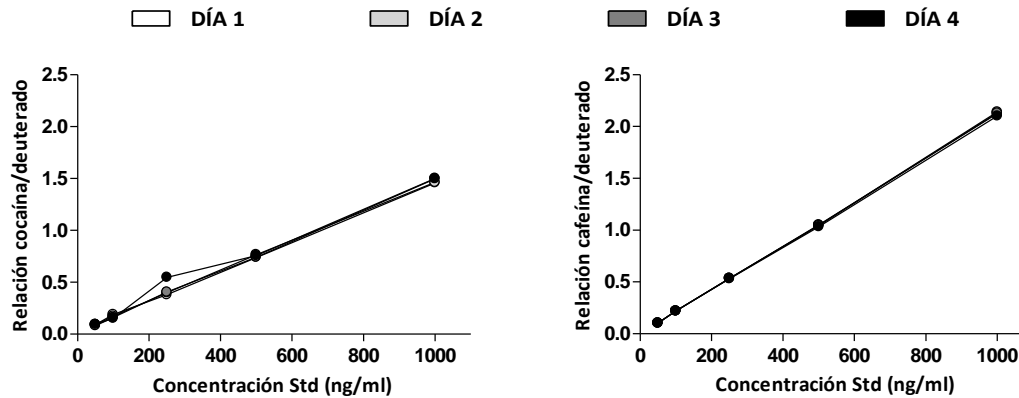


Figura 17. Estándares de cocaína, cafeína y sus respectivos deuterados preparados en cloroformo y corridos durante 4 días diferentes.

Por último, se ensayaron diferentes condiciones del GC-MS y diversos protocolos para la preparación de las muestras de plasma de forma tal de obtener altos porcentajes de recuperación y de detección de los compuestos deseados. Durante este proceso tuvimos varias dificultades para obtener una buena reproducibilidad y una alta detección de las muestras analizadas. El protocolo para la preparación de las muestras y las condiciones finales del GC-MS se muestran en el siguiente punto.

5.3. PRODEDIMIENTO DE OBTENCIÓN DE PLASMA E INYECCIÓN DE MUESTRAS EN GC-MS

Una vez finalizados los experimentos comportamentales, los animales fueron sacrificados por decapitación para la extracción de muestras de sangre. Las muestras de sangre fueron colectadas en tubos previamente heparinizados, colocadas rápidamente en hielo y centrifugadas a 3000 g. El plasma obtenido fue almacenado en un freezer -80 °C hasta su procesamiento. Para la preparación de las muestras de plasma se utilizaron columnas C-18 con extracción de fase en sólido (SPE) y se utilizó el siguiente protocolo:

50 µl de cocaína y cafeína deuterada (5 µg/ml) fueron agregados a 450 µl de plasma. La mezcla fue disuelta en 500 µl de metanol y centrifugada durante 2 min a 12000 g. El sobrenadante fue extraído, mezclado con 1 ml de agua milli-Q y aplicado a una columna SPE (200 mg/3 ml) a un flujo de 1 ml/min. Previo a la aplicación de la muestra la columna fue activada y acondicionada con 3 ml de metanol y 3 ml de agua milli-Q. Luego de la aplicación de la muestra la columna fue lavada con 1 ml de agua milli-Q y

secada en un manifold durante 10 min a 20 mmHg. Los analitos fueron en primera instancia eluidos con 1 ml de cloroformo y posteriormente con 2 ml de una mezcla de 90% cloroformo, 8% metanol y 2% ácido fórmico. La segunda elución fue evaporada a sequedad en un speedvac y luego reconstituida en el cloroformo de la primera elución.

Una vez procesadas las muestras de plasma, estas fueron inyectadas (1 μ l) en el GC-MS para la cuantificación de los niveles plasmáticos de cocaína y cafeína. Se utilizó un equipo GC-MS-QP 2010 Ultra (Figura 9), con inyector automático (AOC-20i. Shimadzu Corporation) y con una columna HP-5MS (30 m largo x 0.25 mm diámetro interno x 0.25 μ m de espesor de fase; Agilent J & W GC Columns). Se utilizó helio como gas carrier a un flujo de columna de 0.93 ml/min y los cromatogramas se analizaron con el software GCMSolution Versión 2.71.

La temperatura del inyector, la fuente de iones y el detector fueron mantenidas en 300 $^{\circ}$ C. Se utilizó un programa de temperatura el cual iniciaba a 90 $^{\circ}$ C (6 min), seguido de una rampa de 10 $^{\circ}$ C/min hasta alcanzar los 280 $^{\circ}$ C (4.3 min) y una segunda rampa de 30 $^{\circ}$ C/min hasta llegar a los 315 $^{\circ}$ C (12 min). El límite de detección obtenido mediante el modo SIM y *splitless* fue de 50 ng/ml.

6. ESTUDIOS NEUROQUÍMICOS

6.1. CIRUGÍA ESTEREOTÁXICA

Los animales fueron anestesiados con una mezcla de ketamina (90 mg/kg) y xilasina (5 mg/kg) administrada por vía i.p. y colocados en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments) para la implantación de cánulas de microdiálisis (BASi) de 2 mm de longitud de membrana en el NAcc *shell* (coordenadas en mm para rata: AP: +1.9; Lat: -1.0; DV: -7.6 a partir de Bregma según el atlas de Paxinos and Watson, 2005; Figura 18). Las cánulas fueron aseguradas al cráneo mediante la implantación de tres tornillos dispuestos en forma equidistante a la cánula de microdiálisis (Figura 18B) y fijadas con acrílico autocurable. Esta maniobra se utiliza para garantizar la fijación de la cánula de diálisis durante el experimento por el uso de animales despiertos. Luego de la cirugía los animales fueron colocados en la cámara de microdiálisis (Figura 18D) hasta el día del experimento y monitorizadas durante su recuperación.

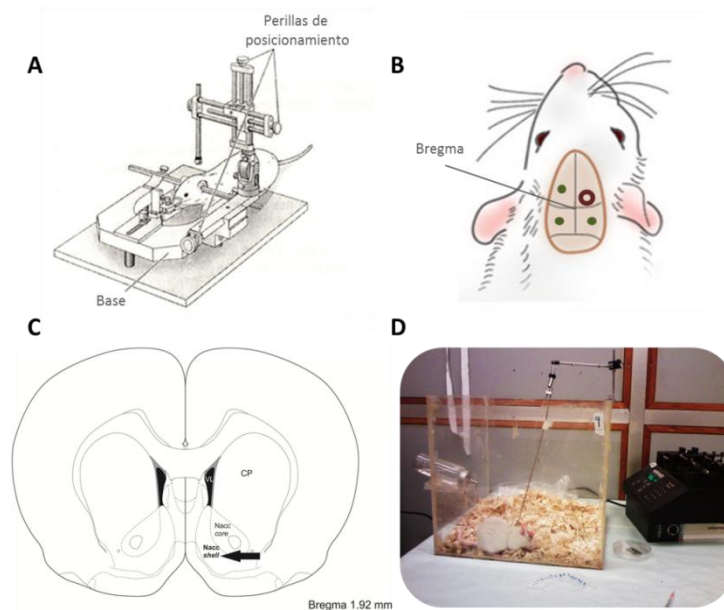


Figura 18. (A) Esquema del aparato estereotáxico. (B) Diagrama de la cirugía estereotáxica. Se muestra la localización de la cánula de diálisis en relación a Bregma y los puntos verdes indican la ubicación de los tornillos que fortalecen la fijación de la cánula al cráneo. (C) Diagrama de un corte coronal del cerebro de rata. La flecha indica la localización de la región de interés (NACC shell). 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.

6.2. MICRODIÁLISIS INTRACEREBRAL

Luego de la cirugía estereotáxica los animales permanecieron en recuperación durante 24 hs. El día del experimento la cánula de microdiálisis fue conectada a una bomba de perfusión (Harvard PHD 2000) por la cual se perfundió constantemente líquido cefalorraquídeo artificial (LCRa; NaCl 125 mM; KCl 2.5 mM; MgCl₂ 1.18 mM; CaCl₂ 1.26 mM, a un pH=6.2) a un flujo constante de 1.5 µl/min. Luego de un período de 100 min de estabilización se comenzó con la colecta de las muestras de diálisis cada 20 min (30 µl de volumen cada muestra). Luego de determinar las concentraciones basales de DA (se colectan 6 muestras basales) se expuso a los animales durante 10 min al humo de diferentes muestras de PBC y cafeína volatilizadas, y se continuó colectando las muestras de dialisis (sin desconectar al animal) durante 120 min adicionales (Figura 19). El grupo control se dejó por 10 min libre de humo en el interior de la cámara inhalatoria.

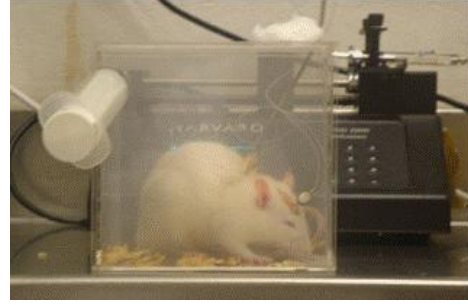
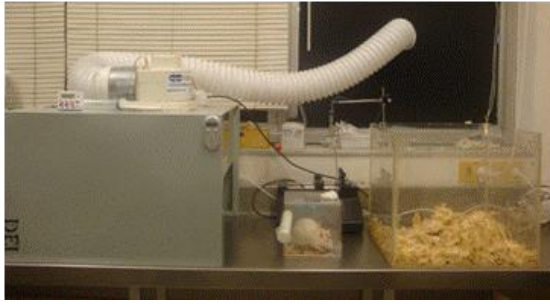


Figura 19. Cámara inhalatoria donde fueron expuestos los animales durante 10 minutos en forma aguda al humo de diferentes muestras de PBC y cafeína volatilizada. Los animales permanecieron conectados a la bomba de perfusión durante la exposición.

6.3. ANÁLISIS DE LAS MUESTRAS DE DIÁLISIS

Las muestras de diálisis fueron analizadas inmediatamente después de su colecta mediante un sistema de Cromatografía Líquida de Alta Resolución con Detección Electroquímica (HPLC-DE, Waters 2465). El HPLC estuvo equipado con una columna C-18 (3 μ ; 100Å (100*2 mm), Phenomenex Luna) y un detector electroquímico Waters 2465 con un potencial de oxidación óptimo para DA (+ 0.6 V). 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 cuantificaron los niveles de DA y su metabolito ácido dihidroxifenilacético (DOPAC). Se procesaron soluciones estándar diariamente para comprobar el estado del equipo y la correcta detección y cuantificación de las moléculas de interés.

6.4. LOCALIZACIÓN DE LAS CÁNULAS DE DIÁLISIS

Luego de finalizado cada experimento de microdiálisis, los animales fueron anestesiados y sacrificados por dislocación cervical. Los cerebros fueron disecados y congelados a -20 °C y posteriormente seccionado en cortes coronales mediante el uso de un criostato para determinar la localización de la cánula de microdiálisis. Aquellos animales con cánulas localizadas fuera de la región de interés fueron descartados.

7. ANÁLISIS DEL HUMO DE PBC Y CAFEÍNA

Se llevo a cabo el análisis cualitativo de los compuestos presentes en el humo de las diferentes muestras de PBC utilizadas y de cafeína. La identificación de los compuestos

se realizó mediante la técnica de GC-MS, utilizando el método TIC y *split* (1/25). La volatilización de las muestras se realizó de la misma forma que en los experimentos comportamentales (ver punto 4.3. -Materiales y Métodos-). Una vez volatilizadas las muestras, estas fueron colectadas en una jeringa Hamilton (250 μ l; Sigma Aldrich) e inmediatamente se inyectó 50 μ l del humo en el GC-MS. El programa de temperatura inició a 90°C (3 min), seguido por una rampa de 10°C/min hasta alcanzar los 300°C (5 min).

8. ANÁLISIS DE DATOS

Los datos fueron expresados como la Media \pm Error Estándar de la media (EEM). Los datos comportamentales fueron analizados utilizando el *test t de Student* o mediante el análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido del test de comparación múltiple de Newman-Keuls. Estos datos fueron analizados y graficados utilizando el programa GraphPad Prism 5.01. Los datos de microdiálisis intracerebral fueron analizados utilizando ANOVA de dos vías (muestras y tratamiento) para medidas repetidas, seguido de Newman-Keuls *post hoc test*. 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

1. ANÁLISIS QUÍMICO DE MUESTRAS DE PBC INCAUTADAS EN URUGUAY ENTRE LOS AÑOS 2007-2014

Se realizó la identificación y cuantificación de los componentes presentes en 27 muestras de PBC incautadas mediante las técnicas de GC-MS y HPLC-DAD. El resultado del análisis químico se incluye en la Tabla 3.

MUESTRAS	FECHA DE INCAUTACIÓN	COCAÍNA BASE (%)	CAFEÍNA (%)	FENACETINA (%)	AMINOPIRINA	TRANS Y CIS CINNAMOILCOCAÍNA
PBC 1	2007	68.9 ± 3.6	15.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	-	√
PBC 2	2007	67.4 ± 1.2	14.0 ± 0.2	0.0 ± 0.0	-	√
PBC 3	2008	59.3 ± 0.6	14.0 ± 0.1	0.0 ± 0.0	-	√
PBC 4	2008	59.9 ± 4.5	14.0 ± 0.5	0.0 ± 0.0	-	√
PBC 5	2009	68.2 ± 2.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.5	-	√
PBC 6	2009	50.2 ± 1.0	0.0 ± 0.0	0.5 ± 0.5	-	√
PBC 7	2009	20.7 ± 0.2	10.3 ± 0.5	0.0 ± 0.0	√	√
PBC 8	2010	64.6 ± 0.0	19 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	√
PBC 9	2010	48.4 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	√
PBC 10	2010	55.3 ± 0.0	15 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	√
PBC 11	2011	64.1 ± 0.0	22.4 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	√
PBC 12	2011	57.9 ± 0.0	21.3 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	√
PBC 13	2011	37.1 ± 0.0	41.9 ± 0.0	0.0 ± 0.0	-	√
PBC 14	2011	61.9 ± 0.0	9.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	√	√
PBC 15	2011	13.5 ± 0.0	21.1 ± 0.0	0.0 ± 0.0	√	√
PBC 16	2013	26.6 ± 0.0	18.8 ± 0.0	3.0 ± 0.0	√	√
PBC 17	2014	34.6 ± 0.0	26.5 ± 0.0	28.0 ± 0.0	-	√
PBC 18	2014	18.7 ± 0.0	0.0 ± 0.0	78.0 ± 0.0	-	√
PBC 19	2014	23.5 ± 0.0	47.3 ± 0.0	25.0 ± 0.0	-	√
PBC 20	2014	36.7 ± 0.0	35.6 ± 0.0	36.0 ± 0.0	-	√
PBC 21	2014	64.9 ± 0.0	0.0 ± 0.0	35.0 ± 0.0	-	√
PBC 22	2014	22.1 ± 0.0	39.4 ± 0.0	22.5 ± 0.0	-	√
PBC 23	2014	26.0 ± 0.0	18.1 ± 0.0	27.2 ± 0.0	√	√
PBC 24	2014	37.6 ± 0.0	7.5 ± 0.0	39.3 ± 0.0	-	√
PBC 25	2014	8.0 ± 0.0	48.2 ± 0.0	26.2 ± 0.0	-	√
PBC 26	2014	32.5 ± 0.0	0.2 ± 0.0	46.3 ± 0.0	-	√
PBC 27	2014	29.4 ± 0.0	27.9 ± 0.0	19.2 ± 0.0	√	√

Tabla 3. Análisis cualitativo y cuantitativo de los principales componentes de las muestras de PBC realizado por GC-MS y HPLC-DAD, respectivamente. Los datos están expresados como Medias ± EEM. La cuantificación de cocaína, cafeína y fenacetina se realizó tomando como referencia soluciones estándares de cada una de las sustancias.

El análisis cualitativo demostró que el 100 % de las muestras analizadas contienen cocaína (base) y que el 88.9 % de las muestras se encuentran adulteradas. De los adulterantes más conocidos (Cole y cols. 2011), los más frecuentemente encontrados fueron cafeína y fenacetina. De las muestras adulteradas, el 50 % presentó cafeína y el 12.5 % fenacetina (analgésico, antipirético), mientras que el restante 37.5 % se encontró adulterado con ambos compuestos (Figura 20). En el análisis realizado también se observó la presencia de aminopirina (analgésico, antipirético) en el 22 % de las muestras, mientras que ningún otro adulterante de los frecuentemente reportados en drogas de abuso (levamisol, lidocaína, procaína, etc.) fue detectado (Cole y cols. 2011). A su vez, en todas las muestras se determinó la presencia de trans y cis-cinnamoilcocaína.

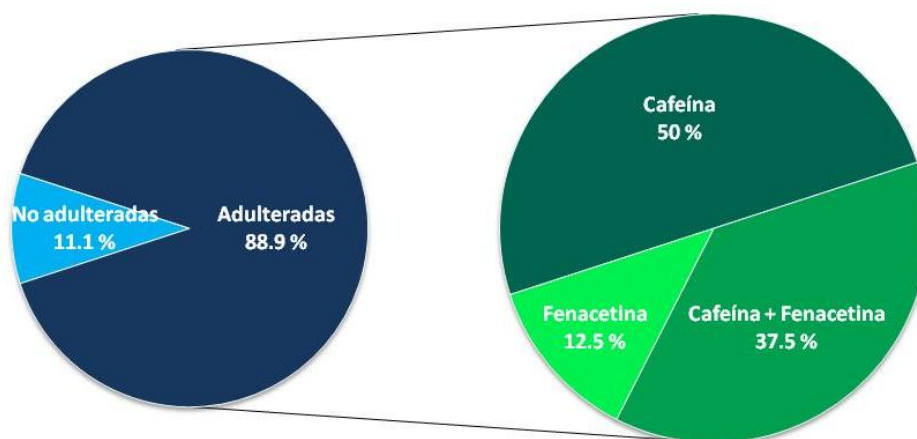


Figura 20. Porcentaje de muestras adulteradas y no adulteradas. De las adulteradas, se muestra el porcentaje de aparición de cafeína, fenacetina y ambas sustancias combinadas.

El análisis cuantitativo demostró que tanto cocaína, cafeína como fenacetina aparecen en un rango muy amplio de concentraciones. Los valores de cocaína en las muestras de PBC varían entre 10 y 70 %, mientras que cafeína y fenacetina varían entre 0-50 % y 0-80 %, respectivamente. Los valores más comúnmente encontrados en las muestras de PBC corresponden a 60 % de cocaína, 20 % de cafeína y 30 % de fenacetina (Figura 21). Tanto la aminopirina como la trans y cis-cinnamoilcocaína presentes en las muestras de PBC se encontraron en muy bajas concentraciones.

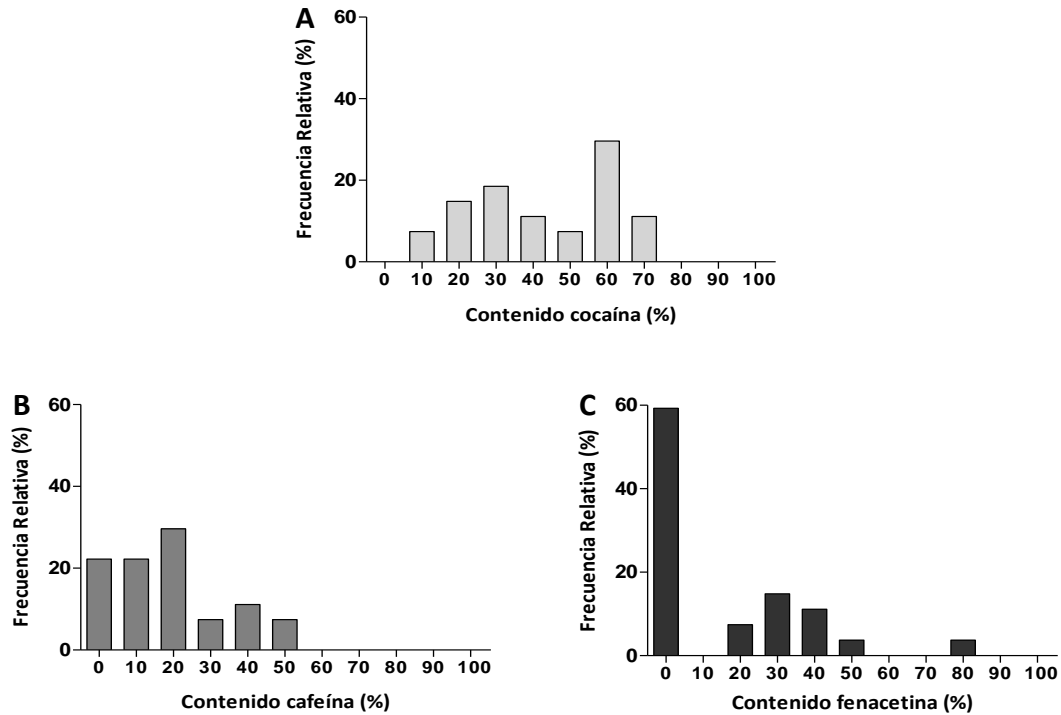


Figura 21. Relación entre el contenido y la frecuencia relativa de cocaína (A), cafeína (B) y fenacetina (C) en 27 muestras de PBC analizadas.

Por otro lado, los datos demostraron que la concentración de cocaína en las muestras de PBC va disminuyendo a lo largo de los años. En el 2007 el contenido promedio en cocaína fue de 68 %, mientras que en el 2014 fue de un 30 % (Tabla 3, Figura 22A), indicando una disminución en el grado de pureza de las muestras de PBC. Similarmente, cafeína parece haber disminuido en el correr de los años, aunque no ha cambiado sustancialmente su frecuencia de aparición (Tabla 3, Figura 22B). Continúa siendo el adulterante más frecuentemente encontrado en muestras de PBC. En contraposición, un hallazgo interesante fue que fenacetina aparece recién en muestras incautadas en el año 2013 (Tabla 3, Figura 22C).

Este trabajo se centra específicamente en el estudio del papel de la cafeína en el efecto farmacológico de la PBC, dejando abierta la necesidad de estudiar la acción central de la fenacetina, su combinación con cocaína y con cafeína. Hasta nuestro conocimiento, no existen datos clínicos o pre-clínicos que expliquen el uso de fenacetina como adulterante ni que reporten su acción central consumida bajo la vía de administración de la inhalación pulmonar.

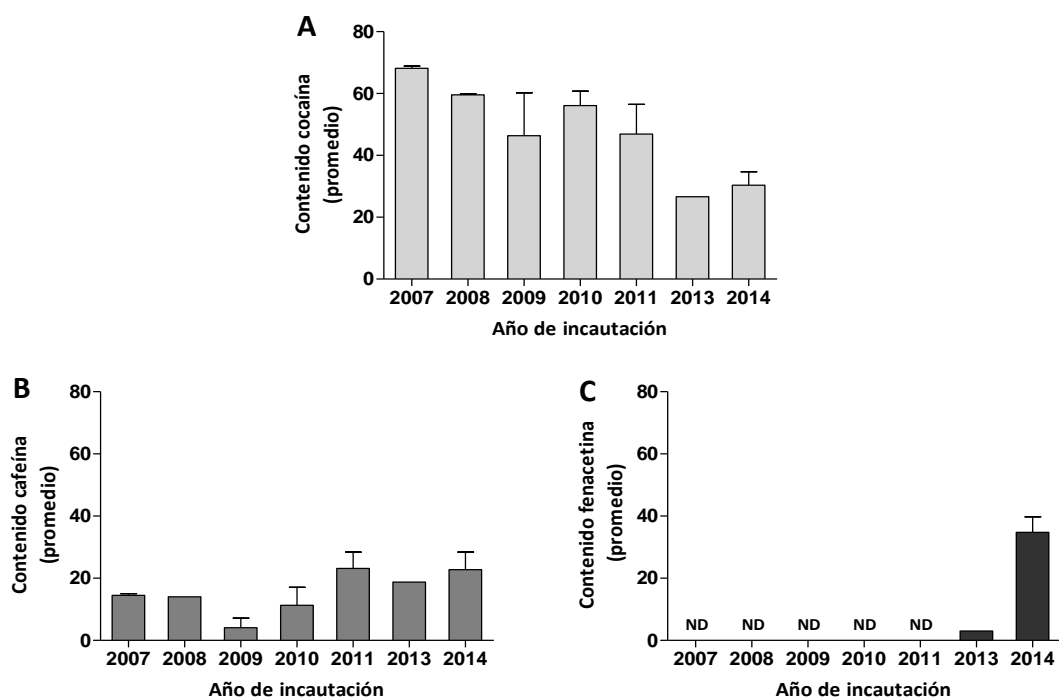


Figura 22. Variación del contenido de cocaína **(A)**, cafeína **(B)** y fenacetina **(C)** en muestras de PBC incautadas entre 2007 y 2014. ND: no detectado.

2. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR PBC Y CAFEÍNA VOLATILIZADA

2.1. EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR LA VOLATILIZACIÓN DE MUESTRAS DE PBC CON DIFERENTE CONTENIDO EN COCAÍNA Y CAFEÍNA

Con el fin de evaluar el efecto estimulante inducido por PBC volatilizada se seleccionaron 6 muestras en base a su contenido en cocaína base y cafeína (Tabla 4). Esto dio lugar a 3 grupos experimentales con diferente composición:

- Alto contenido en cocaína y alto en cafeína (PBC 2 y 4).
- Alto contenido en cocaína y sin cafeína (PBC 5 y 9).
- Bajo contenido en cocaína y alto en cafeína (PBC 13 y 15).

MUESTRAS	COCAÍNA BASE (%)	CAFEÍNA (%)	DOSIS COCAÍNA (MG)
PBC 2	67.4 ± 1.2	14.0 ± 0.2	50.0
PBC 4	59.9 ± 4.5	14.0 ± 0.5	50.0
PBC 5	68.2 ± 2.0	0.0 ± 0.0	50.0
PBC 9	48.4 ± 0.0	0.0 ± 0.0	50.0
PBC 13	37.1 ± 0.0	41.9 ± 0.0	50.0
PBC 15	13.5 ± 0.0	21.1 ± 0.0	25.0

Tabla 4. Muestras de PBC seleccionadas para los experimentos comportamentales.

Para la realización de estos experimentos todas las muestras de PBC fueron administradas a cantidades equivalentes de 50 mg de cocaína base, permitiéndonos así poder comparar el efecto producido entre las diferentes muestras. Cabe señalar que por la baja composición en cocaína presente en la PBC 15, la misma debió ser administrada en una cantidad equivalente de 25 mg de cocaína base, a diferencia de las otras muestras. Igualar el contenido de cocaína base a 50 mg en esta muestra implicaba aumentar significativamente el volumen de la misma, hecho que trajo aparejado dificultades en su volatilización.

2.1.1. EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR PBC CON ALTO CONTENIDIO EN COCAÍNA Y CAFEÍNA

En la Figura 23 se puede observar el efecto de las PBC con alto contenido en cocaína y cafeína (PBC 2 y 4) sobre la actividad locomotora y exploratoria de animales tratados. El análisis estadístico reveló que tanto la administración de PBC 2 como de PBC 4 volatilizada aumento significativamente la actividad locomotora y la velocidad de movimiento de los animales en comparación con el grupo control ($p < 0.001$ en ambos casos). Por otra parte, únicamente se observó una diferencia significativa en el número de *rearings* con respecto a los controles en aquellos animales tratados con PBC 2 ($p < 0.001$).

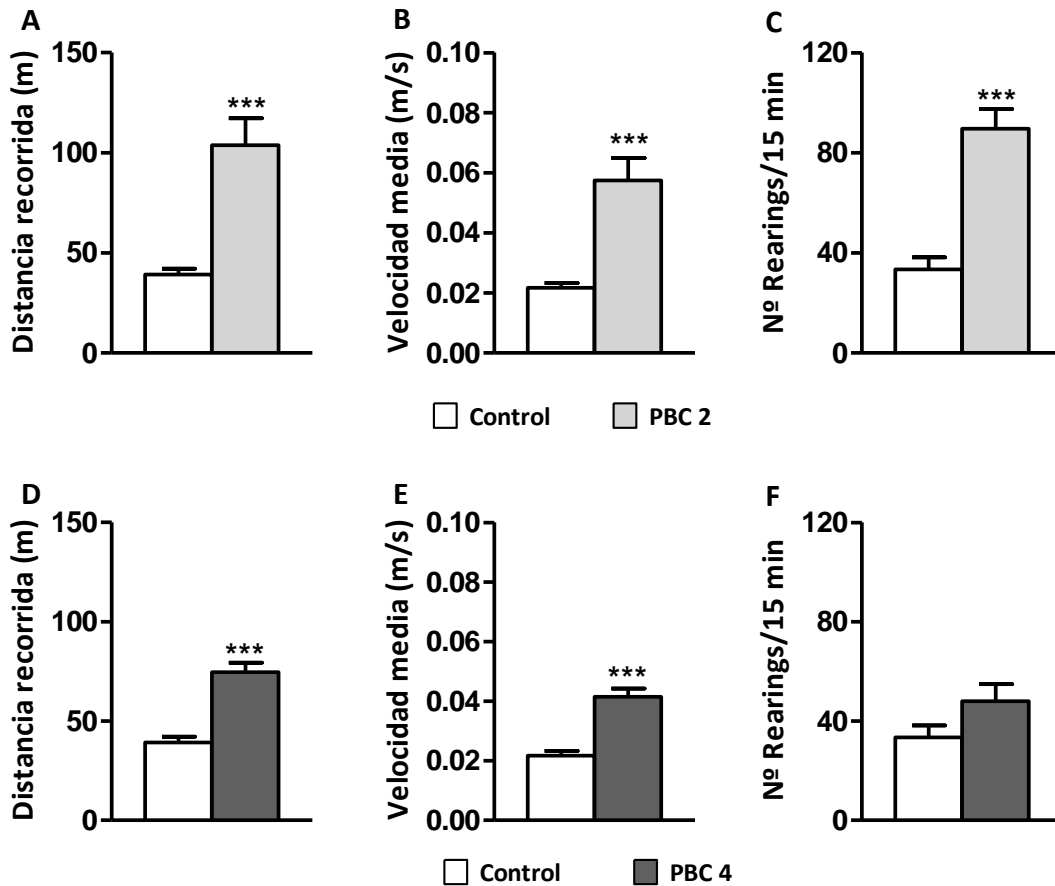


Figura 23. Efecto de PBC 2 (A, B, C) y 4 (D, E, F) volatilizada sobre la distancia recorrida (m), velocidad de movimiento (m/s) y número de *rearings* de animales tratados. Cada parámetro fue evaluado inmediatamente después de la volatilización (10 minutos de exposición). Media ± EEM. Student *t*-Test. * = vs control. *** = $p < 0.001$. N=6-7.

2.1.2. EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR PBC CON ALTO CONTENIDO EN COCAÍNA Y SIN CAFEÍNA

La Figura 24 muestra el efecto de las PBC con bajo contenido en cocaína y sin cafeína (PBC 5 y 9). Como se observa en la Figura 24A-C, no hubo diferencias significativas ni en la distancia recorrida ($p=0.051$) ni en el número de *rearings* ($p=0.087$) entre el grupo tratado con PBC 5 y el grupo control, mientras que la velocidad de movimiento aumentó significativamente ($p < 0.05$), aunque dicho aumento fue levemente superior al grupo control. Por otra parte, la PBC 9 (Figura 24D-F) fue capaz de generar un efecto estimulante, produciendo un aumento tanto en la distancia recorrida, velocidad de movimiento y número de *rearings* significativamente superior al mostrado por el grupo control ($p < 0.001$).

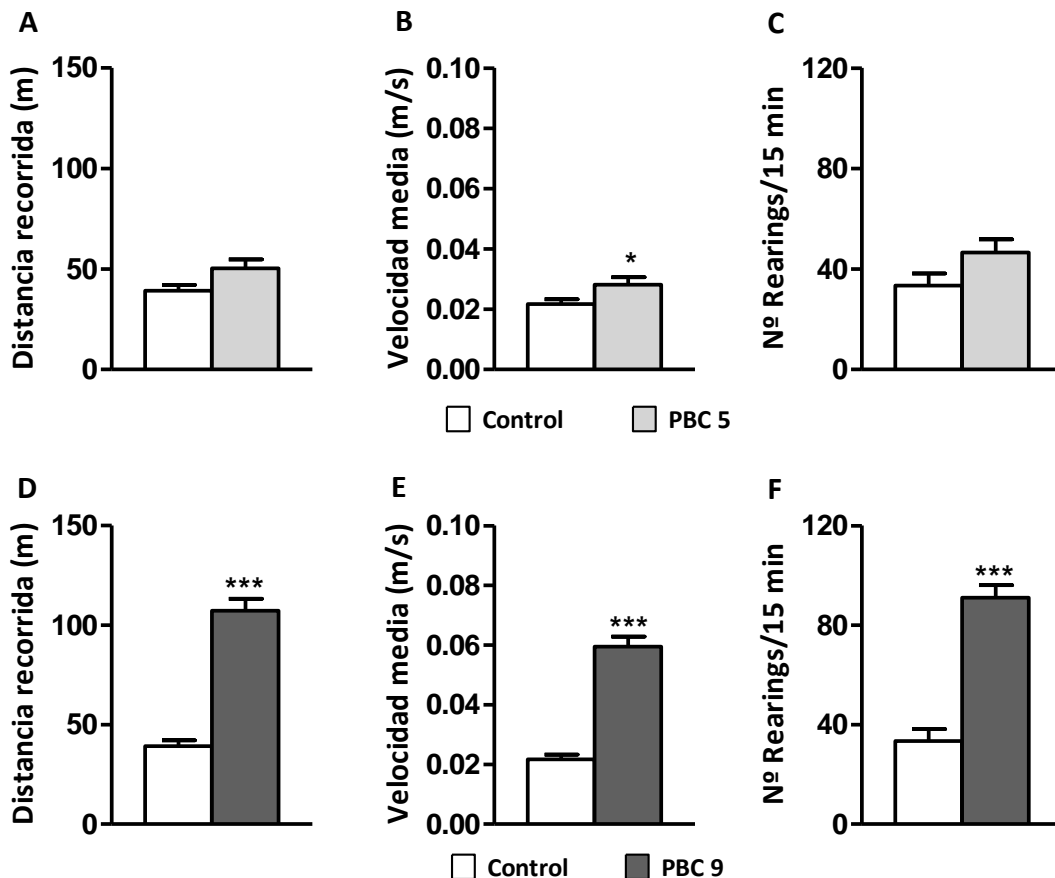


Figura 24. Efecto de PBC 5 (A, B, C) y 9 (D, E, F) volatilizada sobre la distancia recorrida (m), velocidad de movimiento (m/s) y número de rearings de animales tratados. Cada parámetro fue evaluado inmediatamente después de la volatilización (10 minutos de exposición). Media \pm EEM. Student t-Test. * = vs control. * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$. N=6-7.

2.1.3. EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR PBC CON BAJO CONTENIDO EN COCAÍNA Y ALTO CAFÉINA

En la Figura 25 se observa el efecto producido por muestras de PBC con bajo contenido en cocaína y alto en cafeína. Tanto la PBC 13 como la 15 produjeron un efecto estimulante, produciendo un aumento en la distancia recorrida, velocidad de movimiento y número de *rearings* significativamente superior al observado en el grupo control ($p < 0.01$ y $p < 0.05$, respectivamente). Cabe recordar que la PBC 15 fue administrada a dosis equivalentes de 25 mg de cocaína base, la mitad a la cual fueron administradas las otras PBC.

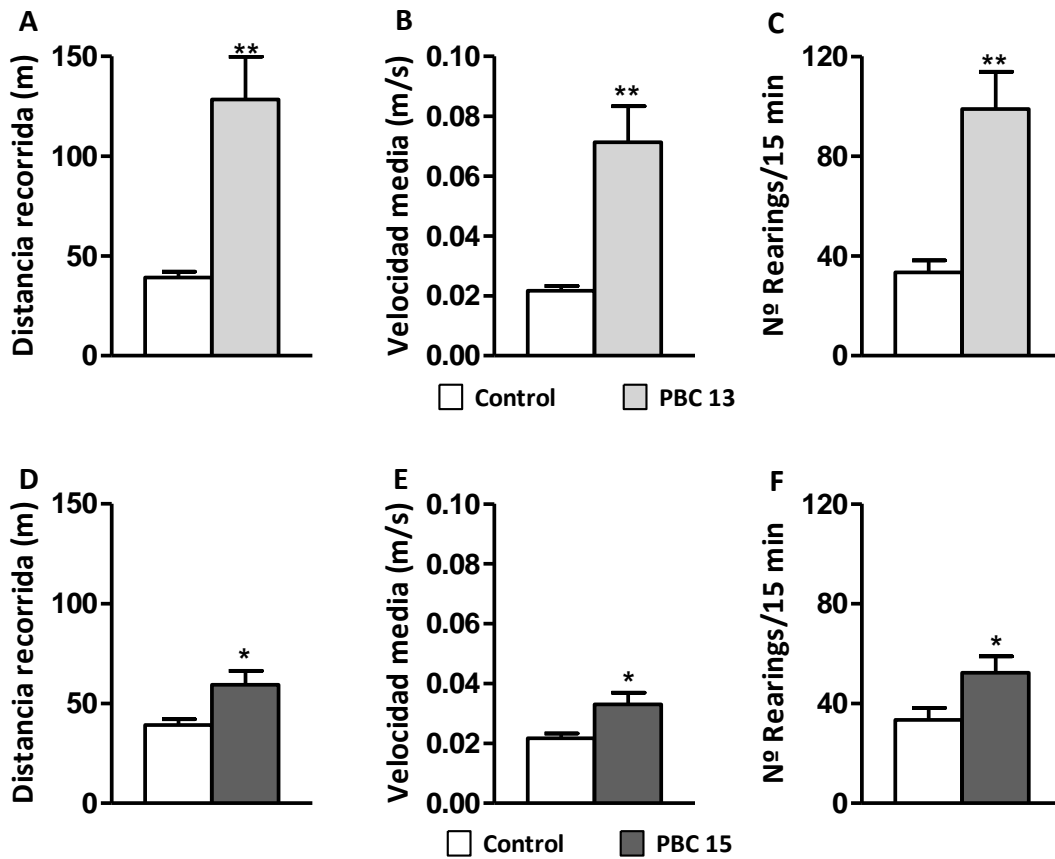


Figura 25. Efecto de PBC 13 (A, B, C) y 15 (D, E, F) volatilizada sobre la distancia recorrida (m), velocidad de movimiento (m/s) y número de *rearings* de animales tratados. Cada parámetro fue evaluado inmediatamente después de la volatilización (10 minutos de exposición). Media \pm EEM. Student *t*-Test. * = vs control. * = $p < 0.05$; ** = $p < 0.01$. N=6-7.

2.1.4. NIVELES PLASMÁTICOS DE COCAÍNA Y CAFEÍNA EN ANIMALES TRATADOS CON PBC VOLATILIZADA

En la Tabla 5 se observan los valores plasmáticos de cocaína y cafeína de aquellos animales tratados con las muestras de PBC volatilizada. Como se puede observar, los valores de cocaína plasmática variaron desde 12.45 a 291.61 ng/ml en los diferentes grupos experimentales, siendo la PBC 15 y 9 las que mostraron los valores más bajos y más altos respectivamente. A su vez, con excepción de los grupos experimentales tratados con PBC 5 y 9, las cuales no contenían cafeína, todos presentaron valores de cafeína en plasma. El rango de valores de cafeína fue desde 694 a 5403 ng/ml, siendo la PBC 13 la que mostro los valores más altos. Los valores de cafeína en plasma son acordes al contenido químico de las muestras, ya que las PBC 13 y 15, que mostraron los valores más altos, son las muestras que contenían mayores niveles de cafeína en su composición (PBC con bajo contenido en cocaína y alto en cafeína). Estos resultados

validan aún más el modelo experimental utilizado, confirmando que los efectos estimulantes previamente observados son producto de las acciones de cocaína y cafeína.

MUESTRAS	COCAÍNA BASE (NG/ML)	CAFEÍNA (NG/ML)
PBC 2	144.57 ± 15.66	694.95 ± 88.47
PBC 4	188.49 ± 29.03	1549.50 ± 140.85
PBC 5	12.45 ± 2.64	0.00 ± 0.00
PBC 9	291.61 ± 62.53	0.00 ± 0.00
PBC 13	192.30 ± 44.19	5403.34 ± 988.07
PBC 15	26.72 ± 3.76	3480.96 ± 996.04

Tabla 5. Niveles plasmáticos de cocaína y cafeína en animales tratados con PBC volatilizada. Media ± EEM. N=5-7.

2.2. EFECTO ESTIMULANTE INDUCIDO POR CAFEÍNA VOLATILIZADA

Con el fin de evaluar si la cafeína volatilizada era capaz de generar un efecto estimulante *per se*, se realizó una curva dosis-respuesta con diferentes cantidades de cafeína. Se analizó, como parámetro del efecto estimulante, la distancia recorrida, la velocidad de movimiento y el número de *rearings*. La Figura 26 muestra el efecto comportamental producido por cafeína, donde la dosis de 50 mg fue la que produjo el mayor efecto estimulante. Cafeína 50 mg indujo un aumento significativo en la distancia recorrida y la velocidad de movimiento tanto en relación con el grupo control ($p < 0.001$) como con los tratados con cafeína 10.5 y 25 mg ($p < 0.01$). En cuanto a los *rearings*, también se observó un aumento significativo en aquellos tratados con cafeína 50 mg, siendo esta significativamente superior al mostrado por los controles ($p < 0.05$) y los tratados con cafeína 25 mg ($p < 0.05$). Los animales tratados con cafeína 10.5 y 25 mg mostraron un aumento en los parámetros analizados con respecto a los controles, aunque este no llegó a ser significativo.

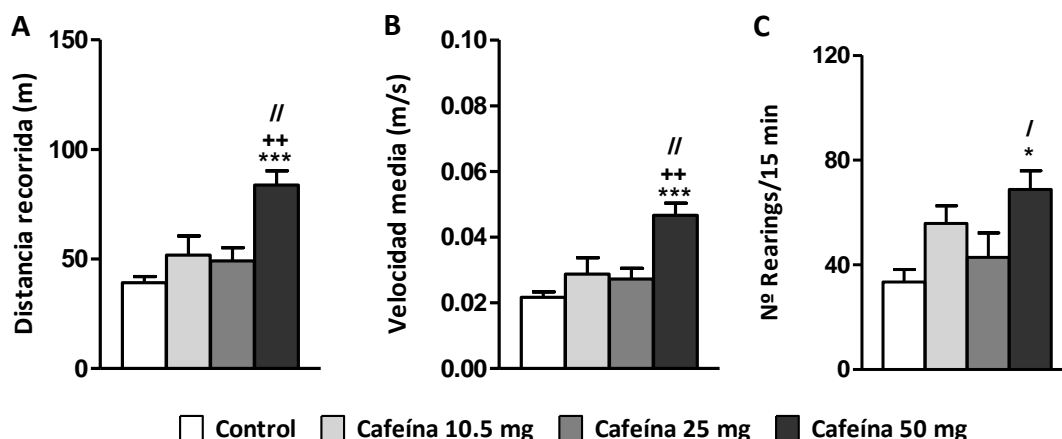


Figura 26. Efecto de cafeína volatilizada (10.5, 25 y 50 mg) sobre la distancia recorrida (m), velocidad de movimiento (m/s) y número de *rearings* de animales tratados. Cada parámetro fue evaluado inmediatamente después de la volatilización (10 minutos de exposición). Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = vs control; + = vs cafeína 10.5 mg; / = vs cafeína 25 mg. *, / = $p < 0.05$; **, // = $p < 0.01$; ***, /// = $p < 0.001$. N=5-7.

Por otra parte, se llevo a cabo el análisis de los niveles plasmáticos de cafeína en aquellos animales tratados con cafeína volatilizada mediante la técnica de GC-MS (Tabla 6). Como se puede observar, todos los animales mostraron niveles plasmáticos de cafeína, observándose una relación directa entre la cantidad de cafeína administrada y los niveles plasmáticos observados.

MUESTRAS	CAFEÍNA (NG/ML)
CAFEÍNA 10.5 MG	1551.62 \pm 284.74
CAFEÍNA 25.0 MG	5507.66 \pm 478.45
CAFEÍNA 50.0 MG	15546.24 \pm 2564.54

Tabla 6. Niveles plasmáticos de cafeína en animales tratados con cafeína volatilizada. Media \pm EEM. N=6-7.

La correlación entre los niveles plasmáticos de cafeína y la distancia recorrida por los animales tratados se muestra en la Figura 27. Como se puede observar existe un efecto dosis dependiente, siendo los niveles plasmáticos de cafeína directamente proporcionales al efecto estimulante producido por las diferentes dosis de cafeína volatilizada ($r^2 = 0.98$). Estos resultados confirman el rol de la cafeína en el efecto estimulante previamente observado y demuestran su rol activo al ser utilizada como adulterante en una droga de abuso psicoestimulante.

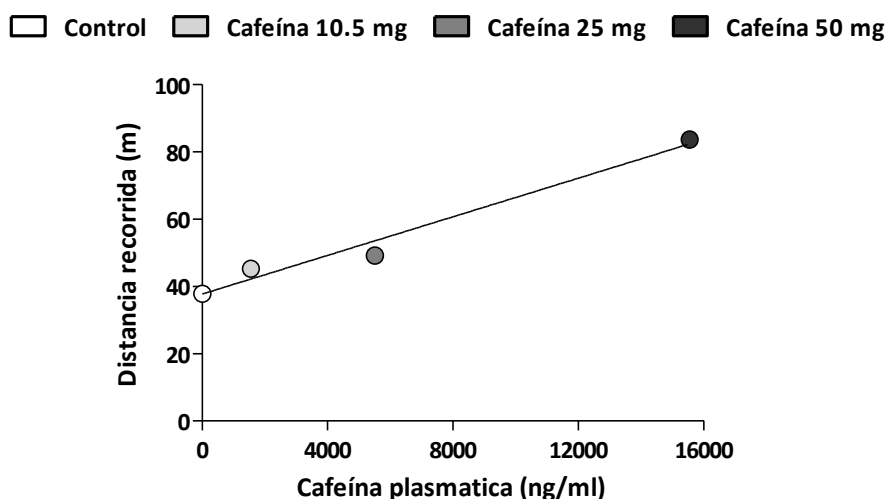


Figura 27. Relación entre la distancia recorrida y los niveles plasmáticos de cafeína de aquellos animales tratados con cafeína volatilizada.

2.3. INFLUENCIA DE LA CAFEÍNA EN EL EFECTO ESTIMULANTE DE PBC VOLATILIZADA

Con el fin de avanzar en el estudio de la participación de la cafeína en el efecto estimulante de la PBC, se evaluó la respuesta comportamental de animales tratados con la PBC 5 (muestra sin cafeína y sin acción estimulante) enriquecida con cantidades conocidas de cafeína (PBC5 + cafeína 10.5 mg y PBC5 + cafeína 25 mg).

En la Figura 28 se muestra la distancia recorrida, la velocidad de movimiento y el número de *rearings* de animales tratados con PBC y las diferentes combinaciones con cafeína. Aquellos animales tratados con PBC 5 + cafeína 25 mg mostraron un aumento tanto en la distancia recorrida como en la velocidad de movimiento significativamente superior a los controles ($p < 0.01$) y a aquellos tratados con PBC 5 y PBC + cafeína 10.5 mg ($p < 0.05$), evidenciándose la aparición de una respuesta comportamental estimulante. Por otra parte, a pesar de observarse un aumento en el número de *rearings* de aquellos animales tratados con las combinaciones de PBC y cafeína, estas no llegaron a ser significativamente diferentes.

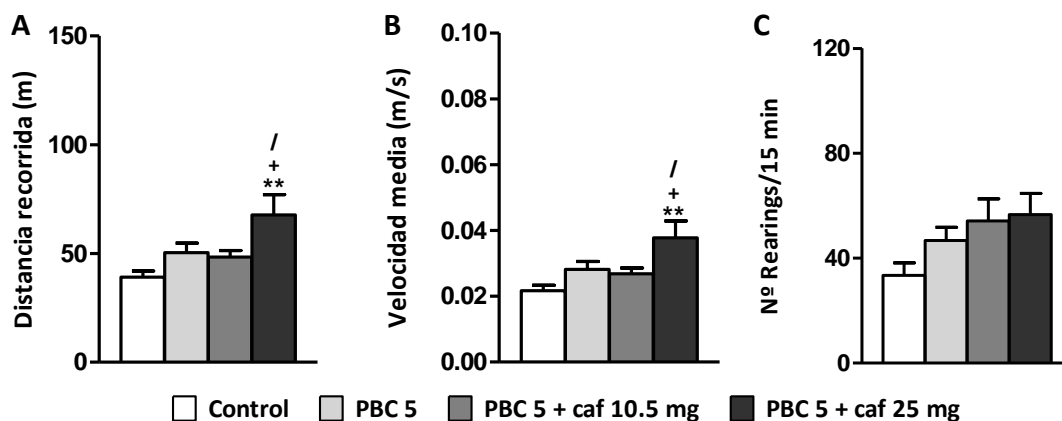


Figura 28. Efecto de PBC 5, PBC 5 + cafeína 10.5 mg y PBC 5 + cafeína 25 mg volatilizada sobre la distancia recorrida (m), velocidad de movimiento (m/s) y número de *rearings* de animales tratados. Cada parámetro fue evaluado inmediatamente después de la volatilización (10 minutos de exposición). Media \pm EEM. ANOVA de una vía, seguido de Newman-Keuls. * = vs control; + = vs PBC 5; / = vs PBC 5 + cafeína 10.5 mg. ** = $p < 0.01$; +, / = $p < 0.05$. N=5-7.

En base a estos resultados, pudimos observar que a pesar de que 25 mg de cafeína puso en evidencia el efecto estimulante producido por PBC 5, 10.5 mg de cafeína no lo hizo, aún cuando ésta es la cantidad de cafeína presente en los animales tratados con PBC 2 (ambas muestras comparten el mismo contenido de cocaína; ver Figura 23). Esto demuestra que, además además de la cantidad de cocaína y de cafeína, existen otras variables, que podrían explicar las diferencias observadas en el efecto estimulante producido por las diferentes muestras de PBC.

Por otra parte, se llevo a cabo el análisis de los niveles plasmáticos de cocaína y cafeína en aquellos animales tratados con las combinaciones de PBC 5 y cafeína 10.5 y 25 mg volatilizada (Tabla 7). Ambos grupos experimentales tratados con la combinación de las drogas mostraron niveles plasmáticos tanto de cocaína como de cafeína, siendo mayores los niveles de cafeína en el grupo tratado con PBC y cafeína 25 mg. Estos resultados confirman que el aumento locomotor observado en los animales co-tratados con PBC 5 y cafeína 25 mg en relación a los tratados únicamente con PBC 5, fue producto de la potenciación producida por cafeína.

MUESTRAS	COCAÍNA BASE (NG/ML)	CAFEÍNA (NG/ML)
PBC 5	12.45 ± 2.64	0.00 ± 0.00
PBC 5 + CAFEÍNA 10.5 MG	42.08 ± 11.44	1867.99 ± 180.18
PBC 5 + CAFEÍNA 25.0 MG	14.19 ± 4.06	2250.93 ± 578.02

Tabla 7. Niveles plasmáticos de cocaína y cafeína en animales tratados con la combinación de PBC 5 y cafeína 10.5 y 25 mg. Media ± EEM. N=5-7.

3. CARACTERIZACIÓN DEL EFECTO NEUROQUÍMICO INDUCIDO POR PBC Y CAFEÍNA VOLATILIZADA

Interesados en el correlato neuroquímico del efecto estimulante descrito previamente, en esta serie de experimentos se evaluó los niveles extracelulares de DA y DOPAC en el NAcc *shell* luego de la exposición a PBC y cafeína volatilizada. Los experimentos se realizaron mediante la técnica de microdiálisis intracerebral *in vivo*, y solo aquellos animales que presentaron una correcta localización anatómica de la cánula fueron incluidos en los grupos experimentales.

3.1. EFECTO NEUROQUÍMICO INDUCIDO POR PBC VOLATILIZADA E INFLUENCIA DE LA CAFEÍNA

En la primera serie de experimentos se analizó el efecto neuroquímico producido por dos muestras de PBC con diferentes contenidos en cocaína y cafeína. Para ello se selecciono la PBC 2 con un alto contenido en cafeína y la PBC 6 sin cafeína (Tabla 8). Cabe resaltar que a diferencia de la PBC 2, que se utilizo también en los experimentos comportamentales, la PBC 6 fue utilizada únicamente en esta serie de experimentos. Esto se debió a que dentro de las muestras incautadas que teníamos, ninguna de las muestras sin cafeína tenía el volumen suficiente como para poder ser utilizada en ambos experimentos.

MUESTRAS	COCAÍNA BASE (%)	CAFEÍNA (%)
PBC 2	67.4 ± 1.2	14.0 ± 0.2
PBC 6	50.2 ± 1.0	0.0 ± 0.0

Tabla 8. Muestras de PBC seleccionadas para los experimentos neuroquímicos.

La Figura 29 muestra los niveles extracelulares de DA y DOPAC en aquellos animales tratados con una PBC sin cafeína. Como se puede observar, la PBC 6 indujo un aumento significativo en la liberación de DA en comparación con los animales

controles ($p < 0.05$), los cuales tuvieron niveles de DA estables a lo largo de toda la sesión experimental (Figura 29A). El efecto de la PBC 6 se produjo inmediatamente luego de la exposición, logrando un aumento del 40 %, el cual perduró durante 20 minutos (muestras 5-6) y luego disminuyó rápidamente a los valores basales (muestra 7). En cuanto a los niveles de DOPAC (Figura 29B), los animales tratados con PBC 6 mostraron una rápida y corta disminución (muestra 5), la cual fue significativamente superior a la mostrada por los controles ($p < 0.05$).

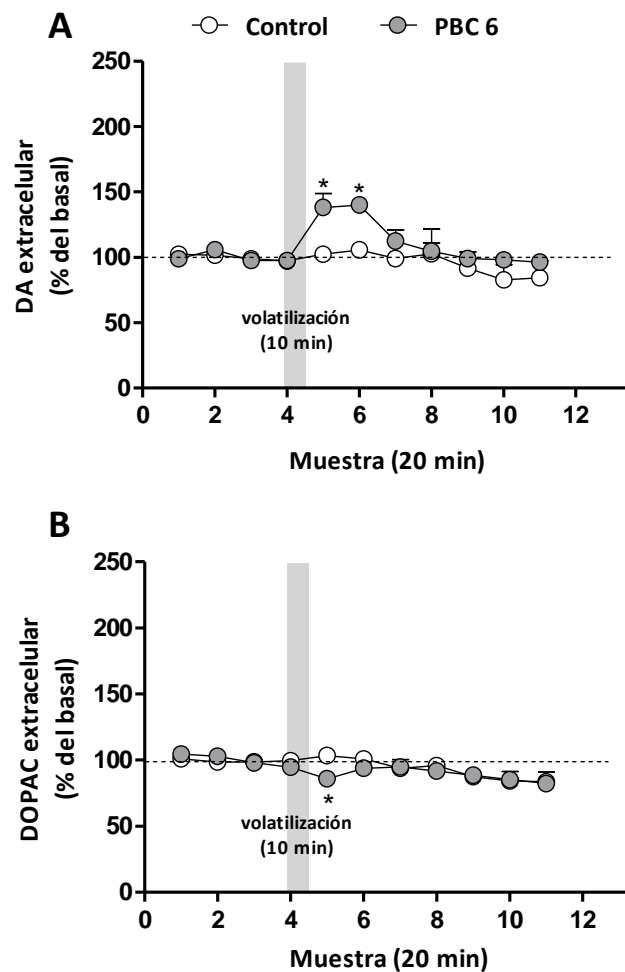


Figura 29. Efecto de PBC 6 volatilizada sobre los niveles extracelulares de DA y DOPAC en el NAcc *shell*. La barra gris indica el período de exposición a la droga volatilizada (10 minutos). Media \pm EEM. ANOVA de dos vías, seguido de Newman-Keuls. * = vs control. * = $p < 0.05$. N= 5.

También se evaluó el efecto neuroquímico sobre los niveles extracelulares de DA y DOPAC producido por una PBC adulterada con cafeína (Figura 30). La PBC 2 produjo un gran y rápido aumento en los niveles extracelulares de DA, alcanzando valores de

hasta 325 %. Al igual que con la PBC 6, se observó un aumento significativo inmediatamente luego de la exposición a PBC 2 ($p < 0.001$) el cual también duró 20 minutos (muestras 5-6). Por otra parte, a diferencia de lo observado luego de la exposición a la PBC 6, la PBC 2 mostró una caída más lenta en los niveles de DA, llegando recién a los valores basales en la muestra 9 (Figura 30A). Los animales tratados con PBC 2 también mostraron diferencias significativas con los controles en los niveles extracelulares de DOPAC (Figura 30B). Inmediatamente después de la exposición a la droga se observó una disminución de los valores de DOPAC significativamente superior a la mostrada por los controles ($p < 0.05$), la cual continuó disminuyendo durante los siguientes 40 minutos (muestras 6-7, $p < 0.001$).

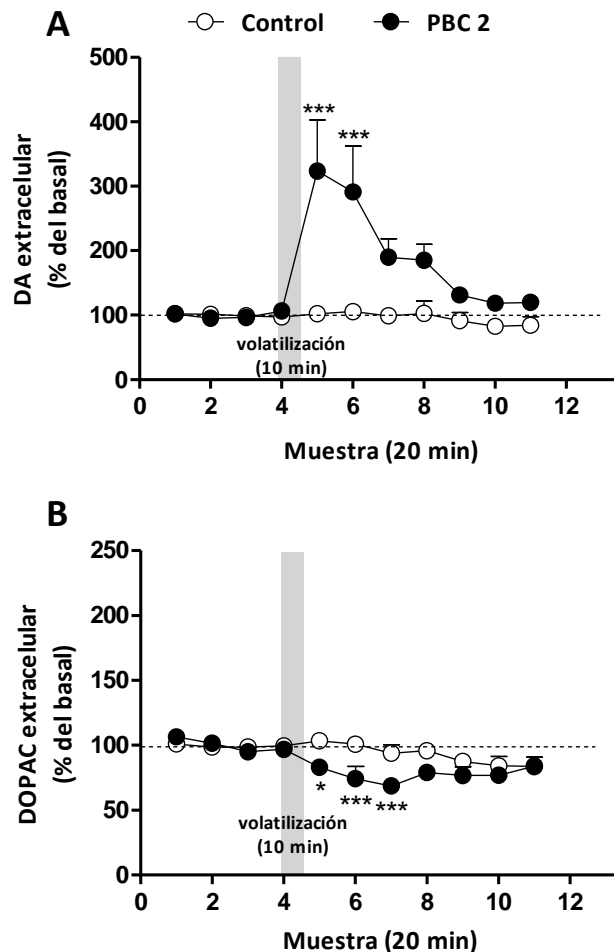


Figura 30. Efecto de PBC 2 volatilizada sobre los niveles extracelulares de DA y DOPAC en el NAcc *shell*. La barra gris indica el período de exposición a la droga volatilizada (10 minutos). Media \pm EEM. ANOVA de dos vías, seguido de Newman-Keuls. * = vs control. * = $p < 0.05$; *** = $p < 0.001$. N= 5.

En la Figura 31 se muestra una comparación entre los niveles extracelulares de DA luego de la exposición a las dos muestras de PBC utilizadas. Como se puede observar, aquellos animales tratados con PBC 2 mostraron niveles significativamente mayores a los mostrados por PBC 6 durante los primeros 40 minutos ($p < 0.001$), además de mostrar un decaimiento más lento luego del efecto neuroquímico observado. Estas diferencia en el efecto producido por ambas drogas podría estar explicado en parte por la presencia de cafeína en la PBC 2, la cual no solo es capaz de potenciar el efecto producido por PBC sino que también se ha demostrado que facilita la volatilización de las drogas (Cole y cols. 2011).

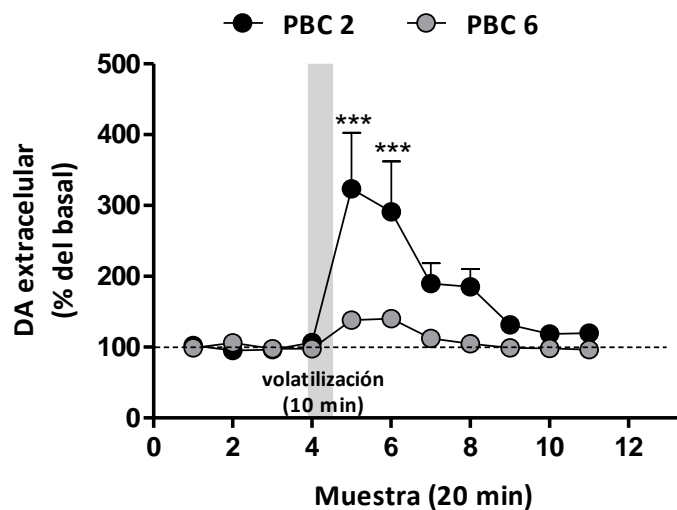


Figura 31. Comparación entre los niveles extracelulares de DA en el NAcc *shell* luego de la exposición a PBC 2 y PBC 6. La barra gris indica el período de exposición a la droga volatilizada (10 minutos). Media \pm EEM. ANOVA de dos vías, seguido de Newman-Keuls. * = vs PBC 6. *** = $p < 0.001$. N = 5.

3.2. EFECTO NEUROQUÍMICO INDUCIDO POR CAFEÍNA VOLATILIZADA

La Figura 32 ilustra los niveles extracelulares de DA y DOPAC en el NAcc *shell* de los animales expuestos a 50 mg de cafeína volatilizada en relación a los animales controles. Como se puede observar, los niveles de DA en el grupo control fueron estables a lo largo de toda la sesión experimental. En contraste, un aumento significativo de los niveles extracelulares de DA fue observado luego de la exposición a cafeína, produciendo un aumento de hasta el 70 % (Figura 32A). El efecto de cafeína fue evidente inmediatamente luego de la exposición y alcanzó diferencias significativas

con el grupo control después de 40 minutos ($p < 0.05$ y $p < 0.01$). El efecto de cafeína duro 100 minutos (muestras 6-11) y comenzó a disminuir recién a los 140 minutos de la exposición ($p < 0.05$). Por otra parte, no se observaron cambios en los niveles extracelulares de DOPAC luego de la exposición a cafeína (Figura 32B).

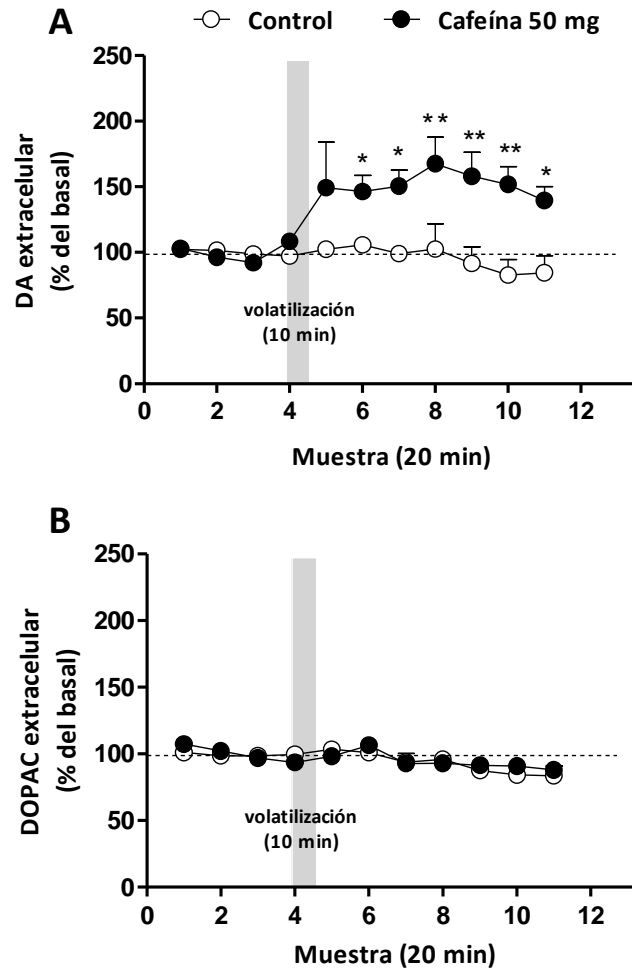


Figura 32. Efecto de cafeína volatilizada sobre los niveles extracelulares de DA y DOPAC en el NAcc *shell*. La barra gris indica el período de exposición a la droga volatilizada (10 minutos). Media \pm EEM. ANOVA de dos vías, seguido de Newman-Keuls. * = vs control. * = $p < 0.05$; ** = $P < 0.01$. N= 5.

4. ANÁLISIS DEL HUMO DE PBC Y CAFEÍNA

En esta serie de experimentos se analizó el humo de las muestras de PBC y cafeína a las que fueron expuestos los animales durante los experimentos comportamentales, con el fin de evaluar la presencia de nuevos compuestos producidos durante, y producto, de la volatilización.

Como se puede observar en las Figuras 33-37, el análisis realizado en el GC-MS mostró que el humo de todas las PBC estudiadas contiene cocaína, además de revelar la presencia de algunos productos de pirolisis adicionales a la cocaína, tales como el anhidro ecgonina metil ester (AEME), el ácido benzoico (AB) y cuatro isómeros del carbometoxicicloheptatrienos (CMCHTs). A su vez, también se observó la presencia de cafeína en el humo de aquellas PBC que la presentaban en su composición (PBC 2, 4 y 13). Este análisis también demostró que, bajo las condiciones utilizadas, no se produjo ningún producto de reacción entre cocaína y cafeína. Estos resultados estuvieron en concordancia con los obtenidos por Gostic y cols. 2009. Cabe resaltar que problemas metodológicos impidieron realizar el estudio del humo de las muestras de PBC 9 y 15.

Por otra parte, el humo de cafeína analizado mostró que este contenía únicamente cafeína, sin presentar otros productos de pirolisis (Figura 38).

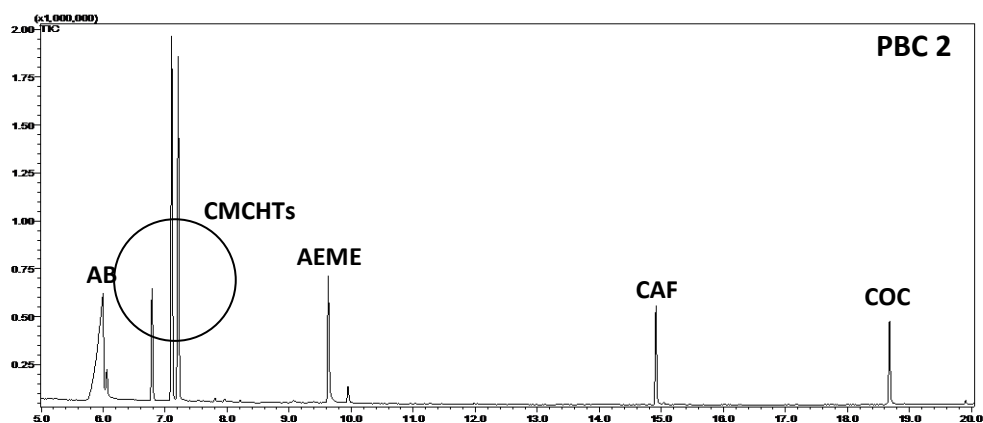


Figura 33. Análisis en GC-MS de la composición del humo de PBC 2. El círculo en el cromatograma engloba los 4 picos correspondientes a los isómeros de CMCHTs.

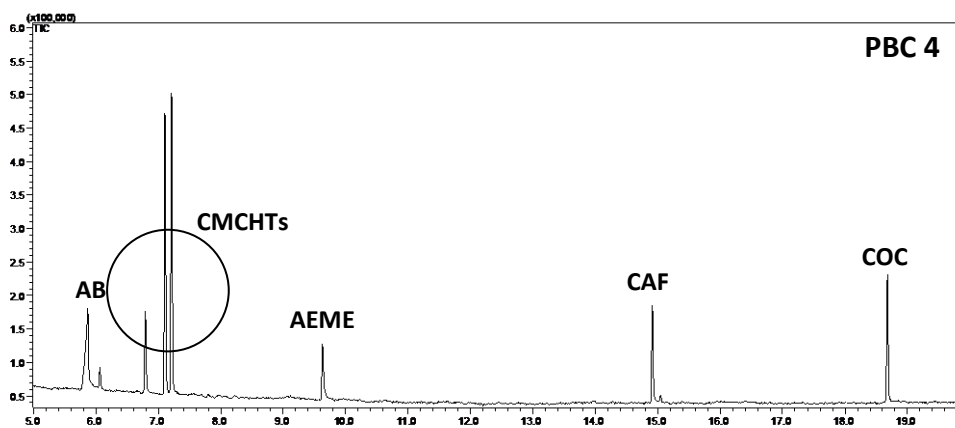


Figura 34. Análisis en GC-MS de la composición del humo de PBC 4. El círculo en el cromatograma engloba los 4 picos correspondientes a los isómeros de CMCHTs.

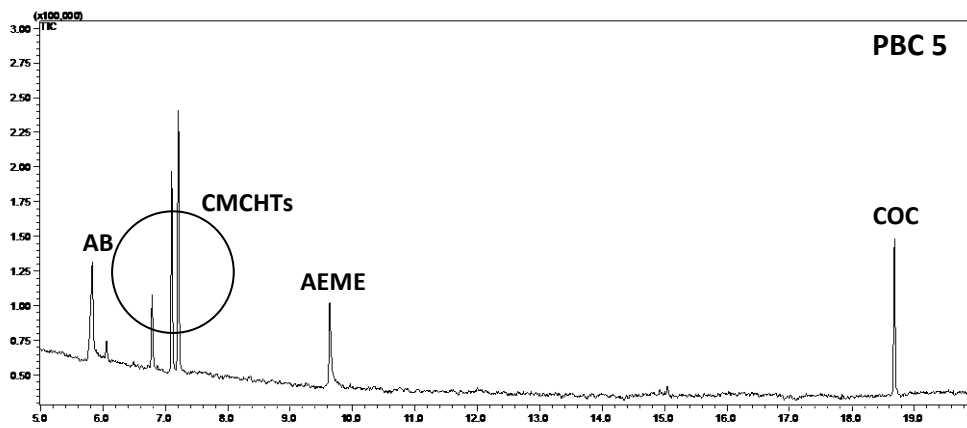


Figura 35. Análisis en GC-MS de la composición del humo de PBC 5. El círculo en el cromatograma engloba los 4 picos correspondientes a los isómeros de CMCHTs.

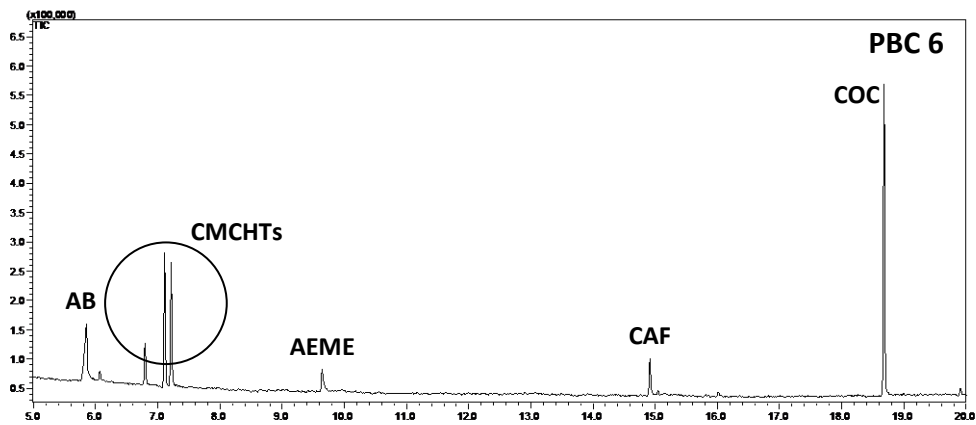


Figura 36. Análisis en GC-MS de la composición del humo de PBC 6. El círculo en el cromatograma engloba los 4 picos correspondientes a los isómeros de CMCHTs.

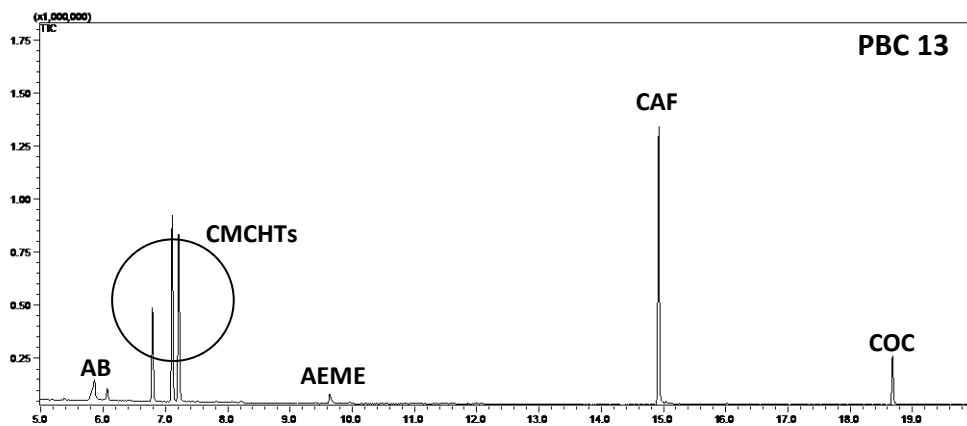


Figura 37. Análisis en GC-MS de la composición del humo de PBC 13. El círculo en el cromatograma engloba los 4 picos correspondientes a los isómeros de CMCHTs.

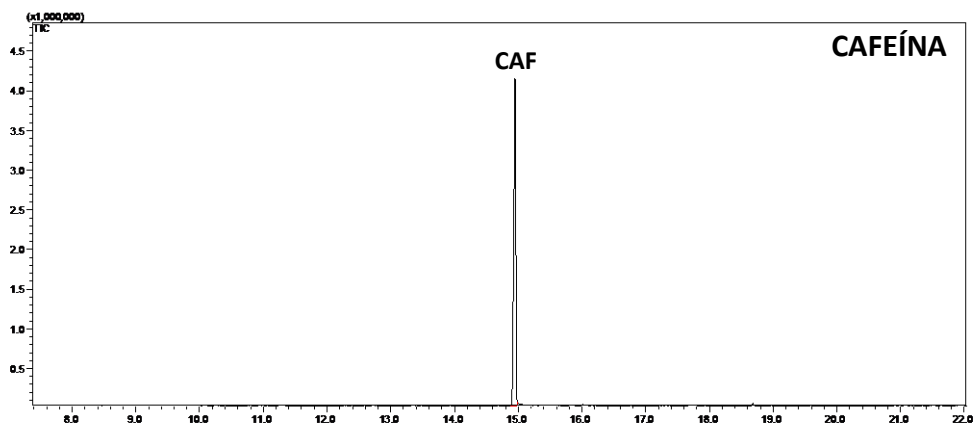


Figura 38. Análisis en GC-MS de la composición del humo de cafeína.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos a lo largo de la tesis confirmaron nuestra hipótesis. PBC suministrada por la vía inhalatoria pulmonar indujo un efecto estimulante, el cual se vio potenciado por la presencia de cafeína. A su vez, dicho efecto estimulante se vio asociado a un aumento en la transmisión dopaminérgica en el NAcc *shell*. Del mismo modo, también se determinó que cafeína volatilizada induce un efecto estimulante y neuroquímico *per se*.

ANÁLISIS QUÍMICO DE MUESTRAS DE PBC INCAUTADAS EN URUGUAY ENTRE LOS AÑOS 2007-2014

Durante esta serie de experimentos se analizó la composición química de una serie de muestras representativas de PBC incautadas en Uruguay en un periodo de siete años. En primer lugar, los resultados obtenidos confirmaron que las muestras analizadas correspondían realmente a PBC, ya que todas presentaban *trans* y *cis*-cinnamoilcocaína en su composición (Morales y cols. 2015). Estas impurezas permiten determinar que las muestras incautadas corresponden a etapas tempranas en la elaboración de la cocaína, confirmando entonces que ninguna de ellas corresponde a clorhidrato de cocaína o crack.

Los resultados obtenidos también demostraron la existencia de una gran variabilidad en la pureza y composición de las muestras estudiadas en las diferentes incautaciones del periodo analizado. Los adulterantes encontrados en las muestras (cafeína, fenacetina y en menor medida aminopirina) son algunos de los frecuentemente reportados como adulterantes de drogas de abuso y se encuentran dentro de los adulterantes reportados en muestras de PBC de Bolivia, Colombia y Perú (PRADICAN 2012). Estos resultados nos sugieren que las muestras llegarían a Uruguay ya adulteradas, independientemente de que aquí sufran más modificaciones u adulteraciones.

Las razones por las cuales estos adulterantes son utilizados en las muestras de PBC son diversas y en algunos casos aún no son del todo claras:

La cafeína, es la droga psicoactiva más popular del mundo debido a su propiedad psicoestimulante combinada con la ausencia de severos efectos secundarios (Fisone y cols. 2004). Existen varias evidencias científicas que demuestran la capacidad de la cafeína de potenciar las acciones psicoestimulantes y reforzadoras de la cocaína (López-Hill y cols. 2011; Prieto y cols. 2015), aunque ninguna de estas evidencias utilizaron la inhalación pulmonar como vía de administración. Además, parece facilitar la administración de drogas ilegales de abuso, específicamente disminuyendo la temperatura de volatilización de las drogas fumadas (Cole y cols. 2011).

Por otra parte, se ha reportado que la fenacetina, una droga con propiedades analgésicas y antipiréticas, se añade como adulterante para potenciar el sabor amargo de la cocaína (clorhidrato) y mejorar su aspecto. La fenacetina hace que la cocaína brille y simula el aspecto de la “alita de mosca” (Jones y cols. 2015). Sin embargo, es posible que se agregue por tener efectos motivacionales *per se*. En este sentido, hay un único estudio preclínico en animales que demuestra que la fenacetina, a dosis que genera efectos anti-nociceptivos produce un aumento de la motivación en los animales de experimentación (Abbott y Hellemans 2000). Sin embargo, hasta nuestro conocimiento, no existe ningún reporte que haya estudiado los efectos de la combinación de fenacetina y cocaína, ni estudios que hayan usado la inhalación pulmonar como vía de administración de fenacetina.

La aminopirina, por su parte, es una droga con propiedades analgésicas, anti-inflamatorias y antipiréticas, y se presenta en forma de polvo cristalino, blanco, inodoro, casi insípido y fácilmente soluble en agua. Con excepción de sus propiedades físicas similares a la cocaína, hasta nuestro conocimiento, no existen datos clínicos o pre-clínicos que expliquen la razón por la cual esta droga es utilizada como adulterante.

Los análisis realizados en este trabajo no solo revelaron una variación en la composición cualitativa de las muestras de PBC a lo largo de los años, sino también en lo cuantitativo. La disminución en el porcentaje de cocaína base y la aparición de un nuevo adulterante (fenacetina), nos confirma la importancia y necesidad de realizar estudios químicos de las muestras de PBC incautadas de manera periódica, de forma

tal de tener un verdadero correlato de lo que se está consumiendo en las calles. En línea con este pensamiento y dentro del marco del “Proyecto sobre Cocaínas Fumables” coordinado por el Observatorio Interamericano de Drogas de la Comisión Interamericana para el Control del Abuso de Drogas (CICAD-OEA) y financiado por el Smoked Cocaine in South Cone Countries Grant CICAD-OEA/USINL–USA, realizamos el análisis de 305 muestras de PBC incautadas en Uruguay durante los años 2014 y 2015 (Ver Anexo). El objetivo del proyecto consistió en analizar químicamente muestras incautadas de cocaínas fumables provenientes de países de la región tales como Uruguay, Argentina, Brasil, Chile y Paraguay. El fin era alentar a las autoridades correspondientes sobre la necesidad de desarrollar un mecanismo institucional que permita el análisis sistemático de todas las muestras de drogas incautadas, como fuente permanente de conocimiento y como eslabón de un sistema de alarma temprana sobre el perfil químico de las drogas de consumo y los adulterantes utilizados. Este trabajo se realizó en el último semestre del trabajo de tesis y permitió tener un marco comparativo con las 27 muestras analizadas durante el desarrollo de la tesis (Tabla 3).

Por lo tanto, el análisis químico de muestras incautadas de PBC realizados durante el 2007 al 2015, contribuyó al conocimiento sobre la dinámica del tráfico y al potencial impacto de la PBC en la salud de los consumidores.

EFFECTO ESTIMULANTE Y NEUROQUÍMICO DE PBC VOLATILIZADA

Durante esta serie de experimentos se evaluó el efecto estimulante así como el efecto sobre los niveles de DA extracelular en el NAcc *shell* luego de un tratamiento agudo con muestras de PBC volatilizada con diferente contenido en cocaína y cafeína. A su vez, se diseñaron experimentos para evaluar la contribución de la cafeína en el efecto estimulante producido por PBC.

Los resultados obtenidos durante los experimentos comportamentales demostraron que el tratamiento agudo con PBC volatilizada es capaz de generar, con excepción de la PBC 5, un efecto estimulante. Si bien este resultado era esperable, en base a nuestros antecedentes (López-Hill y cols. 2011) y a los numerosos estudios que

demuestran la capacidad estimulante de otras drogas de abuso, estos datos constituyen el primer reporte pre-clínico de los efectos de la PBC mediante la vía de inhalación pulmonar.

El efecto comportamental producido por PBC fue acompañado por variaciones en los niveles plasmáticos de cocaína y cafeína. Estos datos proporcionan un correlato bioquímico de lo observado comportamentalmente y fueron de gran ayuda a la hora de analizar el efecto estimulante inducido por las diferentes muestras de PBC. Cabe destacar que los niveles plasmáticos obtenidos no explican completamente las diferencias observadas en el efecto estimulante producido por las diferentes muestras de PBC, por lo que nuevos estudios con mejoras en las técnicas utilizadas deberán ser realizados. De todas formas, estos datos son imprescindibles para validar la metodología implementada en este trabajo.

PBC 5, conteniendo únicamente cocaína, fue la única muestra que no generó un efecto estimulante en los animales tratados en relación al grupo control (50.39 ± 4.403 m vs 39.18 ± 2.867 m). Estos datos contrastaron completamente a los mostrados por la PBC 9 (107.2 ± 5.972 m), que a pesar de tener la misma composición química que PBC5, indujo un significativo efecto estimulante en relación al grupo control. Si bien, no hay razón aparente para esta discrepancia, el análisis de los niveles plasmáticos de cocaína en estas muestras mostró que, mientras que los animales tratados con PBC 5 contenían 12.45 ng/ml de cocaína en plasma, los tratados con PBC 9 contenían 291.6 ng/ml. Esta clara diferencia en los valores plasmáticos de cocaína podría explicar las diferencias observadas en el efecto estimulante producido por ambas drogas. Estos resultados exponen además que, a pesar de que ambas muestras contienen la misma composición en cocaína, existe algún otro factor que determina que su volatilización, y por ende los valores plasmáticos, sea mejor en una muestra que en la otra. Es de destacar que, si bien el análisis químico realizado por GC-MS, no evidenció ningún otro componente, no podemos descartar la aparición de algún subproducto de la volatilización que explique las diferencias entre ambas muestras.

Diversos estudios preclínicos han sugerido fuertemente que la cafeína, consumida tanto aguda como crónicamente, es capaz de potenciar los efectos psicoestimulantes,

recompensantes y tóxicos inducidos por psicoestimulantes prototípicos, además de aumentar la vulnerabilidad a la dependencia y la recaída. Tanto en este trabajo como en trabajos previos hemos reportado a la cafeína como un importante adulterante en las muestras incautadas de PBC (López-Hill y cols. 2011; Prieto y cols. 2015), llegando a alcanzar altos porcentajes en relación al contenido del alcaloide cocaína y en algunos casos a presentar un contenido incluso superior al de cocaína. Mediante la vía de administración i.p., hemos demostrado que la cafeína potencia significativamente los efectos locomotores y la sensibilización inducida por muestras de PBC administrada en ratas (López-Hill et al. 2011; Prieto et al. 2015). Sin embargo, hasta el momento no existían estudios que demostraran el rol de la cafeína como adulterante en drogas de abuso volatilizadas.

En base a estos antecedentes y debido a la variabilidad observada en el efecto comportamental producido por las diferentes muestras de PBC volatilizada, nos propusimos evaluar el rol de la cafeína en el efecto producido por PBC mediante la vía de inhalación pulmonar. Durante estos experimentos se observó que cafeína (25 mg) incrementó el efecto estimulante producido por PBC 5 en relación al grupo control (67.7 ± 9.3 m vs 39.2 ± 2.8 m), demostrando claramente la capacidad potenciadora que tiene la cafeína como adulterante de drogas de abuso fumadas. Sin embargo, cabe resaltar que no se observó el efecto estimulante después del tratamiento con la combinación de PBC 5 con 10.5 mg de cafeína (48.4 ± 3.0 m), aún cuando la combinación contiene las mismas cantidades de cocaína y cafeína presentes en la PBC 2 (la cual indujo un claro efecto estimulante; 103.7 ± 13.5 m). Estos resultados confirman aún más que parecen existir otros factores, que estarían determinando las diferencias observadas entre el efecto estimulante producido por las diferentes PBC. La diferencia observada en las concentraciones de cocaína en plasma podrían estar determinando que, la temperatura a la cual las muestras de PBC se estarían volatilizando sería un factor relevante en los diferentes efectos estimulantes observados. Es sabido que a mayores temperaturas, menor es la concentración de cocaína en el humo y mayor es la producción de productos de pirolisis (Nakahara y Ishigami 1991; Gostic y cols. 2009). De acuerdo con esto, la PBC 2 se estaría volatilizando a menores temperaturas que la PBC 5, hecho que garantizaría la

preservación de sus principales componentes (cocaína y cafeína) y por lo tanto un mayor acceso de éstos al cerebro. Cabe resaltar que restó evaluar el rol de la cafeína en la muestra PBC 9, dado que ésta muestra podría volatilizarse en mejores condiciones que la muestra PBC 5 y evidenciar una potenciación real del efecto estimulante inducido por la PBC 9.

Con la intención de conocer la composición del humo al cual se expusieron los animales se realizó el análisis cualitativo de los compuestos presentes en el humo de las muestras de PBC. Los resultados mostraron que además de cocaína y cafeína (en aquellas muestras que la contenían), el humo de todas las muestras contenía tres productos de pirolisis de cocaína: AB, AEME Y CMCHTs (Nakahara y Ishigami 1991; Gostic y cols. 2009).

De estos productos de pirolisis, se ha demostrado en cultivos celulares primarios de hipocampo de rata, que el AEME, por medio de los receptores muscarínicos M1 y M3, resultó ser más neurotóxico que la cocaína, sugiriendo que los consumidores de cocaína fumada podrían estar predispuestos a mayores efectos deletéreos en comparación a los consumidores de otras vías de administración (García y cols. 2012; García y cols. 2015). Estos mismos autores demostraron que AEME, a pesar de no inducir la expresión de sensibilización comportamental por sí solo, potenció sustancialmente los efectos de la cocaína, observándose una mayor expresión del fenómeno en aquellos animales tratados con la combinación cocaína-AEME en comparación con los tratados únicamente con cocaína (García y cols. 2016). Por otra parte, hasta nuestro conocimiento no existen reportes que demuestren efectos psicoactivos de los otros productos de pirolisis encontrados.

Si bien los experimentos conductuales demostraron, aunque de manera parcial, que la cafeína posee un rol principal en el efecto estimulante inducido por aquellas PBC que están adulteradas con esta sustancia, los ensayos neuroquímicos lo confirmaron una vez más. El aumento en los niveles extracelulares de DA inducidos tanto por la PBC 2 (con cafeína) como por la PBC 6 (sin cafeína), se explican, en primer lugar, por la acción de la cocaína (presente en ambas muestras) sobre los DAT. La cocaína bloquea los DAT presentes en la terminal pre-sináptica evitando la remoción de la DA de la

hendidura sináptica, lo que genera la acumulación de DA en el espacio extracelular (Lizasoain y cols. 2002; Volkow y cols. 1997). Estos resultados obtenidos eran esperados, ya que una de las principales características de las drogas de abuso es la capacidad de incrementar las concentraciones extracelulares de DA en el NAcc, lo cual se cree es el principal mecanismo involucrado en las propiedades recompensantes y estimulantes de estas drogas (Wise y Bozarth 1987; Pontieri y cols. 1995).

Sin embargo, los ensayos neuroquímicos mostraron diferencias significativas entre la liberación de DA producida por ambas muestras, siendo mayor la liberación de DA en los animales tratados con la PBC adulterada con cafeína (PBC 2), sugiriendo que la cafeína no solo potencia la actividad motora producida por la muestra de PBC adulterada con cafeína sino que también incrementa sus efectos neuroquímicos.

Por otra parte, los resultados también mostraron una caída en los niveles extracelulares de DOPAC en ambos grupos experimentales (PBC 2 y 6). Este resultado se explica por el hecho de que la mayoría del catabolismo de la DA es mediado por la acción de las monoamino oxidasas (MAO), las cuales se encuentran principalmente en la membrana externa de las mitocondrias dentro de la terminal sináptica. El bloqueo producido por la cocaína sobre los DAT, impide el ingreso de la DA a la terminal, volviéndose entonces inaccesible para las MAO y disminuyendo de esta forma los niveles de sus metabolitos (Garrett y Soares-da-Silva 1990; Feldman y cols. 1997).

EFFECTO ESTIMULANTE Y NEUROQUÍMICO DE CAFEÍNA VOLATILIZADA

Los resultados generados en este estudio demostraron un efecto estimulante dosis-dependiente y un incremento significativo en los niveles de DA extracelular en el NAcc *shell* luego de un tratamiento agudo con cafeína administrada a través de la vía de inhalación pulmonar. A pesar de que ya existían evidencias que mostraban la capacidad de cafeína de ser volatilizada (Gostic y cols. 2009), nuestro trabajo representa la primera evidencia experimental que muestra que cafeína ejerce efectos farmacológicos luego de su administración por inhalación pulmonar. El hecho de que el efecto comportamental observado estuviera acompañado directamente por variaciones en los niveles plasmáticos de cafeína sugiere que la sustancia llega al

cerebro luego de la inhalación pulmonar, validando así la metodología aplicada en este trabajo.

Un gran número de evidencias experimentales sugiere que la transmisión dopaminérgica juega un rol clave en los efectos psicoestimulantes de la cafeína (Garrett y Griffiths 1997; Fredholm y Svenningsson 2003; Cauli y Morelli 2005; Ferré 2008; Volkow y cols. 2015; Ferré 2016). En concordancia, durante este trabajo se demostró que la dosis de cafeína que generó los mayores efectos comportamentales (50 mg) aumentó significativamente los niveles extracelulares de DA en el NAcc *shell*, sin alterar el metabolismo dopaminérgico, ya que no se observaron cambios en los niveles extracelulares de DOPAC. Estos últimos resultados coinciden con trabajos realizados en los que se demostró que cafeína, a pesar de ser utilizado como base para el diseño de potentes inhibidores de las MAO, es un débil inhibidor de las isoformas MAO-A y MAO-B (Petzer y cols. 2013).

Estudios realizados tanto en animales como en humanos, mediante vías de administración distintas a la usada en este trabajo, muestran que cafeína exhibe propiedades reforzadoras débiles en comparación a las mostradas por psicoestimulantes prototípicos y otras sustancias adictivas (Strain y Griffiths 1995; Nehlig 1999; Ferré 2016). Teniendo en cuenta que se ha sugerido que la liberación de DA en el NAcc *shell* esta causalmente asociada con los efectos reforzadores de los psicoestimulantes (Di Chiara e Imperato 1998; Volkow y cols. 2009), podría ser posible que, bajo una vía de administración rápida (inhalación pulmonar), la cafeína fuese capaz de inducir un efecto reforzador mayor que el mostrado mediante otras vías ensayadas.

La vía de administración tiene una alta influencia sobre la severidad de la dependencia a las drogas de abuso (Gossop y cols. 1992). De hecho, la velocidad con la que las drogas de abuso entran en el cerebro es un parámetro clave que determina el efecto reforzador de las drogas. Se ha propuesto que la alta velocidad con la que una droga llega al cerebro facilita su capacidad de inducir formas de plasticidad neurocomportamental, produciendo así una mayor motivación por la droga y contribuyendo a su uso compulsivo (Samaha y Robinson 2005). Dado que el consumo

crónico de cafeína puede llevar al desarrollo de dependencias psicológicas y físicas leves (Morelli y Simola 2011) existiría la posibilidad de que el consumo de cafeína por la vía fumada podría aumentar sus efectos reforzadores y de esta forma el riesgo de abuso. Sin embargo, serían necesarios estudios comportamentales adicionales, combinando paradigmas específicos (autoadministración o ultra-vocalizaciones) y la vía de administración fumada, para verificar esta hipótesis.

Existen evidencias controversiales sobre la inducción de cambios en los niveles extracelulares de DA en el NAcc *shell* por parte de cafeína (Acquas y cols. 2002; Solinas y cols. 2002; Cauli y Morelli 2005; De Luca y cols. 2007; Morelli y Simola 2011; Malave y Broderick 2014). Sin embargo, nuestros resultados apoyan aquellas evidencias que muestran un aumento en la liberación de DA, incluso utilizando otras vías de administración. En relación a un posible mecanismo que explique los resultados obtenidos, Solinas y colaboradores demostraron que el aumento en los niveles extracelulares de DA en el NAcc se debe a la acción de la cafeína sobre los receptores A1, dado que dicho efecto se reprodujo mediante el tratamiento con antagonistas de los receptores A1 y no por antagonistas A2A (Solinas y cols. 2002). Además, por su localización pre-sináptica, los receptores A1 participarían en la modulación de la liberación de DA. Así, aunque actualmente se piense que el bloqueo de los receptores de adenosina A2A es el mecanismo responsable del efecto estimulante producido por cafeína, el bloqueo de los receptores de adenosina A1 podría también jugar un papel relevante en dicho efecto.

Para nuestro conocimiento, no se han realizado estudios clínicos o preclínicos sobre los efectos centrales asociados al consumo de una forma fumable de cafeína. Basado en la asunción de que el efecto psicomotor de los psicoestimulantes predice su efecto reforzador y su poder adictivo (Wise y Bozarth 1987; Volkow y cols. 2015), nuestros resultados nos llevan a proponer que la cafeína fumada podría tener algunas similitudes con los efectos producidos por drogas psicoestimulantes de abuso, como la cocaína y metanfetamina. Existen fuentes de datos informales en internet que explican diferentes formas de producir cafeína fumable, junto con informes subjetivos que sugieren que sus efectos serían similares a los producidos por la cocaína fumada. Es importante considerar que todos estos reportes son sobre el uso experimental de

cafeína fumada basado en procesos químicos caseros, los cuales carecen completamente de los controles sanitarios y de calidad, poniendo en grave peligro la salud de los usuarios. Nuestro trabajo proporciona una advertencia significativa sobre la necesidad urgente de aumentar la conciencia social y el control del consumo de cafeína a través de diversas fuentes de la dieta como el café, té, refrescos cola y bebidas energizantes, particularmente en adolescentes (Vester 2014; Harris y Munsell 2015).

Por último, el abuso de PBC es un importante problema social y sanitario en varios países latinoamericanos, el conocimiento acerca de como los adulterantes activos colaboran en los efectos nocivos es de suma importancia para entender finalmente las graves consecuencias que este tipo de drogas, adulteradas con cafeína, pueden tener sobre la salud de las personas.

CONCLUSIONES

- El análisis químico de muestras de PBC incautadas en Uruguay demostró que todas las muestras contienen cocaína base como su principal componente y evidenció la presencia de cafeína, fenacetina y/o aminopirina como adulterantes.
- El análisis químico demostró un cambio en la composición química de las muestras de PBC incautadas en el Uruguay entre el 2007 y el 2015. A pesar de este cambio, cafeína continúa siendo el adulterante más frecuente en muestras de PBC. Estos datos aportan información relevante sobre la dinámica del tráfico de este tipo de drogas.
- La aparición de la respuesta comportamental estimulante inducida por el tratamiento agudo con PBC volatilizada demuestra la validez de la estrategia experimental utilizada.
- Por primera vez se reportan datos de cantidades plasmáticas de los componentes principales de la PBC, cocaína y cafeína.
- Por primera vez se evidenció que cafeína volatilizada produce un efecto estimulante, el cual fue dosis-dependiente. Este resultado refuerza el papel de los adulterantes en el efecto farmacológico de una droga psicoestimulante fumable.
- Si bien la presencia de cafeína demostró que puede potenciar el efecto estimulante de una PBC, otros factores deben ser tomados en cuenta ya que cada muestra de PBC indujo una respuesta comportamental diferente a igual cantidad de cocaína. La temperatura de volatilización de PBC, y por tanto la mayor disponibilidad de sus componentes activos, podría ser uno de los factores que explique estas diferencias.
- Los resultados neuroquímicos demostraron que PBC volatilizada induce un aumento en la transmisión dopaminérgica en el NAcc *shell*, efecto asociado al efecto reforzador de todas las drogas de abuso. En concordancia con los resultados comportamentales, la presencia de cafeína en su composición química influyó el efecto neuroquímico dopaminérgico.

- Por primera vez se evidenció que cafeína volatilizada indujo un aumento en la transmisión dopaminérgica en el NAcc *shell*, efecto que podría vincularse a un aumento en el efecto reforzador de la cafeína.
- El análisis del humo de las muestras de PBC demostró la presencia de cocaína y cafeína además de tres productos de pirolisis de la cocaína: AB, AEME y CMCHTs. Por su parte, en el humo de la cafeína volatilizada se detectó únicamente cafeína, confirmando la ausencia de productos de pirolisis.
- Este trabajo aporta información relevante que demuestra la incidencia de la vía de administración junto al de la composición química en el efecto farmacológico de PBC. A su vez, contribuye al conocimiento de efectos *per se* de la cafeína bajo una vía de administración nunca antes ensayada.
- Los datos obtenidos en esta tesis colaboran en la identificación de factores con potencial impacto en la salud de los consumidores de PBC.

PERSPECTIVAS

- Continuar el análisis químico de muestras de PBC incautadas en Uruguay, de forma tal de ir generando un registro de la composición química y un mejor correlato de lo que se consume en las calles.
- Realizar los experimentos comportamentales y neuroquímicos con cocaína base más el agregado de concentraciones conocidas de cafeína. De esta forma eliminaríamos las variables particulares de cada PBC y se podría determinar el rol exclusivo de la cafeína como adulterante mediante la vía de inhalación pulmonar
- Evaluar la variable temperatura en la volatilización de las muestras de PBC.
- Evaluar la capacidad reforzadora de la cafeína volatilizada mediante paradigmas de autoadministración o ultra-vocalizaciones.
- Evaluar las respuestas comportamentales en ansiedad experimental y función cognitiva inducidas por cafeína volatilizada.
- Evaluar los efectos comportamentales y neuroquímicos de la fenacetina volatilizada, determinando su rol como adulterante.

ANEXO

Proyecto Cocaínas Fumables-CICAD:

“ANÁLISIS DE CARACTERIZACIÓN QUÍMICA DE COCAÍNAS FUMABLES INCAUTADAS EN EL URUGUAY: Lineamientos metodológicos y conceptuales para la sistematización de información”

Juan Andrés Abin Carriquiry^{1,2}, Martín Galvalisi³, Marcela Martínez^{1,2}, José Pedro Prieto³, Javier Bonda⁴, Elena Lerena⁴, Verónica Rivero⁴, Alicia Pla⁵, Cecilia Scorza²

¹Plataforma de Servicios Analíticos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE), ²Departamento de Neuroquímica, IIBCE, ³Departamento de Neurofarmacología Experimental, IIBCE, ⁴Instituto Técnico Forense, ⁵Comisión de Lucha contra las Toxicomanías, Ministerio de Salud Pública.

1. CONSIDERACIONES GENERALES

Desde el año 2007, en el Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE) se viene realizando la caracterización de la composición química de muestras de pasta base de cocaína incautadas en el Uruguay proporcionadas por el Instituto Técnico Forense (ITF) con fines exclusivamente de investigación. La evidencia en la composición química que se tenía hasta el momento se basaba en resultados del análisis químico de un número relativamente bajo de muestras. A partir de nuestra participación en el Proyecto de Cocaínas Fumables-CICAD, representando a Uruguay, se analizó un número mayor de muestras, correspondientes a incautaciones del 2014-2015 registradas por el ITF. El IIBCE recibió 62 muestras de incautaciones realizadas en el 2014 y 244 muestras del 2015, haciendo un total de 306 muestras (Tabla 1). El fin del Proyecto era caracterizar la composición química de muestras incautadas de cocaínas fumables provenientes de diferentes países de la región (Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay) y crear así una base de datos a nivel regional sobre dicha composición.

2. UNIDAD DE ANÁLISIS Y MUESTRA

- El objetivo del trabajo fue caracterizar químicamente drogas bajo denominación de cocaínas fumables, conocer su composición cualitativa y cuantitativa e intentar asociar estas características con variables del contexto tales como lugar del decomiso, lugar de la venta, lugar -país o región- de procedencia o destino, lugar del consumo.
- Las unidades de análisis específicas: muestras de drogas definidas como cocaínas fumables, sobre las cuales se analizó el contenido en cocaína base y la identificación y cuantificación de sustancias agregadas por los mecanismos de adulteración/dilución. Se analizaron distintos formatos de las muestras incautadas: lágrima, envoltorio, trozo de piedra, chasqui, piedra, tiza, ladrillo y cápsula. Definimos las formas lágrima, envoltorio, trozo de piedra, chasqui, piedra y cápsula como muestras incautadas prontas para comercializar al usuario final mientras que la forma tiza y ladrillo se asumieron como muestras para tráfico.

Todas las muestras entregadas por el ITF al IIBCE fueron analizadas. Si bien por ley, el ITF (organismo pericial de la Justicia Uruguaya) recibe el universo de las incautaciones realizadas en Uruguay, hubo una selección al azar de las muestras proporcionadas por el ITF para ser incluidas en el presente estudio. Por lo tanto, las muestras seleccionadas para la investigación no corresponden a todas las incautaciones realizadas en el país en el período solicitado año 2014 junio 2015 debido a que cuando se inició el proyecto muchas de estas muestras habían sido destruidas de acuerdo a lo exigido por la ley 17016 de Uruguay. Es decir, las muestras no reflejan el universo de lo que se consume en general, sino de lo que se incautó en un área y período determinado. Cabe resaltar además que no existió ninguna selección posterior por parte del IIBCE y que el ITF no ha proporcionado datos sobre el tamaño de los decomisos.

Las muestras fueron analizadas utilizando diferentes técnicas (ver más adelante) según si fueron cuantificadas o sus componentes únicamente identificados.

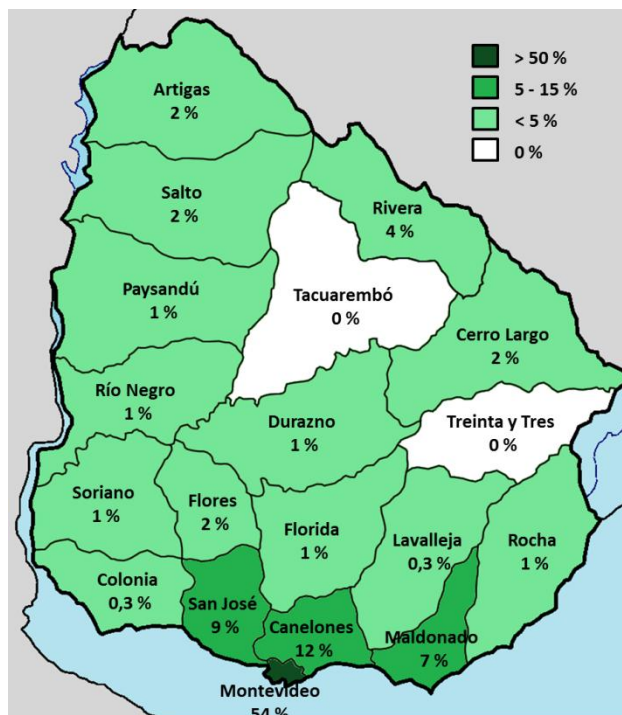
- El ITF definió como pasta base de cocaína a las muestras seleccionadas en base a sus análisis previos realizados por GC-NPD (Cromatografía de Gas con detector de nitrógeno-fósforo) los que reportaron presencia de cocaína, además de que la solubilidad, consistencia cerosa y amorfa, color y olor (análisis presuntivos) sugerían corresponder a pasta base de cocaína donde la cocaína está en la forma base libre.
- La Plataforma de Servicios Analíticos del IIBCE recibió los siguientes datos de las muestras (Tabla 1, Figuras 1-3):

Tabla 1: Características generales de las muestras analizadas

Cantidad de muestras	Año	Meses (cantidad de muestras)	Tipo de muestra (% de frecuencia)	Localidad de la incautación
62	2014	Abril (1), Julio (1) Agosto (1), Setiembre (3) Octubre (21) Noviembre (12) Diciembre (23)	Lágrima (44 %), envoltorio (29 %), trozo de piedra (12 %), chasqui (7%), piedra (3 %), tiza (3 %), ladrillo (2%) y cápsula (0,3)	Montevideo Canelones, San José, Maldonado, Rivera, Cerro Largo, Salto, Artigas, Flores, Durazno, Paysandú, Rocha, Soriano, Río Negro, Florida, Colonia y Lavalleja
244	2015	Enero (41), Febrero (32), Marzo (25) Abril (60), Mayo (65) y Junio (21)		

En la Figura 1 se observa una primera relación entre el porcentaje de muestras incautadas en función de la localidad.

Figura 1: Distribución geográfica en el Uruguay de las muestras seleccionadas para el estudio



La mayoría de las muestras seleccionadas se concentraron en los Departamentos del sur del país (Montevideo > Canelones > San José). Tacuarembó y Treinta y Tres fueron los únicos Departamentos del país de los que no recibimos ninguna muestra incautada durante el período seleccionado. Esto no significa que no se incauten muestras en otros períodos o que no se consuma PBC en dichas localidades.

En la Figura 2 se observa una primera relación entre la cantidad de muestras incautadas en función de los meses de cada uno de los años seleccionados.

Figura 2: Distribución temporal en el Uruguay de las muestras seleccionadas

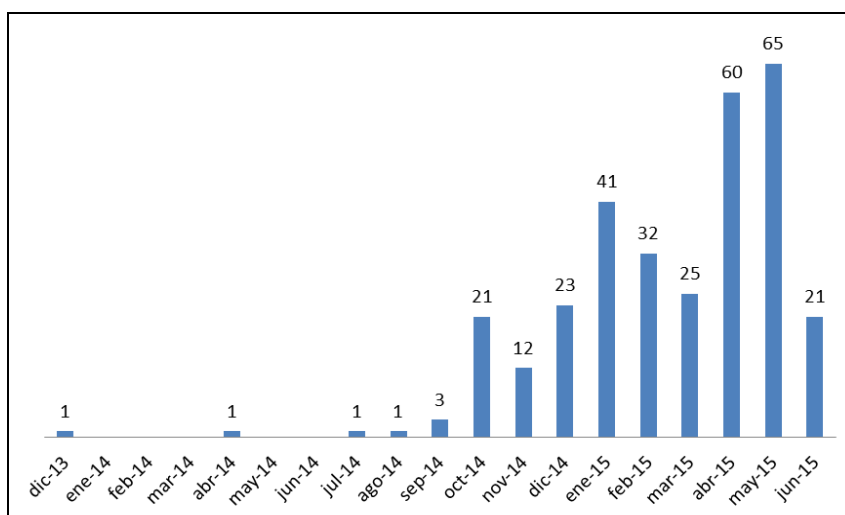
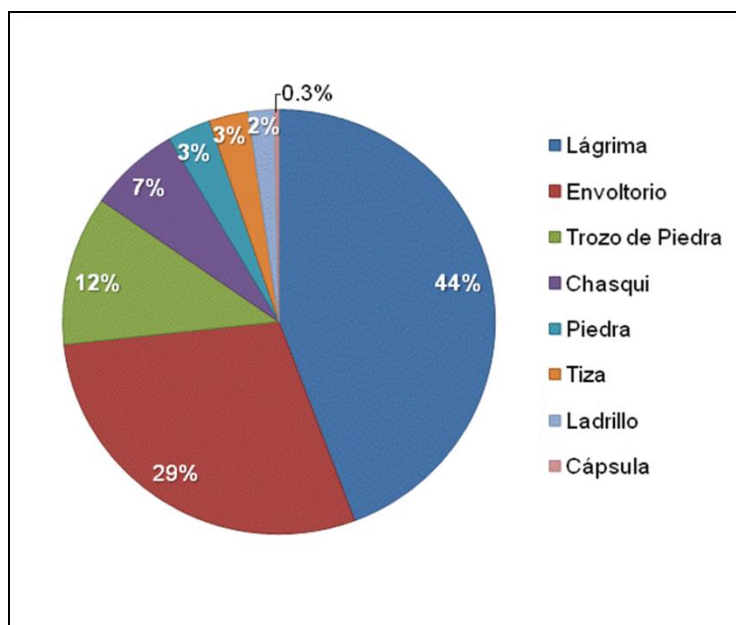


Figura 3: Tipo de muestras incautadas en el Uruguay



La mayoría de las muestras analizadas (44 %) se presentaron en la forma de lágrima.

3. CARACTERIZACIÓN QUÍMICA: METODOLOGÍA Y EQUIPAMIENTO

La caracterización química cuali-cuantitativa de los principales componentes que constituyen las muestras de PBC incautadas, permitieron la identificación del nivel de pureza de su principal alcaloide, cocaína, así como la de sustancias utilizadas como adulterantes.

Entre los métodos analíticos empleados destacamos:

3.1. Prueba de Scott modificada: Test de color orientativo y presuntivo frente a la presencia de cocaína, a través de la aparición de un complejo de color azul que se forma por la formación de un complejo entre el tiocianato de cobalto y cocaína. Si la muestra reacciona de inmediato variando al azul indica probable presencia de cocaína clorhidrato; si la muestra se mantiene insoluble y se torna de color azul, se asume como probable cocaína base. Como análisis complementario, al adicionar cloroformo el material insoluble se disuelve rápidamente y la fase orgánica se torna de color azul intenso.

3.2. Cromatografía gaseosa acoplada a detector de espectrometría de masa (GC/MS): La cromatografía GC/MS es una técnica de separación y detección de una muestra, la cual debe ser volátil. El detector de espectrometría de masas, entrega el espectro único para cada compuesto (huella digital) al comparar la muestra con los espectros almacenados en su biblioteca. Esta metodología es usada para confirmar la identidad de posibles drogas difíciles de identificar, ya sea por su naturaleza o pequeña cantidad disponible.

En el presente trabajo se utilizó un equipo GC-MS-QP 2010 Ultra, con inyector automático (AOC-20i. Shimadzu Corporation) y con una columna HP-5MS (30 m largo

x 0.25 mm diámetro interno x 0.25 µm de espesor de fase; Agilent J & W GC Columns). Se utilizó helio como gas *carrier* a un flujo de columna de 0.93 ml/min y los cromatogramas se analizaron con el software GCMSolution Versión 2.71.

3.3. Cromatografía líquida de alta presión con detección de arreglo de diodos (HPLC/DAD): La cromatografía líquida de alta presión es una técnica de separación basada en la distinta retención de los componentes de una muestra disueltos en la fase móvil al pasar por la fase estacionaria. La interacción entre el soluto de la fase móvil y la fase estacionaria determina la separación de los componentes a identificar. El detector de arreglo de diodos está dentro de la espectrofotometría ultravioleta que utiliza un haz de radiación de diferentes longitudes de onda que es absorbido por cada componente separado en la columna de cromatografía, dando señales para los diferentes valores de longitudes de onda, existiendo una en la cual ese componente tiene mayor señal. Esta técnica permitió realizar la cuantificación de los componentes presentes en las muestras de pasta base de cocaína.

En el presente trabajo se utilizó un equipo HPLC Waters, con inyector automático (Waters 717 plus), bomba binaria (Waters 1525), detector de arreglo de diodos (Waters 2998) y con una columna Luna-C18 (5µ, 100 Å (150*4.6mm), Phenomenex). Se utilizó metanol 90 % (A) y buffer (ácido acético / acetato de sodio, pH=3.65: agua bi-distilada (5:95); octil sulfato de sodio (SOS) 0.86 mM) (B) como fase móvil según el siguiente gradiente: de 0 a 20 minutos se pasa de 30 % a 100 % de A, un período isocrático de 14 minutos con 100 % de A y se restablecen las condiciones iniciales por 10 minutos. Los cromatogramas fueron analizados mediante el software Empower Pro a la longitud de onda óptima para cada analito.

3.4. Equipamiento utilizado para análisis de drogas:

- a. Balanza analítica de precisión
- b. Centrífuga refrigerada
- c. Agitador de tubos vortex
- d. Baño ultrasonido

3.5. Procesamiento de la muestra

Se prepara una solución concentrada (SCi) a partir de la toma de 50 mg de cada muestra de PBC y se disuelve en 5 ml de metanol.

3.6. GC-MS:

Se toman 20 µl de SCi y se diluye en 980 µl de cloroformo, inyectando posteriormente 1 µl de dicha solución en el GC-MS.

3.7. HPLC-DAD:

Se toman 20 µl de SCi y se diluye en 980 µl de fase móvil, inyectando posteriormente 20 µl de dicha solución en el HPLC-DAD.

El criterio que se utilizó para considerar presencia o ausencia de cocaína y adulterantes es que su contenido sea superior al 1 %.

4. ANÁLISIS CUALITATIVO

Se utilizó el test Scott para aquellas muestras que no se disolvieron en una primera instancia, confirmando que correspondían a muestras de pasta base de cocaína.

En la Tabla 2 se evidencia que la mayoría de las muestras incautadas se encuentran adulteradas. Se ha identificado al menos un adulterante en el 90 % de las muestras analizadas.

Tabla 2: Cantidad de muestras en las que se detectó presencia de adulterante

Años de incautación	Total de muestras	Cantidad de muestras	
		Cocaína base SIN adulterantes	Cocaína base CON adulterantes
Año 2014	62	2 (3 %)	60 (97 %)
Año 2015	244	30 (12 %)	214 (88 %)
Periodo 2014-2015	306	32 (10 %)	274 (90 %)

Cabe mencionar que “adulterante” se le denomina a toda aquella sustancia deliberadamente agregada para imitar o potenciar el efecto de la droga de base o con el fin de aumentar el volumen (diluyente) [1].

Si consideramos el tipo de adulterantes, en la Tabla 3 se puede evidenciar que los adulterantes mayormente encontrados en las muestras fueron: cafeína, fenacetina y aminopirina. Las muestras adulteradas con lidocaína, levamisol, pseudococaína, benzocaína y procaína fueron agrupadas dado que estos aparecen en muy baja frecuencia.

Tabla 3: Cantidad de muestras según el contenido de cocaína y adulterantes

Año de incautación	Total de muestras	Cantidad de muestras				
		Cocaína	Cafeína	Fenacetina	Aminopirina	Otros*
2014	62	62 (100%)	49 (79 %)	56 (90 %)	7 (11 %)	5 (8 %)
2015	244	244 (100 %)	147 (60 %)	175 (72 %)	75 (31 %)	21 (9 %)
2014-2015	306	306 (100 %)	196 (64 %)	231 (76 %)	82 (27 %)	26 (9 %)

* lidocaína, levamisol, pseudococaína, benzocaína y procaína

Si observamos los datos en porcentaje, podemos apreciar una alta proporción de muestras adulteradas con fenacetina y cafeína (Tabla 3). Y a partir del 2015 se observa un aumento en la proporción de muestras adulteradas con aminopirina. De hecho, más concretamente, la aparición de aminopirina se constata a partir de noviembre de 2014.

Hemos detectado además una variedad de adulterantes en menor proporción como se muestran en la tabla 4.

Tabla 4: Cantidad de muestras según el contenido de adulterantes menos frecuentes

Año de incautación	Total de muestras	Cantidad de muestras				
		Levamisol	Lidocaína	Procaína	Benzocaína	Pseudococaína
2014	62	4 (6.5 %)	1 (1.6 %)	0 (0 %)	0 (0 %)	0 (0 %)
2015	244	12 (4.9 %)	4 (1.6 %)	4 (1.6 %)	1 (0.4 %)	1 (0.4 %)
2014-2015	306	16 (5.2 %)	5 (1.6 %)	4 (1.3 %)	1 (0.3 %)	1 (0.3 %)

En relación a la combinación de cocaína y adulterantes, la Tabla 5 muestra que aproximadamente un 50 % de las muestras contienen cafeína y fenacetina como adulterantes.

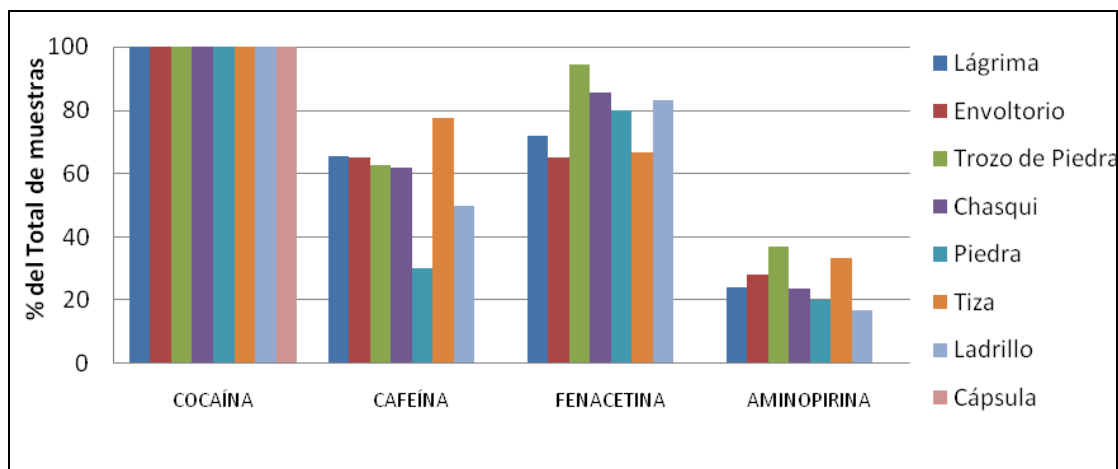
Tabla 5: Cantidad de muestras según la combinación de cocaína y los tres principales adulterantes

Año de incautación	Total de muestras	Cocaína + Cafeína	Cocaína + fenacetina	Cocaína + Cafeína + Fenacetina
2014	62	5 (8 %)	12 (19 %)	44 (71 %)
2015	244	36 (15 %)	51 (21 %)	122 (50 %)
2014-2015	306	41 (13.4 %)	63 (20.1 %)	166 (54.2 %)

En base a datos previos de nuestro grupo de trabajo habíamos constatado que cafeína era el único adulterante que aparecía en muestras de pasta base de cocaína analizadas desde el 2007 hasta principios del 2014. Sin embargo, el número de muestras analizadas era bajo en relación al presente análisis. En el presente estudio podemos constatar la presencia de fenacetina en las muestras de pasta base de cocaína.

Al analizar la composición cualitativa de los diferentes tipos de muestras (Figura 4), observamos que la presencia de los componentes más frecuentemente detectados (cocaína, fenacetina, cafeína y aminopirina) sufre variaciones menores, independientemente de que se trate de muestras incautadas prontas para comercializar al usuario final o para tráfico.

Figura 4: Frecuencia relativa de la aparición de los principales componentes de pasta base de cocaína según el tipo de muestra



De los datos cualitativos mostrados hasta el momento, se puede concluir que la totalidad de las muestras contienen cocaína y que en su mayoría están adulteradas. Los adulterantes más frecuentes fueron la cafeína y fenacetina y ambos estuvieron frecuentemente presentes en las mismas muestras. Es decir que el tipo de muestra que alcanza al usuario (por ejemplo: lágrima) contiene las tres sustancias.

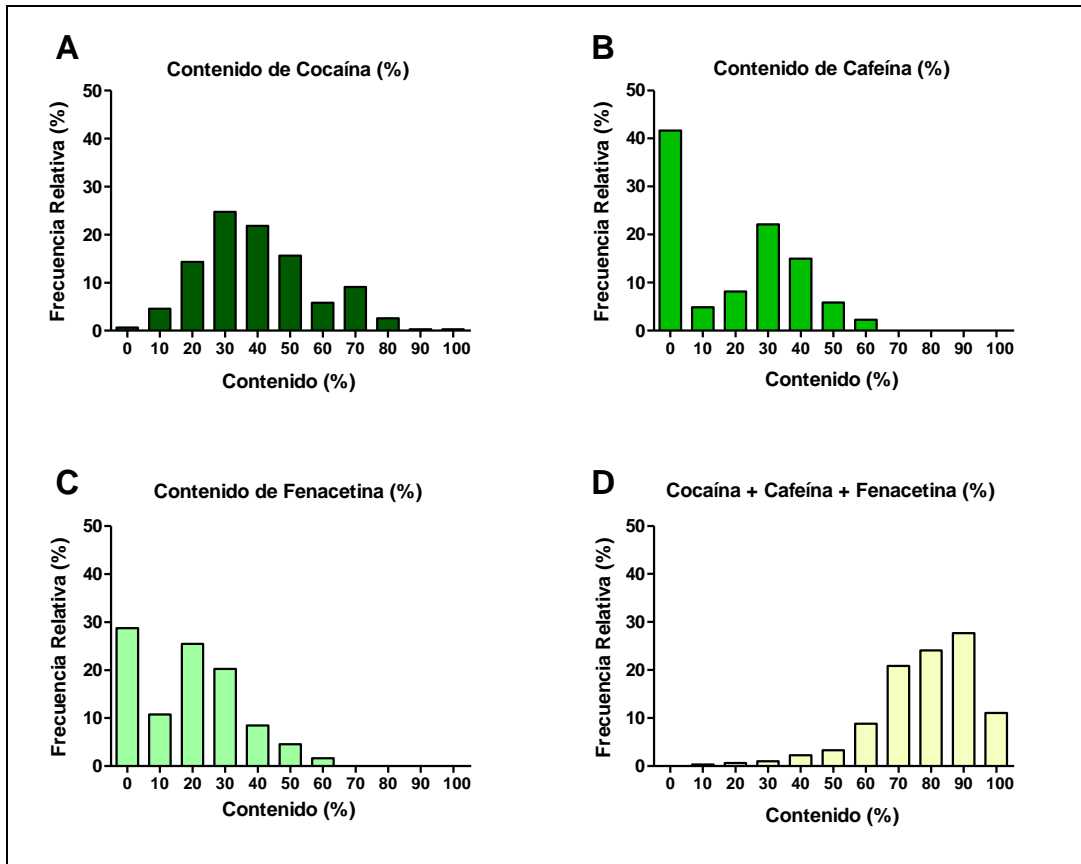
Es importante señalar que independientemente de los efectos negativos que genera *per se* un droga de abuso, en general no se consideran las acciones que pueden agregar los adulterantes. Muchos de ellos pueden considerarse sustancias que inducen severos riesgos, a corto o largo plazo, para la salud de la persona que consume drogas de abuso. Sumado a esto, en general, no hay suficiente investigación científica que cuantifique la naturaleza o el alcance de los efectos inducidos por la mayoría de los adulterantes usados [1]. Por lo tanto, es aún más relevante conocer la cantidad en la que aparecen estas sustancias para comprender finalmente el efecto farmacológico completo de la cocaína fumable y su nivel de toxicidad.

5. ANÁLISIS CUANTITATIVO

La Figura 5 muestra los rangos de concentraciones de cocaína, cafeína y fenacetina en las muestras analizadas de pasta base de cocaína. El análisis cuantitativo demostró que cocaína base aparece en un rango muy amplio de concentraciones superando incluso el 90 % en una muestra (Figura 5A), en tanto que fenacetina y cafeína se han detectado hasta en un máximo de 60 % (Figura 5B y C, respectivamente), mientras que levamisol y lidocaína en ningún caso superaron el 30 % (no se muestra en el gráfico). Si bien el rango de concentraciones de cocaína, cafeína y fenacetina es amplio, en promedio el contenido en las muestras es de 40, 30 y 26 %, respectivamente (Figura 5A-C).

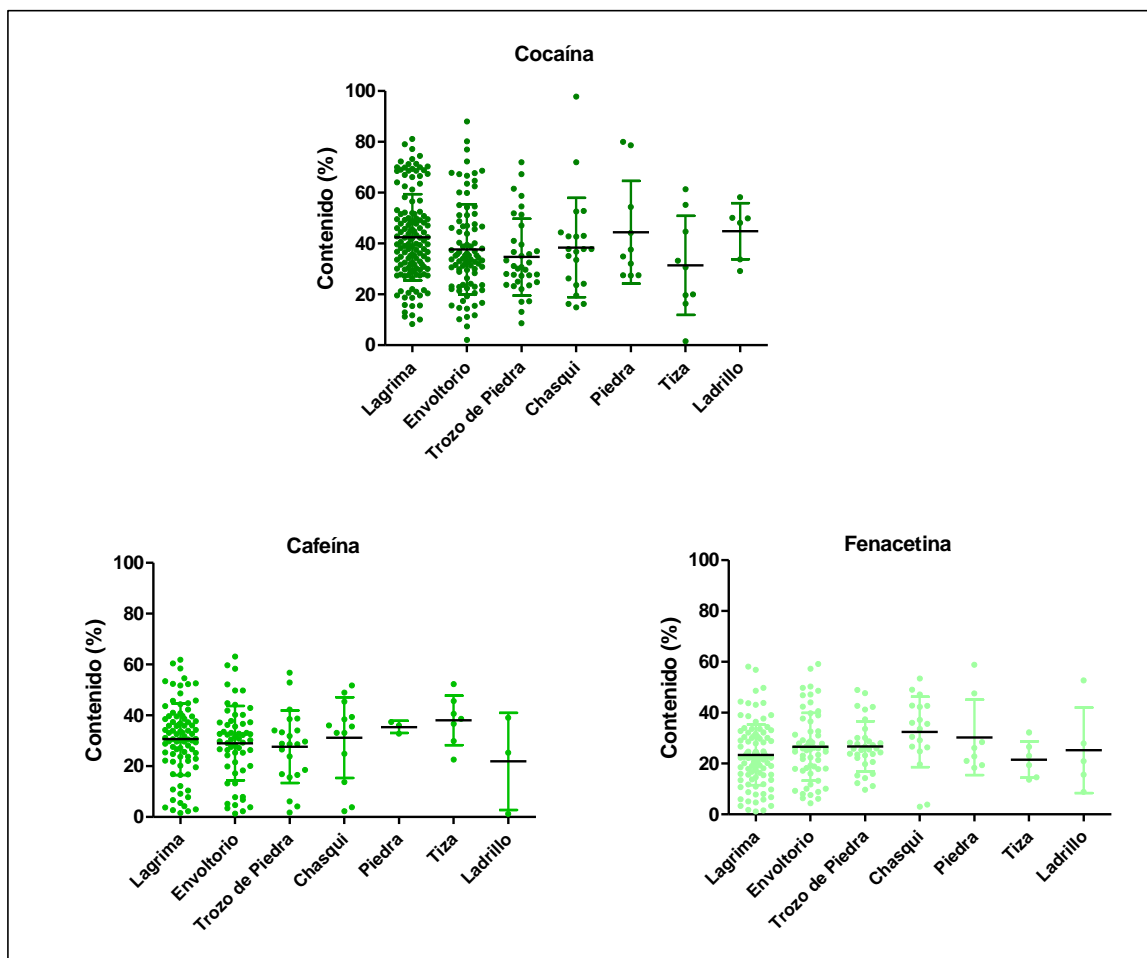
Al analizar la sumatoria de estos 3 componentes, se aprecia que la suma de estos representa más del 50 % de la composición en la mayoría de las muestras analizadas y que en promedio, para el total de las muestras analizadas, estos 3 componentes representan el 80 % del contenido de las muestras (Figura 5 D).

Figura 5: Contenido en cocaína, fenacetina y cafeína en muestras analizadas



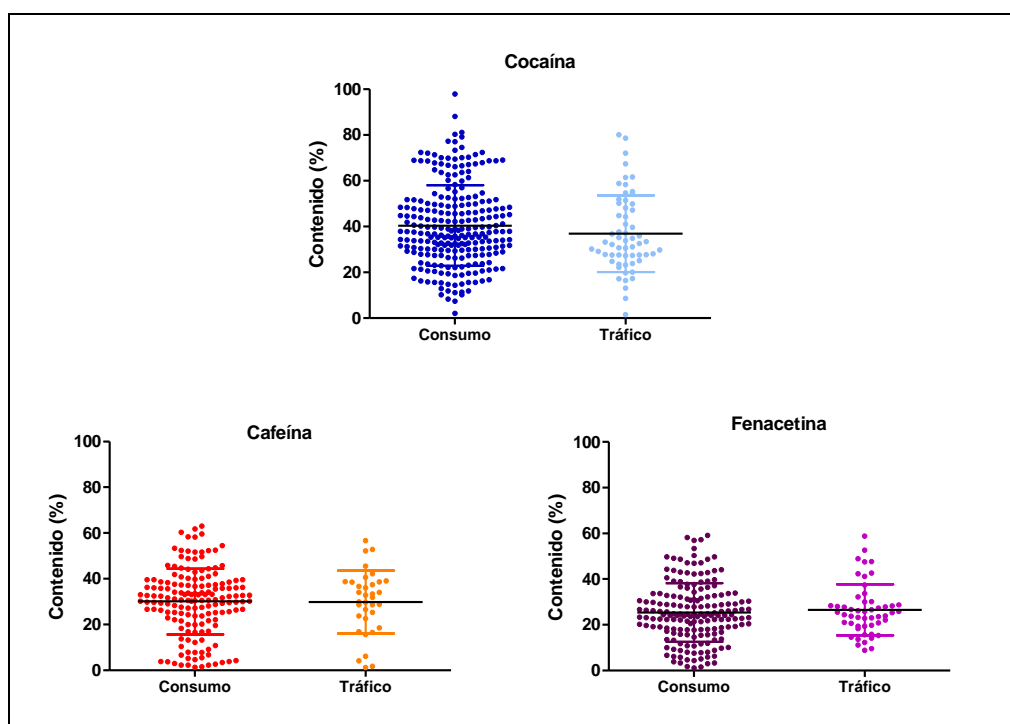
El porcentaje que estos componentes representan para las diferentes tipos de muestras analizadas no presenta una variación sustancial de acuerdo al perfil que se muestra en la Figura 6.

Figura 6: Contenido de cocaína, cafeína y fenacetina según el tipo de muestra analizado



Luego de agrupar las muestras según su destino, sea para consumo o para tráfico, tampoco parece haber evidentes diferencias desde el punto de vista cuantitativo (Figura 7).

Figura 7: Contenido de cocaína, cafeína y fenacetina en muestras de consumo y de tráfico



5. CONCLUSIONES GENERALES DEL ANÁLISIS QUÍMICO CUALI Y CUANTITATIVO

- Se identificaron varios adulterantes en las muestras seleccionadas y analizadas.
- En el total de muestras analizadas existe variabilidad en la pureza de cocaína y adulterantes. En relación a los análisis previos llevados a cabo en el IIBCE, la pureza fue disminuyendo con los años y se registraron otros adulterantes que antes no se detectaban (por ejemplo, fenacetina). Asimismo, la proporción de cocaína ha bajado en relación a años anteriores, hecho que concuerda con la instalación de una droga en un mercado.
- Considerando que las muestras analizadas corresponden a un área incautada, se podría suponer que reflejan lo consumido por los usuarios en el periodo 2014-2015. Asumiendo esto, el contenido químico del 90 % de las muestras que se han consumido en ese periodo consistió en una mezcla de cocaína, fenacetina y cafeína en una proporción similar (30 % cada una). Este hecho deja en evidencia la relevancia de los adulterantes en el efecto farmacológico y/o toxicológico de la cocaína fumable.
- La toxicidad de la fenacetina ha sido descrita por vía oral [2,3]. No hay datos que demuestren su toxicidad por vía inhalatoria.
- La interacción cocaína y cafeína ha sido determinada en modelos animales pre-clínicos [4,5]. En particular, en el modelo de auto-administración en roedores, que refleja aspectos reforzadores y motivacionales de la droga, hemos demostrado que cafeína potencia los efectos motivacionales y reforzadores de la cocaína a

proporciones que aparece en muestras de pasta base de cocaína [6]. Este resultado sugiere, en primer lugar, que la presencia de cafeína como adulterante de una cocaína fumable no es inocua; en segundo lugar, que cafeína parece estar siendo agregada de manera racional y, en tercer lugar, podría potenciar los efectos adictivos de la cocaína. Sin embargo, hasta la fecha no hay datos pre-clínicos publicados (o incluso clínicos) de los efectos inducidos por la interacción de cocaína y fenacetina o la combinación de cocaína, fenacetina y cafeína, bajo la vía de administración de inhalación pulmonar. Futuros experimentos deberán realizarse para comprobar si existe o no potenciación de los efectos reforzadores de la cocaína por fenacetina únicamente o por su interacción con cafeína. No existen además datos que demuestren la toxicidad que implica el agregado de adulterantes y su consumo por la vía de administración de inhalación pulmonar.

A continuación se enumeran algunas características de las sustancias adulterantes detectadas mayoritariamente en las muestras analizadas de cocaínas fumables:

1) Cafeína: la cafeína es la droga psicoactiva más popular del mundo debido a su propiedad psicoestimulante combinada con la ausencia de severos efectos secundarios [7]. La cafeína se encuentra en varios brebajes y alimentos comúnmente consumidos tales como el café, mate, té, refrescos, bebidas energizantes y chocolate. La propiedad psicoestimulante de la cafeína se debe a su capacidad de interactuar con la neurotransmisión química del cerebro, en diversas áreas y sobre diferentes sistemas de neurotransmisores, promoviendo funciones tales como la vigilia, la atención, estado de ánimo y la excitación motora. Ejerce dichas acciones principalmente actuando a nivel del cerebro por el bloqueo de receptores específicos para la adenosina (sustancia endógena del cerebro), clasificados como subtipos de receptores A1 y A2A [7]. La cafeína es considerada por algunos autores como una "droga de abuso atípica" ya que estrictamente cumple algunos, aunque no todos los criterios de dependencia del DSM-V (*Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders, Fifth Edition*). De hecho, la cafeína posee propiedades reforzadoras débiles, y existe poca evidencia de dependencia clínica [8,9]. Sin embargo, varias evidencias científicas demuestran su propiedad de potenciar las acciones psicoestimulantes y reforzadoras de la cocaína [4,5].

2) Fenacetina: la fenacetina posee propiedades analgésicas (dolor muscular) y antipiréticas. Su primer metabolito es el acetaminofen, que contribuye a los efectos de la fenacetina. La sobredosis de fenacetina puede producir metahemoglobinemia y hemólisis, por su naturaleza oxidante. También produce necrosis tubular renal. Se presenta con clínica de cianosis y pérdida de conocimiento, por hipoxia tisular [2,3]. La metahemoglobinemia es un trastorno poco frecuente, caracterizada por el aumento de las cantidades de hemoglobina en la que el hierro del grupo hemo se oxida a la forma (Fe³⁺) férrico [10]. Existen algunos casos de uso recreacional de cocaína y la aparición de metahemoglobinemia. Se piensa que en este caso se debe principalmente a la presencia de adulterantes de la cocaína, entre los que se considera a la fenacetina. Es considerada probablemente carcinogénica en humanos (grupo 2A) [11]. El motivo por el que se añade como adulterante es para potenciar el sabor amargo de la cocaína y mejorar el aspecto. La fenacetina le confiere brillo a la mezcla y simula el aspecto de la "alita de mosca" [12]. Sin embargo, es posible que se agregue por tener efectos motivacionales *per se*. En

este sentido, hay un único estudio que demuestra que la fenacetina, a dosis que genera efectos anti-nociceptivos, también produce un aumento de la motivación en los animales de experimentación [13]. Es importante destacar que no existen a la fecha estudios que evalúen la biodisponibilidad de fenacetina administrada por vía inhalatoria, sus efectos tóxicos ni comportamentales.

3) Aminopirina: la aminopirina o sus sinónimos amidopirina, aminofenazona, entre otros [14], es una pirazolona con propiedades analgésicas, anti-inflamatorias y antipiréticas. Se utilizaba comúnmente para aliviar el dolor y reducir la fiebre (analgésico y antipirético), hasta que se observó que en algunas personas producía agranulocitosis (enfermedad caracterizada por una gran reducción en el número de los leucocitos). Ejerce una acción prolongada en el tratamiento del dolor y la fiebre sin producir irritación gástrica ni cianosis. Se presenta en forma de polvo cristalino, blanco, inodoro, casi insípido y fácilmente soluble en agua. No existen a la fecha estudios que evalúen sus efectos tras ser administrada por vía inhalatoria.

4) Lidocaína: la lidocaína o xilocaína es un fármaco perteneciente a la familia de los anestésicos locales, concretamente del tipo de las amino amidas. Ejerce sus acciones anestésicas a través del bloqueo de canales de sodio alterando la transmisión de los potenciales de acción a lo largo de los axones, de esta manera bloquea las fibras nerviosas que transmiten el tacto, impulsos motores o quinestesia (sensación de movimiento de músculos, tendones y articulaciones) [15]. Por la misma propiedad de ser bloqueante de canales de sodio, la cocaína es un potente anestésico local. Es por esta razón que la lidocaína se usa como adulterante, dado que imita esta propiedad de la cocaína. A diferencia de la cocaína, lidocaína no bloquea los transportadores de dopamina y no se le atribuyen propiedades psicoestimulantes. Tampoco existen estudios que evalúen sus efectos tras la administración inhalatoria.

5) Levamisol: el levamisol ha sido identificado como un adulterante de la cocaína ilícita durante varios años. Es una imidazotiazol con propiedades antihelmínticas e inmuno-estimulantes. Utilizado previamente como un inmunomodulador en la artritis reumatoide y como terapia adyuvante en el tratamiento del cáncer colorectal. Ya no está disponible en América del Norte para su uso humano. Es posible que los productores o proveedores de cocaína piensen que el levamisol mejora los efectos de la cocaína o atenúa sus efectos secundarios. La cocaína logra sus efectos psicoactivos mediante el aumento de las concentraciones de dopamina en los centros eufóricos del cerebro, y los estudios en animales han encontrado que el levamisol también aumenta los niveles de dopamina en estas regiones. Es posible pensar que el levamisol puede potenciar los efectos eufóricos de la cocaína aumentando aún más los niveles de dopamina del cerebro. Sin embargo, no hay evidencias concretas respecto a esta acción. Cocaína adulterada con levamisol puede ser la causa de fiebre y agranulocitosis en algunos pacientes. Existe la advertencia a los clínicos de considerar una posibilidad de uso de cocaína y específicamente de uso de cocaína adulterada con levamisol en pacientes que padecen agranulocitosis sin razón aparente [16].

Referencias bibliográficas

- [1] Galvalisi M, Prieto JP, Abin-Carriquiry JA, Scorza C. Adulterantes utilizados comúnmente en drogas de abuso. En Sistema de Alerta temprana, <http://www.infodrogas.gub.uy>, 2015.
- [2] McCredie M, Stewart JH, Day NE. Different roles for phenacetin and paracetamol in cancer of the kidney and renal pelvis. *Int J Cancer* 53: 245-9, 1993.
- [3] Millar J, Peloquin R, de Leeuw N. Phenacetin-induced hemolytic anemia. *Can Med Assoc J*, 106: 770-5, 1972.
- [4] López-Hill X, Prieto JP, Meikle MN, Urbanavicius J, Abin-Carriquiry JA, Prunell G, Umpiérrez E, Scorza MC. Coca-paste seized samples characterization: chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behav Brain Res.* 221(1):134-41, 2011.
- [5] Prieto JP, Galvalisi M, López-Hill X, Meikle MN, Abin-Carriquiry JA, Scorza C. Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *Am J Addict.* 24(5):475-81, 2015.
- [6] Prieto JP, Scorza C, Serra GP, Perra V, Piras G, Galvalisi M, Abin-Carriquiry JA, Valentini V. Cocaine motivational value is enhanced when co-administered with caffeine: relevance of adulterants in reinforcement. *Pyschopharmacology* 233 (15-16): 2879-89, 2016.
- [7] Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cell. Mol. Life Sci.* 61: 857-872, 2004.
- [8] Daly J, Fredholm B. Caffeine-an atypical drug of dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 51: 199-206, 1998.
- [9] Strain E, Griffiths R. Caffeine dependence: fact of fiction? *Journal of the Royal Society of Medicine*, 88: 437-440, 1995.
- [10] Hunter L, Gordge L, Dargan PI, Wood DM. Methaemoglobinaemia associated with the use of cocaine and volatile nitrites as recreational drugs: a review. *Br J Clin Pharmacol.* 72(1): 18-26, 2011.
- [11] Seventh Annual Report on Carcinogens. Link: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/search2/r?dbs+hsdb:@term+@rn+@rel+62-44-2>
- [12] <http://energycontrol.org/>
- [13] Abbott FV, Hellems GC. Phenacetin, acetaminophen and dipyron: analgesic and rewarding effects *Behavioural Brain Research* 112:177-186, 2000.
- [14] http://www.chemicalbook.com/CASEN_58-15-1.htm
- [15] Matthews JC, Collins A. Interactions of cocaine and cocaine congeners with sodium channels. *Biochem Pharmacol.* 32(3): 455-60, 1983.
- [16] Zhu NY, MD; LeGatt DF, Turner R. Agranulocytosis after Consumption of Cocaine Adulterated With Levamisole. *Ann Intern Med.* 150(4): 287-289, 2009.

TRABAJO CIENTÍFICO

Caffeine Induces a Stimulant Effect and Increases Dopamine Release in the Nucleus Accumbens Shell Through the Pulmonary Inhalation Route of Administration in Rats

Martín Galvalisi¹ · José Pedro Prieto¹ · Marcela Martínez^{2,3} · Juan Andrés Abin-Carriquiry^{2,3} · Cecilia Scorza¹

Received: 15 June 2016/Revised: 11 August 2016/Accepted: 30 August 2016
© Springer Science+Business Media New York 2016

Abstract Oral, intraperitoneal, or intravenous have been the common routes of administration used to study the behavioral and neurochemical pharmacology of caffeine, one of the most widely used psychoactive substances worldwide. We have reported that caffeine is an active adulterant frequently found in coca-paste (CP)-seized samples, a highly addictive form of smokable cocaine. The role of caffeine in the psychostimulant and neurochemical effects induced by CP remains under study. No preclinical animal studies have been performed so far to characterize the effects of caffeine when it is administered through the pulmonary inhalation route. Caffeine (10, 25, and 50 mg) was volatilized and rats were exposed to one inhalation session of its vapor. The stimulant effect was automatically recorded and plasmatic levels of caffeine were measured. Caffeine capability (50 mg) to increase extracellular dopamine (DA) levels in nucleus accumbens shell was also studied by *in vivo* microdialysis in non-anesthetized animals. A dose-dependent stimulant effect induced by volatilized caffeine was observed and this effect was directly related with caffeine plasmatic levels. A significant

increase in the extracellular DA was achieved after 50 mg of volatilized caffeine exposure. This is the first report showing pharmacological acute effects of caffeine through the pulmonary inhalation route of administration and suggests that this could be a condition under which caffeine can elevate its weak reinforcing effect and even enhance the psychostimulant effect and abuse liability of smokable adulterated psychostimulant drugs.

Keywords Adulteration · Pulmonary inhalation · Drugs of abuse · DA transmission · GC-MS

Introduction

Adulteration of drugs of abuse involves the intentional addition of pharmacologically active substances in order to use less of the intended product without making the user aware (Hoffman et al. 2008; Broséus et al. 2016). The specific adulterants used are selected depending on the type of drug of abuse and how it is consumed. Caffeine is one of the substances most frequently found in seized samples of psychostimulants, including cocaine hydrochloride and even in smoked forms of cocaine, like crack and coca-paste (CP) (Pawlik and Mahler 2001; Evrard et al. 2010; Cole et al. 2011; López-Hill et al. 2011; Fukushima et al. 2014; Prieto et al. 2015). It has been suggested that caffeine is added not only to increase the weight and volume but also to mimic or potentiate the stimulant and the reinforcing effects of cocaine (Cole et al. 2011; Broséus et al. 2016). In accordance with these evidences, we have previously demonstrated that caffeine has a significant role in the acute stimulant effect induced by different CP-seized samples in rats (López-Hill et al. 2011). We also observed that the concomitant administration of caffeine and cocaine

Martín Galvalisi and José Pedro Prieto have contributed equally to this work.

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

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

² Departamento de Neuroquímica, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

³ Plataforma de Servicios Analíticos, Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable, Montevideo, Uruguay

significantly enhanced and accelerated the expression of cocaine-induced sensitization, as well as potentiated its reinforcing effect and drug-seeking behavior (Prieto et al. 2015, 2016). All these effects were observed using intraperitoneal (i.p.) or intravenous routes of administration, although behavioral effects of caffeine administered through the pulmonary inhalation route remained to be studied. To our knowledge, no preclinical assays showing caffeine central actions have been performed so far using this route of administration.

It is widely known that dopamine (DA) transmission in the shell of the nucleus accumbens (NAc shell) is a key factor in rewarding/reinforcing and motivational actions of cocaine and other drugs of abuse which lead to abuse and dependence in humans (Di Chiara and Imperato 1988; Koob and Bloom 1988; Kalivas and Volkow 2005). Moreover, it has been proposed that the propensity to develop addiction to a particular drug depends on how fast the substance reaches the brain pointing up the relevance of the route of administration (Samaha and Robinson 2005). Taking into account that a weak reinforcing property has been associated to caffeine (Griffiths and Woodson 1988; Nehlig 1999), it could be hypothesized that volatilized caffeine can increase extracellular DA in NAc shell and this condition aids to elevate its reinforcing property or, even more, to enhance the rewarding/reinforcing effects of drugs of abuse which acts as an active adulterant. However, there is contradictory evidence concerning the effect of caffeine on DA release in the NAc shell (Solinas et al. 2002; Acquas et al. 2002; De Luca et al. 2007).

Based on the above data, the present paper was designed (a) to study the stimulant effect induced by volatilized caffeine, and (b) to find out if volatilized caffeine is able to induce an increase in extracellular DA levels in NAc shell in rats.

Methods

Subjects

Wistar male rats (IIBCE animal facilities, Montevideo) weighing 250–310 g were employed. All animals were housed in groups of five in plastic cages ($50 \times 37.5 \times 21$ cm³) and kept under controlled conditions (temperature 22 ± 2 °C, 12 h 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 and Doses

Caffeine was obtained from Sigma-Aldrich (Germany). Doses of 10, 25, and 50 mg of caffeine were tested. These

doses were chosen on the basis of preliminary studies showing that 50 mg of volatilized cocaine base (taken as a psychostimulant drug standard) induced a clear stimulant effect in rats (Galvalisi et al. 2015). Caffeine-d3 was provided by Cerilliant Corporation (USA).

Procedure of Caffeine Volatilization

The method applied to volatilize caffeine reproduces at the lab the procedure used by consumers to smoke CP (or crack). Based on previous reports, the sequence of procedures was as follows (Herculiani et al. 2009; Galvalisi et al. 2015). The volatilization device consisted of a stainless-steel tube (length 10 cm, i.d. 0.6 mm) filled with steel wool used in order to keep the caffeine at the top of the tube. The tube was closely connected to a plastic syringe (60 ml) through which a vacuum system was set up (representing the human's respiratory system). At the end of the tube, a lighter was turned on and caffeine was heated until the vapor generation started. At this point, the syringe piston was moved away and the vapor immediately reached the syringe. By means of this volatilization procedure, behavioral assays and the caffeine identification in vapor samples were performed (Fig. 1a–c).

Procedure of Behavioral Assays

Caffeine volatilization was done using an extraction hood. The caffeine vapor collected in the plastic syringe was injected through a valve placed in one of the walls of a whole-body chamber (inhalation chamber; $23 \times 15 \times 10$ cm³) where animals were separately placed and exposed acutely to different doses of volatilized caffeine for 10 min (Fig. 1b). Animals belonging to the control group had no access to the drug since they were subjected to the mentioned volatilization procedure although only the steel wool was heated. After the exposure to the volatilized drug—or control—animals were removed from the inhalation chamber and placed in an Open Field paradigm (OF, a square box of 60×60 cm² with red 40-cm-high acrylic sides) associated to the EthoVision XT 7 software (Noldus, The Netherlands; Fig. 1c). Using this video tracking software, we specifically measured the horizontal locomotor activity defined as the total distance moved in meters (m) and velocity of movement. Locomotor and exploratory (number of rearings) activities were registered during 30 and 15 min, respectively. During all the experiments the inhalation chamber and the OF were cleaned with alcohol 30 % before placing the following rat. All experiments were done between 9 a.m. and 3 p.m. In order to measure plasmatic caffeine levels, plasma samples of each animal (control and treated) were collected immediately after the end of behavioral recordings.

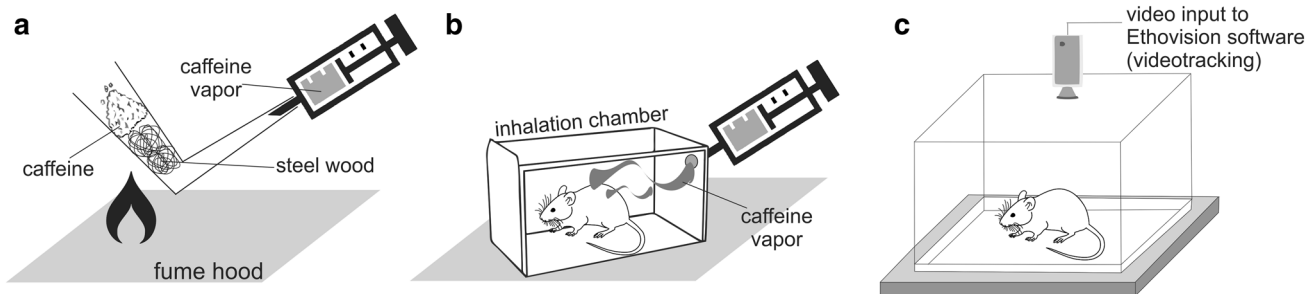


Fig. 1 Schematic representation of the caffeine volatilization procedure. In **a** and **b**, a stainless-steel tube containing caffeine connected to a syringe filled with the caffeine vapor and an animal exposed to the caffeine vapor into the inhalation chamber are shown,

respectively. Both procedures were done under an extraction hood (dark gray shade). In **c**, a rat was placed in an Open Field for recording of its behavioral response after the exposition to the caffeine vapor

Blood and Plasma Sample Collection

Animals were killed by decapitation and trunk blood was collected in plastic Falcon tubes containing a solution of citric acid (0.05 mM), sodium citrate (0.09 mM), and sodium fluoride (0.2 mM). Blood was then centrifuged (Centrifuge, Thermo Scientific) for 15 min at 3000 g and 4 °C. The recovered plasma was stored at −80 °C until assay.

GC–MS Measurements

Identification and quantification of caffeine (in vapor and plasma samples, respectively) was performed using a gas chromatography mass spectrometry (GC–MS–QP 2010 Ultra, Shimadzu Corporation) equipped with a HP-5MS column (30 m large \times i.d. 0.25 mm \times 0.25 μ m; Agilent J and W GC Columns). Helium as carrier gas was infused at a flow rate of 1.39 ml/min. The injector temperature, the ion source, and the interface were kept at 300 °C. Analysis of samples was done using the software GCMSolution Vs 2.71. The qualitative analysis of caffeine vapor samples was done as follows. Using an extraction hood, a Hamilton syringe (250 μ l; Sigma-Aldrich) was charged with the caffeine vapor (collected as mentioned above) and immediately injected (50 μ l) into the GC–MS, using the total ion current (TIC) and split methods. The temperature program was started at 90 °C (3 min), followed by a 10 °C/min ramp to 300 °C (5 min). Plasma sample preparation for the quantitative analysis of caffeine levels by GC–MS was performed as follows: 50 μ l of caffeine-d3 (as internal standard; 5 μ g/ml) was added to 450 μ l of plasma. The mixture was dissolved in 500 μ l of methanol and centrifuged for 2 min to 12000 g. The supernatant was extracted and mixed with 1 ml of Milli-Q water and applied to a C18 solid-phase extraction (SPE) column (200 mg/3 ml) and forced to pass through at 1 ml/min by applying reduced pressure. The column had been previously activated and conditioned with 3 ml of methanol and

3 ml of Milli-Q water. After application of the sample, the column was washed with 1 ml of Milli-Q water and dried in a vacuum manifold for 10 min at 20 mmHg. Analytes were firstly eluted with chloroform (1 ml) and then with a mixture of 90 % chloroform, 8 % methanol, and 2 % formic acid (2 ml). The second eluate was evaporated to dryness in a Speedvac (Labconco, USA) and then reconstituted in the chloroform obtained from the first eluate. Plasma sample was injected (1 μ l) into the GC–MS, and a splitless injection with a split valve off-time (3 min) was employed. The temperature program was started at 90 °C (6 min), followed by a 10 °C/min ramp to 280 °C (4.3 min) and a second 30 °C/min ramp to 315 °C (12 min). Quantifier and qualifier ions used for each analyte were selected on the basis of their abundance and mass-to-charge ratio (m/z). Because of their reproducibility and lack of interference, high mass ions were selected when possible. The ions selected for each compound studied were m/z 194, 109 (caffeine) and m/z 197, 111 (caffeine-d3). The selected ions were used for quantization. Upon selection of ions, the MS was run in selected ion monitoring (SIM) mode. Detection limit was estimated at 50 ng/ml.

Procedure of In Vivo Intra-accumbal Microdialysis Assay

Rats were anesthetized with a combination of ketamine (90 mg/kg, i.p.) and xylazine (5 mg/kg, i.p., Konsol König S.A Laboratory). A dialysis probe (MD-2200, 2 mm membrane length, BAS, USA) was implanted into the NAC shell following these coordinates (in mm): AP +1.9, L −1.0, DV −7.6 (Paxinos and Watson 2005). After surgery, animals were housed individually. Microdialysis experiments were conducted at least 20 h after surgery in a freely moving condition (Díaz-Mataix et al 2005). On the experimental day, each animal was perfused at a constant flow rate of 1.5 μ l/min with artificial cerebrospinal fluid (aCSF: 125 mM NaCl; 1.26 mM CaCl₂; 2.5 mM KCl;

1.18 mM MgCl₂). Dialysate samples were collected every 20 min during all the experiment (30 µl each). After 100 min of a stabilization period, four fractions were collected to obtain basal values before the volatilized caffeine exposure. At this moment, each animal was placed into the inhalation chamber where the dialysis samples collection continues during the caffeine volatilization (Fig. 1b). Ten min later, animals were removed from the inhalation chamber and returned to the dialysis cage. Animals were not disconnected during the dialysis experiment. Control animals were subjected to the same procedure although only the steel wool was heated. DA and 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) concentration in dialysate samples were immediately determined by High Performance Liquid Chromatography (HPLC) equipped with a degassing unit (DGU-20A5R; Shimadzu, USA), a binary HPLC pump (1525; Waters, USA), an electrochemical detector with a temperature controller (2465, Waters, USA), and a C18 column (3 µm particle size; Phenomenex, USA). The mobile phase consisted of citric acid (0.15 M), sodium octyl sulfate (0.6 mM), 3 % acetonitrile, and 1.5 % tetrahydrofuran at pH 3.0, and was infused at a flow rate of 0.3 ml/min. Oxidation potential was set of +650 mV versus Ag/AgCl. The analytical column and the electrochemical flow cell were maintained at 35 °C. At the end of the experiments, brains were processed for histological procedures in order to confirm the localization of each dialysis probe.

Statistical and Data 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. Linear regression was applied. Statistical significance was set at $P < 0.05$.

Results

Identification of Caffeine in Vapor and Plasma Samples

In order to discard the presence of combustion products in caffeine vapor, a representative chromatogram of caffeine vapor samples injected into the GC–MS is shown (Fig. 2a). The qualitative analysis did not reveal any other active substance suggesting that the behavioral and neurochemistry effects shown below are associated with caffeine inhalation. A representative GC–MS chromatogram of

plasma samples from caffeine-treated animal is also shown (Fig. 2b).

Stimulant Effect Induced by Volatilized Caffeine

Figure 3a–c shows the behavioral effect induced by volatilized caffeine. Stimulant effect was evaluated by changes in the following parameters: distance moved, velocity of movement, and number of rearings (exploratory activity). For distance moved (Fig. 3a), ANOVA revealed a significant effect of caffeine [$F_{(3,24)} = 10.43$, $P < 0.0001$] compared to the control group. Post hoc analysis showed that the distance moved of rats treated with 50 mg of caffeine was significantly higher than control group ($P < 0.001$), caffeine 25 mg ($P < 0.01$), and 10 mg ($P < 0.01$). The effect of lower doses of caffeine (10 and 25 mg) was not significantly different compared to the control group. Distance moved profile was similarly accompanied with changes in the velocity of movement and rearing behavior. ANOVA revealed (Fig. 3b) also a significant effect of caffeine on velocity of movement compared to untreated animals [$F_{(3,24)} = 10.60$, $P < 0.001$]. Post hoc analysis showed that animals stimulated with caffeine 50 mg were faster than control group ($P < 0.001$), caffeine 25 mg ($P < 0.01$), and caffeine 10 mg ($P < 0.01$). Again, the effects of lower doses of caffeine (10 and 25 mg) were not significantly different from control animals. Rearing activity (Fig. 3c) also changed after caffeine exposure [$F_{(3,24)} = 4.54$, $P < 0.05$]. Caffeine at 50 mg ($P < 0.05$) but not at 10 or 25 mg doses significantly increased the number of rearings.

In order to confirm that the animal behavioral response is related with the caffeine inhalation, two correlation analyses were done (Fig. 4a, b). Firstly, the corresponding plasmatic levels of animals treated with each dose of caffeine are shown in Fig. 4a. It can be seen that average plasmatic levels of caffeine increased accordingly to the doses of caffeine administered ($P < 0.001$ for caffeine 50 versus 10 and 25 mg). A direct and significant relation between both variables was achieved ($r^2 = 0.95$, $P < 0.05$). Secondly, the average of the distance moved (selected as the main parameter reflecting the stimulant effect) also significantly correlated with the average plasmatic levels of caffeine ($r^2 = 0.92$, $P < 0.05$, Fig. 4b).

DA Release Induced by Volatilized Caffeine

Figure 5a, b illustrates DA and DOPAC extracellular levels in the NAc shell, respectively, of animals exposed to 50 mg of volatilized caffeine versus control animals. Basal conditions of DA and DOPAC levels in dialysate samples of NAc shell were 10.1 ± 3.1 and 2715 ± 355.8 pg/

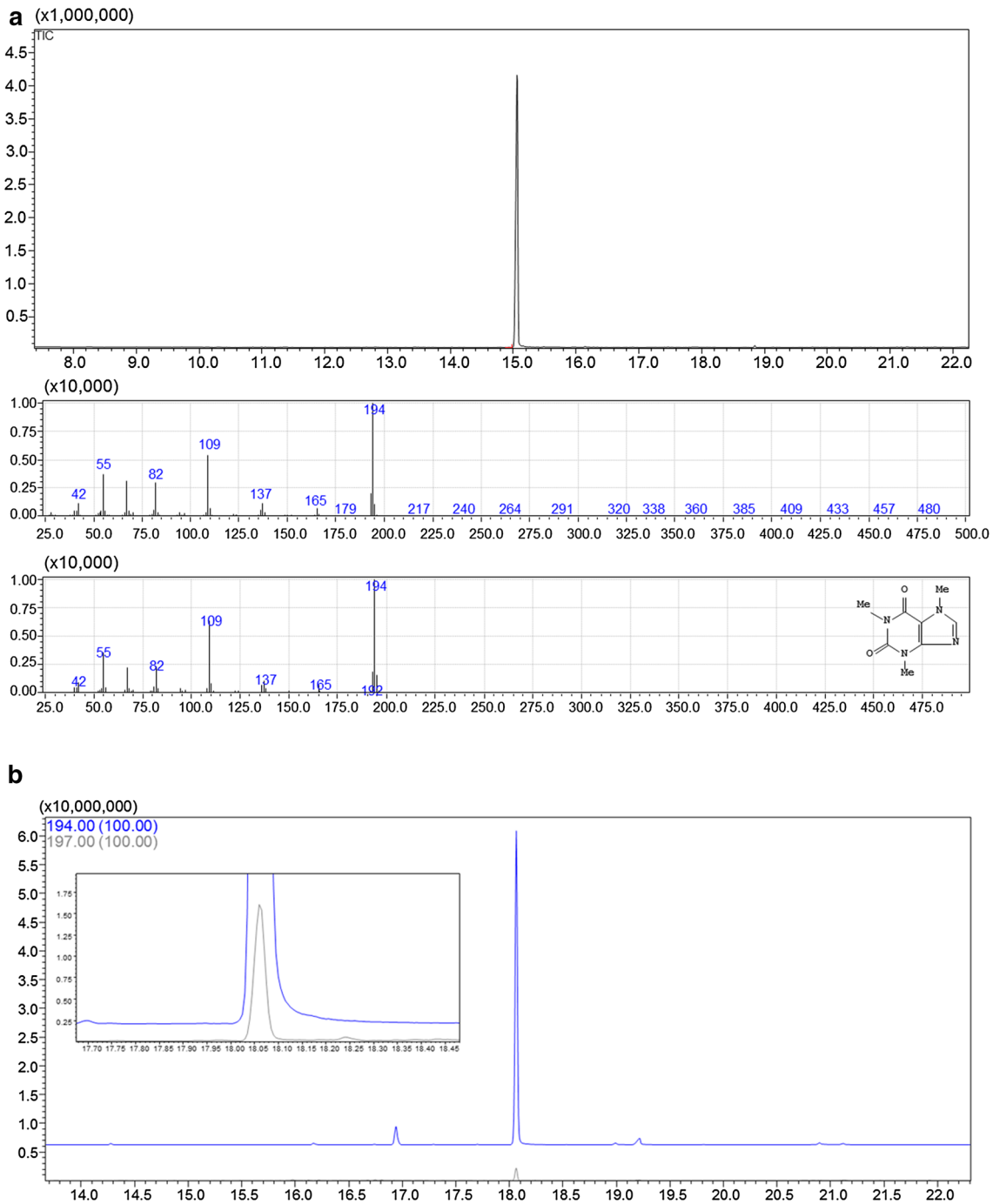


Fig. 2 Representative GC–MS chromatograms of caffeine. In **a**, TIC chromatogram (*upper*) and its mass spectrum of the caffeine vapor sample (*middle*), and the reference mass spectrum of caffeine (*lower*).

In **b**, a representative SIM chromatogram of caffeine plasma sample with the caffeine-d3 (shown in the *inset*)

fraction, respectively. DA levels in the control group were stable along the entire experimental session. In contrast, a significant increase in extracellular DA levels was observed after the exposure to caffeine (Fig. 5a). Two-way ANOVA revealed a significant effect for treatment ($F_{1,8} = 11.53$, $P < 0.01$), for time ($F_{10,80} = 3.13$, $P < 0.01$), and the interaction treatment \times time

($F_{10,80} = 3.92$, $P < 0.001$). Pos hoc Newman Keuls demonstrated that the effect of caffeine was evident immediately after its exposure and reached statistical significance after 40 min ($P < 0.05$ and $P < 0.01$). The effect of caffeine lasted 100 min, whereas at 120 min began to decrease ($P < 0.05$). The extracellular level of DOPAC was not changed by caffeine (Fig. 5b). Figure 6 shows a

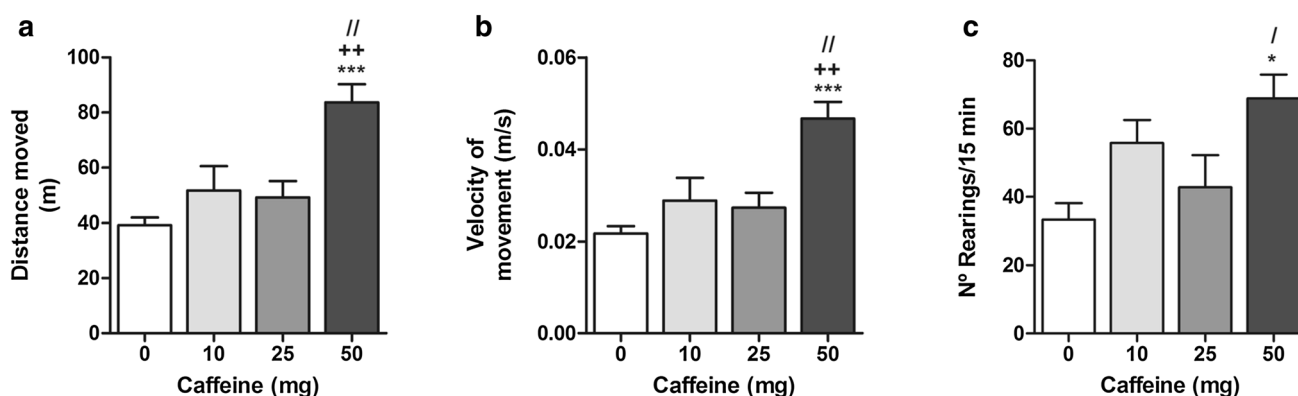


Fig. 3 Stimulant effect induced by volatilized caffeine. Distance moved (m), velocity of movement (m/s), and number of rearings (**a–c**, respectively) in caffeine-treated animals (10, 25, 50 mg) or control group (0). Each parameter was evaluated immediately after its

volatilization (10 min exposed). Mean \pm SEM. One-way ANOVA, followed by Newman–Keuls test. *versus control group; +//versus caffeine group. * $P < 0.05$; +// $P < 0.01$; *** $P < 0.001$. $N = 5–7$ for each group

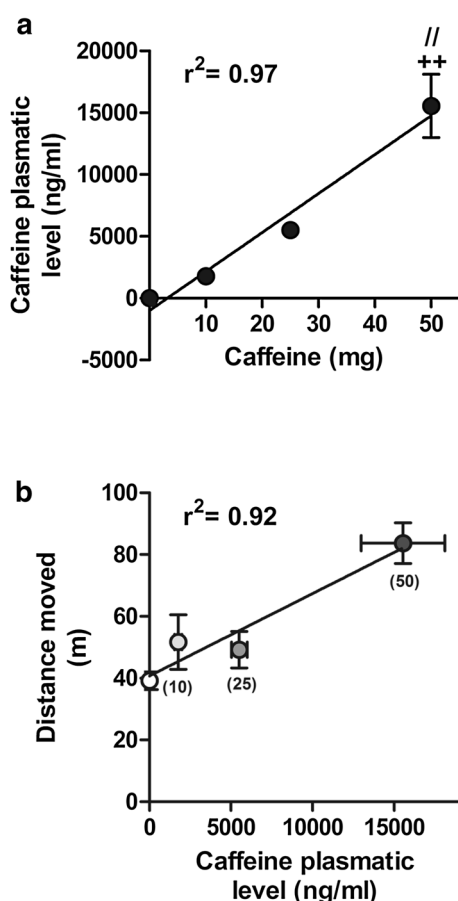


Fig. 4 Correlation with caffeine plasma levels and caffeine doses (in **a**; $r^2 = 0.97$, $P < 0.05$), and distance moved (m) and caffeine doses (in **b**; $r^2 = 0.92$, $P < 0.05$). In **a** and **b**, data are shown as mean \pm SEM. In **a**, One-way ANOVA, followed by Newman–Keuls test was applied; +//versus caffeine doses; +// $P < 0.01$. In **b**, each caffeine doses are indicated in brackets. $N = 5–7$ for each group

schematic diagram of the cannula localization within the NAc shell. Only those animals with a correct anatomical localization were included in the experiment (10/12).

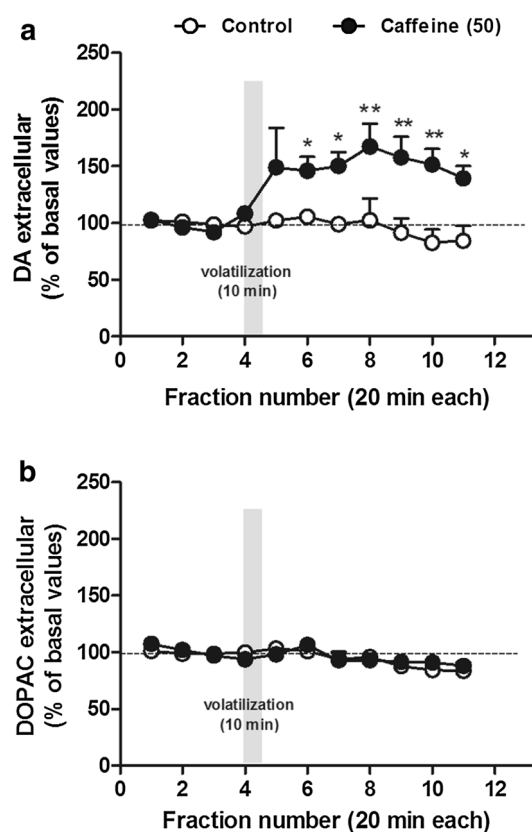


Fig. 5 Effect of caffeine on the DA and DOPAC extracellular levels in the NAc shell. Animals were exposed to 50 mg of volatilized caffeine (caffeine, closed circles, **a**) or control animals (open circles, **b**) during 10 min. Gray bar indicates the volatilization period (10 min). Mean \pm SEM. Two-way ANOVA followed by Newman–Keuls. *versus control. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. $N = 5$ per group

Discussion

Results generated in this study showed a dose-dependent stimulant effect and a significant increment in extracellular DA levels in NAc shell after an acute treatment of caffeine

administered through the pulmonary inhalation route of administration. Although it was already known that caffeine could be volatilized (Gostic et al. 2009), we report the first experimental evidence showing that caffeine exerts its pharmacological effects after pulmonary inhalation. The fact that the caffeine behavioral effect was directly accompanied by variations of caffeine plasma levels firstly suggests that caffeine correctly reaches the brain after pulmonary inhalation, and secondly validates the applied methodology.

A large amount of experimental evidence supports a key role of DA transmission in the psychostimulant effects of caffeine in animals and humans (Garrett and Griffiths 1997; Fredholm and Svenningsson 2003; Cauli and Morelli 2005; Ferré 2008; Volkow et al. 2015; Ferré 2016). Accordingly, we found that the most behaviorally relevant dose of caffeine (50 mg) significantly increased the extracellular levels of DA in the NAc shell without affecting the DAergic metabolism, since no changes on DOPAC extracellular levels were observed. It has been reported that caffeine could inhibit monoamine oxidase-B (MAO-B) activity causing the decrease in extracellular levels of monoamine metabolites (Petzer et al. 2013). However, in our experimental design, the MAO-B inhibition by caffeine seems negligible. Since the neurochemical response on intra-accumbal DA levels could be underlying the

stimulant effect induced by caffeine at this specific dose (50 mg), it cannot be ruled out that this effect could be associated to the caffeine positive reinforcing effect.

Caffeine exhibits weaker reinforcing properties compared to prototypical psychostimulants and other common addictive substances, and these actions have been demonstrated in experimental animal and humans studies using other routes of administration than assayed here (Strain and Griffiths 1995; Nehlig 1999; Ferré 2016). Taking into account that preferential release of DA in the shell of the accumbens has been suggested to be causally associated to the reinforcing effects of psychostimulants (Di Chiara and Imperato 1988; Volkow et al. 2009) it may be possible that, under a fast route of administration (pulmonary inhalation), caffeine is able to induce a higher reinforcing effect than through other routes assayed. It has been reported that severity of dependence to drugs of abuse is influenced by the route of administration (Gossop et al. 1992). Indeed, the speed at which drugs of abuse enter the brain is a key parameter that affects drugs' reinforcing effects (Volkow et al. 1995). It has been proposed that the rapid delivery of a drug to the brain facilitates its capacity to induce various forms of neurobehavioral plasticity leading to a greater incentive motivation for the drug (i.e., sensitization) and contributing to its compulsive use (Samaha and Robinson 2005). Since chronic use of caffeine may lead to the development of mild psychological and physical dependence (Morelli and Simola 2011), we speculated that the consumption of caffeine in a smoking form could increase its reinforcing effects and consequently its abuse liability. Nevertheless, additional behavioral studies should be done combining specific paradigms (self-administration or ultravocalizations) and pulmonary inhalation route of administration to verify this assumption. Controversial evidences about the induction of changes in extracellular DA levels in NAc shell by caffeine have been provided (Acquas et al. 2002; Solinas et al. 2002; Cauli and Morelli 2005; De Luca et al. 2007; Morelli and Simola 2011; Malave and Broderick 2014). However, our results support those evidences which found an increment of DA release even using other route of administration. In the present paper, the mechanism of action by which caffeine increased DA release was not determined. Numerous experimental data indicate that heteromers of A2A and dopamine D2 receptors, localized in a striatal neuronal population, are responsible for the interaction of adenosinergic and dopaminergic neurotransmission which is involved in the psychomotor and reinforcing effects of caffeine (Ferré 2016).

Several preclinical data have strongly suggested that, acutely or chronically consumed, caffeine is able to potentiate psychostimulant and rewarding effects induced by prototypical psychostimulants, and may increase the vulnerability to dependence and relapse. We have reported

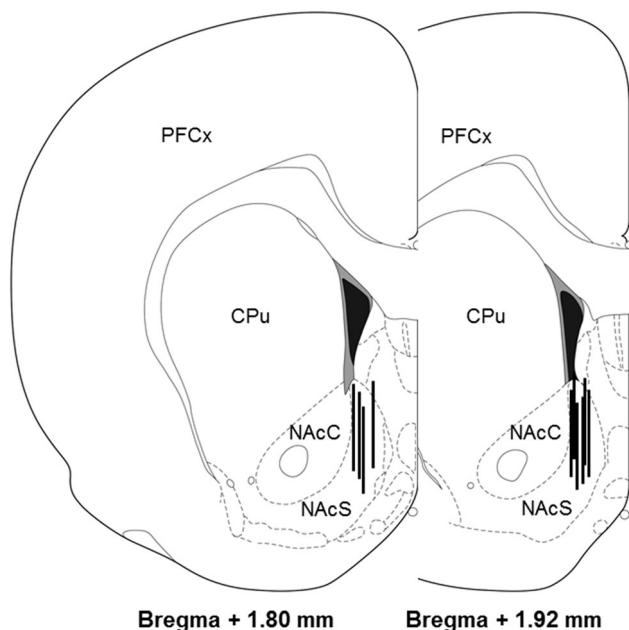


Fig. 6 Representative localization of cannula sites (*vertical black lines*) into the nucleus accumbens shell. Figure shows a schematic diagram of coronal sections at two different levels (-1.80 and -1.92 mm from Bregma) according to Paxinos and Watson (2005) atlas. $N = 10$ (control and treated animals). PFCx prefrontal cortex, NAcS and NAcC nucleus Accumbens shell and core, respectively, CPu caudate putamen

that caffeine was a major adulterant in CP-seized samples (López-Hill et al. 2011; Prieto et al. 2015) and it can reach high percentages related to cocaine alkaloid content. In fact, in some CP-seized samples, caffeine content was higher than cocaine (Galvalisi et al. 2015). We have demonstrated that caffeine significantly potentiates the acute locomotor effects and sensitization induced by CP samples administered to rats (López-Hill et al. 2011; Prieto et al. 2015). Although these evidences have been reported using an i.p. route of administration, we highlighted the contribution of active adulterants in the high dependence induced by CP and other adulterated psychostimulants. In this context, other several studies have reported serious drug interaction with caffeine, i.e., caffeine may increase adverse effects induced by psychostimulants either on neural functions or peripheral organs. Forensic analyses of seized illicit drug samples have reported the mix of caffeine with psychostimulants (Cole et al. 2011; Parrot 2004) including cocaine, amphetamine, methylenedioxyamphetamine (Ėcstasy; MDMA), and methylenedioxyamphetamine (ĖlovĖ; MDA). It has been described that caffeine is able to promote the acute and long-term toxicity associated with MDMA and MDA in rats (McNamara et al. 2006). Besides, caffeine can potentiate the activation of microglia and astroglia in the rat striatum leading to the exacerbation of neurotoxic effects induced by both entactogens (Khairnar et al. 2010). Moreover, striatal alterations in the gene expression of adenosinergic, dopaminergic, and glutamatergic receptors were evidenced in mice treated with a combined solution of cocaine and caffeine (Muñiz et al. 2016). Moreover, caffeine can potentiate the toxic effects induced by cocaine on testicular physiology (Gonzalez et al. 2015). Therefore, consequences on the health of consumers of adulterated drugs, particularly with caffeine, should be strongly considered.

To our knowledge, no clinical or preclinical studies on central effects associated to the consumption of a smokable form of caffeine have been performed. Based on the assumption that the psychomotor-activating effect of psychostimulants predicts its reinforcing effects and addiction liability (Wise and Bozarth 1987; Volkow et al. 2015), our data lead us to propose that smokable forms of caffeine could have some similarities to those produced by typical psychostimulant drugs of abuse like cocaine and amphetamine. In fact, on the internet there are informal data sources about the production of crude freebase smokable caffeine called “black magic”; an example of which is available at <http://boingboing.net/2009/01/19/how-to-make-smokable.html>, along with subjective reports suggesting that the effect of smokable caffeine seems to be similar to that of smoking cocaine. Moreover, other informal reports about smoking ground coffee or coffee beans (called “caffeine sticks”), which produces a

different kind of caffeine high, are also available on <http://www.medicaldaily.com> (April 2014). It is important to consider that all these reports are about an experimental use of smokable caffeine based on home-made chemical processes, completely lacking sanitary and quality control, seriously endangering the user’s health. Additionally, our data also provide a significant warning about the urgent need to increase social awareness and control of caffeine consumption through various dietary sources like coffee, tea, cola, and energy drinks, particularly in adolescents (Vester 2014; Harris and Munsell 2015). Finally, CP and crack abuse is a major health and social problem in several countries. The precise knowledge about how active adulterants collaborate in its harmful effects is of paramount importance to finally understand the serious consequences that this kind of drug, adulterated with caffeine, can have on people’s health.

Acknowledgments This study was partially supported by Smoked Cocaine in South Cone Countries Grant CICAD-OEA/USINL, Premio Concursable Junta Nacional de Drogas (Uruguay), and PEDECIBA (Uruguay). Martín Galvalisi and José Pedro Prieto had postgraduate fellowships from ANII (Uruguay). We are grateful to Manuel Minteguiaga (GC-MS Platform) for his technical support.

References

- Acquas E, Tanda G, Di Chiara G (2002) Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharmacol* 27:182–193
- Broséus J, Gentile N, Esseiva P (2016) The cutting of cocaine and heroin: a critical review. *Forensic Sci Int* 262:73–83
- Cauli O, Morelli M (2005) Caffeine and the dopaminergic system. *Behav Pharmacol* 16:63–77
- Cole C, Jones L, Mcveigh J, Kicman A, Syed Q, Bellis M (2011) Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Test Anal* 3:89–96
- De Luca M, Bassareo V, Bauer A, Di Chiara G (2007) Caffeine and accumbens shell dopamine. *J Neurochem* 103:157–163
- Di Chiara G, Imperato A (1988) Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA* 85:5274–5278
- Díaz-Mataix L, Scorza MC, Bortolozzi A, Toth M, Celada P, Artigas F (2005) Involvement of 5-HT_{1A} receptors in prefrontal cortex in the modulation of dopaminergic activity: role in atypical antipsychotic action. *J Neurosci* 25(47):10831–10843
- Evrard I, Legleye S, Cadet-Tairou A (2010) Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *Int J Drug Policy* 1(5):399–406
- Ferré S (2008) An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *J Neurochem* 105(4):1067–1079
- Ferré S (2016) Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders. *Psychopharmacology*. doi:10.1007/S00213-016-4212-2
- Fredholm BB, Svenningsson P (2003) Adenosine-dopamine interactions: development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. *Neurology* 61:S5–S9

- Fukushima AR, Carvalho VM, Carvalho DG, Diaz E, Bustillos JO, Spinosa HD et al (2014) Purity and adulterant analysis of crack seizures in Brazil. *Forensic Sci Int* 243C:95–98
- Galvalisi G, Prieto JP, Martínez M, Abin-Carriquiry JA, Scorza C (2015) Smoked cocaine: chemical analysis of seized samples and the role of caffeine in its central actions. In: IBRO 9th World Congress, Rio de Janeiro. <http://ibro.info/events/meetings/>
- Garrett B, Griffiths R (1997) The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacol Biochem Behav* 57:533–541
- González CR, González B, Matzkin ME, Muñoz JA, Cadet JL, Garcia-Rill E, Urbano FJ, Vitullo AD, Bisagno V (2015) Psychostimulant-induced testicular toxicity in mice: evidence of cocaine and caffeine effects on the local dopaminergic system. *Plos One* 10(11):e0142713
- Gossop M, Griffiths P, Powis B, Strang J (1992) Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine and amphetamines. *Br J Addict* 87:1527–1536
- Gostic T, Klemenc S, Stefane B (2009) A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions. *Forensic Sci Int* 187:19–28
- Griffiths RR, Woodson PP (1988) Reinforcing properties of caffeine: studies in humans and laboratory animals. *Pharmacol Biochem Behav* 29(2):419–427
- Harris JL, Munsell CR (2015) Energy drinks and adolescents: what's the harm? *Nutr Rev* 73(4):247–257
- Herculiani PP, Pires-Neto RC, Bueno HM, Zorzetto JC, Silva LC, Santos AB, Garcia RC, Yonamine M, Detregiachi CR, Saldiva PH, Mauad T (2009) Effects of chronic exposure to crack cocaine on the respiratory tract of mice. *Toxicol Pathol* 37(3):324–332
- Hoffman RS, Kirrane BM, Marcus SM (2008) A descriptive study of an outbreak of clenbuterol-containing heroin. *Ann Emerg Med* 52(5):548–553
- Kalivas P, Volkow N (2005) The neural basis of addiction: a pathology of motivation and choice. *Am J Psychiatry* 162:1403–1413
- Khairnar A, Plumitallo A, Frau L, Schintu N, Morelli M (2010) Caffeine enhances astroglia and microglia reactivity induced by 3,4-methylenedioxymethamphetamine ('ecstasy') in mouse brain. *Neurotox Res* 17(4):435–439
- Koob G, Bloom F (1988) Cellular and molecular mechanisms of drug dependence. *Science* 242:715–723
- López-Hill X, Prieto J, Meikle M, Urbanavicius J, Abín-Carriquiry A, Prunell G, Umpiérrez E, Scorza C (2011) Coca-paste seized samples characterization: chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behav Brain Res* 221:134–141
- Malave LB, Broderick PA (2014) Caffeine's attenuation of cocaine-induced dopamine release by inhibition of adenosine. *J Caffeine Res* 4(2):35–40
- Mcnamara R, Kerans A, O'neill B, Harkin A (2006) Caffeine promotes hyperthermia and serotonergic loss following co-administration of the substituted amphetamines, MDMA ("Ecstasy") and MDA ("Love"). *Neuropharmacology* 50(1):69–80
- Morelli M, Simola N (2011) Methylxanthines and drug dependence: a focus on interactions with substances of abuse. *Handb Exp Pharmacol* 200:483–507
- Muñoz JA, Gomez G, González B, Rivero-Echeto MC, Cadet JL, García-Rill E, Urbano FJ, Bisagno V (2016) Combined effects of simultaneous exposure to caffeine and cocaine in the mouse striatum. *Neurotox Res* 29(4):525–538
- Nehlig A (1999) Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neurosci Biobehav Rev* 23:563–576
- Parrott AC (2004) Is ecstasy MDMA? A review of the proportion of ecstasy tablets containing MDMA, their dosage levels, and the changing perceptions of purity. *Psychopharmacology* 173(3–4):234–241
- Pawlik E, Mahler H (2001) Smoke analysis of adulterated illicit drug preparations. *Toxicchem Krimtech* 78:200–210
- Paxinos G, Watson C (2005) The rat brain in stereotaxic coordinates, 5th edn. Academic press, Sydney
- Petzer A, Pienaar A, Petzer JP (2013) The interactions of caffeine with monoamine oxidase. *Life Sci* 93:283–287
- Prieto JP, Galvalisi M, López-Hill X, Meikle MN, Abin-Carriquiry JA, Scorza C (2015) Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *Am J Addict* 24(5):475–481
- Prieto JP, Scorza C, Serra GP, Perra V, Piras G, Galvalisi M, Abin-Carriquiry JA, Valentini V (2016) Cocaine motivational value is enhanced when co-administered with caffeine: relevance of adulterants in reinforcement. *Psychopharmacology* 233(15–16):2879–2889
- Samaha AN, Robinson TE (2005) Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends Pharmacol Sci* 26(2):82–87
- Solinas M, Ferré S, You Z, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg S (2002) Caffeine induces dopamine and glutamate release in the shell of the nucleus accumbens. *J Neurosci* 22:6321–6324
- Strain E, Griffiths R (1995) Caffeine dependence: fact of fiction? *J R Soc Med* 88:437–440
- Verster JC (2014) Caffeine consumption in children, adolescents and adults. *Curr Drug Abuse Rev* 7(3):133–134
- Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley JS, Dewey S, Ashby C, Liebermann J, Hitzemann R et al (1995) Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. *Arch Gen Psychiatry* 52:456–463
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F (2009) Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology* 56:3–8
- Volkow ND, Wang GJ, Logan J, Alexoff D, Fowler JS, Thanos PK, Wong C, Casado V, Ferre S, Tomasi D (2015) Caffeine increases striatal dopamine D2/D3 receptor availability in the human brain. *Transl Psychiatry* 5:e549
- Wise RA, Bozarth MA (1987) A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychol Rev* 94:469–492

REFERENCIAS

- Abbott FV, Hellems GC. Phenacetin, acetaminophen and dipyron: analgesic and rewarding effects. *Behavioural Brain Research*, 112:177-186 (2000).
- Acquas E, Tanda G, Di Chiara G. Differential effects of caffeine on dopamine and acetylcholine transmission in brain areas of drug-naive and caffeine-pretreated rats. *Neuropsychopharmacology*, 27:182-193 (2002).
- Albin RL, Young AB, Penney JB. The functional anatomy of basal ganglia disorders. *Trends Neurosci*. 12:366-375 (1989).
- Archer J. Tests for emotionality in rats and mice: a review. *Animal Behavior*, 21: 205-235 (1973).
- Bassareo V, Di Chiara G: Differential responsiveness of dopamine transmission to food-stimuli in nucleus accumbens *shell/core* compartments. *Neuroscience*, 89:637-641 (1999).
- Berns GS, McClure SM, Pagnoni G, Montague PR. Predictability modulates human brain response to reward. *The Journal of Neuroscience*, 21:2793-2798 (2001).
- Breiter HC, Gollub RL, Weisskoff RM, Kennedy DN, Makris N, Berke JD, Goodman JM, Kantor HL, Gastfriend DR, Riorden JP, Mathew RT, Rosen BR, Hyman SE. Acute effects of cocaine on human brain activity and emotion. *Neuron*, 19:591-611 (1997).
- Broséus J, Gentile N, Esseiva P. The cutting of cocaine and heroin: A critical review. *Forensic Science International* 262: 73-83 (2016).
- Brunt TM, Rigter S, Hoek J, Vogels N, van Dijk P, Niesink RJ. An analysis of cocaine powder in the Netherlands: content and health hazards due to adulterants. *Addiction* 104: 798-805 (2009).
- Carboni E, Imperato A, Perezzi L, Di Chiara G. Amphetamine, cocaine, phencyclidine and nomifensine increase extracellular dopamine concentrations preferentially in the nucleus accumbens of freely moving rats. *Neuroscience* 28:653-661 (1989).
- Castaño GA. Cocaínas fumables en Latinoamérica. *Adicciones*, 12: 541-550 (2000).
- Cauli O, Morelli M. Caffeine and the dopaminergic system. *Behavioural Pharmacology*, 16:63-77 (2005).
- Chang A, Osterloh J, Thomas J. Levamisole: a dangerous new cocaine adulterant. *Clinical pharmacology & Therapeutics* 88:408-411 (2010).
- Cleck J, Blendy J. Making a bad thing worse: adverse effects of stress on drug addiction. *Journal of Clinical Investigation*, 118:454-461 (2008).
- Cole C, Jones L, McVeigh J, Kicman A, Syed Q, Bellis M. Adulterants in illicit drugs: a review of empirical evidence. *Drug Testing and Analysis*, 3: 89-96 (2011).
- Daly J, Fredholm B. Caffeine - an atypical drug of dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 51:199-206 (1998).

- David JD, Zahnister NR, Hoffer BJ, Gerhardt GA. In vivo electrochemical studies of dopamine clearance in subregions of rat nucleus accumbens: differential properties of the core and *shell*. *Experimental Neurology*, 153:277-286 (1998).
- De Luca M, Bassareo V, Bauer A, Di Chiara G. Caffeine and Accumbens *shell* dopamine. *Journal of Neurochemistry*, 103:157-163 (2007).
- Di Chiara G, Imperato A. Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats. *Proc Natl Acad Sci USA*, 85:5274-5278 (1988).
- Di Chiara G. Nucleus accumbens *shell* and core dopamine: differential role in behavior and addiction. *Behavioral Brain Research*, 137:75-114 (2002).
- El Yacoubi M, Ledent C, Ménard JF, Parmentier M, Costentin J, Vaugeois JM. 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 (2000).
- ElSholy M, Brenneisen R, Jones A. Coca paste: chemical analysis and smoking experiments. *Journal of Forensic Sciences*, 36: 93-103 (1991).
- Evrard I, Legleyeb S, Cadet-Tairou A. Composition, purity and perceived quality of street cocaine in France. *International Journal of Drug Policy* 21: 399–406 (2010).
- Feldman R, Meyer J, Quenzer L. Principles of neuropsychopharmacology. Sunderland, MA, US: Sinauer Associates. American Psychological Association (1997).
- Fernández-Espejo E. Bases neurobiológicas de la drogadicción. *Neurobiological Basis of Drug Addiction*, 34:659-664 (2002).
- Ferrando R, Bocchino S, Barrachina A, Ferro AL, Rodríguez JM, Silveira A, Ventura R, Gioia A, López A, Langhain M, Cardoso A, Zurmendi P, Triaca J, Lago G. Alteraciones de la perfusión cerebral en consumidores activos de pasta base de cocaína. *Revista de Psiquiatría del Uruguay*, 73:51-62 (2009).
- Ferré S, von Euler G, Johansson B, Fredholm BB, Fuxe K. 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 of the United States of America* 88: 7238-41 (1991).
- Ferré S. An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Neurochemistry*, 105:1067-79 (2008).
- Ferré S. Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders. *Psychopharmacology* 233:1963–1979 (2016).
- Ferré S. Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Alzheimer's disease: JAD* 20: 35-49 (2010).
- Fisone G, Borgkvist A, Usiello A. Caffeine as a psychomotor stimulant: mechanism of action. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 61:857-872 (2004).
- Fredholm B, Battig K, Holmén J, Nehlig A, Zvartau E. Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. *Pharmacological Reviews*, 51:83-133 (1999).

- Fredholm B, Dunwiddie T. How does adenosine inhibit transmitter release? *TIPS Reviews* 91, 130-134 (1988).
- Fredholm BB, Svenningsson P. Adenosine-dopamine interactions: development of a concept and some comments on therapeutic possibilities. *Neurology*, 61:S5-9 (2003).
- Garcia RC, Dati LM, Fukuda S, Torres LH, Moura S, de Carvalho ND, Carrettiero DC, Camarini R, Levada-Pires AC, Yonamine M, Negrini-Neto O, Abdalla FM, Sandoval MR, Afeche SC, Marcourakis T. Neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a crack cocaine pyrolysis product. *Toxicological Sciences*, 128:223-34 (2012).
- Garcia RC, Dati LM, Torres LH, da Silva MA, Udo MS, Abdalla FM, da Costa JL, Gorjão R, Afeche SC, Yonamine M, Niswender CM, Conn PJ, Camarini R, Sandoval MR, Marcourakis T. M1 and M3 muscarinic receptors may play a role in the neurotoxicity of anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product. *Scientific Reports*, 5:17555 (2015).
- Garcia RC, Torres LH, Balestrin NT, Andrioli TC, Flório JC, de Oliveira CD, da Costa JL, Yonamine M, Sandoval MR, Camarini R, Marcourakis T. Anhydroecgonine methyl ester, a cocaine pyrolysis product, may contribute to cocaine behavioral sensitization. *Toxicology*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.tox.2016.04.009> (2016).
- Garrett B, Griffiths R. The role of dopamine in the behavioral effects of caffeine in animals and humans. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 57:533-541 (1997) .
- Garrett M, Soares-da-Silva P. 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 (1990).
- Gossop M, Griffiths P, Powis B, Strang J. Severity of dependence and route of administration of heroin, cocaine and amphetamines. *British Journal of Addiction*, 87:1527-36 (1992).
- Gostic T, Klemenc S, Stefan B. A study of the thermal decomposition of adulterated cocaine samples under optimized aerobic pyrolytic conditions. *Forensic Science International* 187: 19-28 (2009).
- Graybiel AM. The basal ganglia. *Current Biology*, 10:R509-R511 (2000).
- Harris JL, Munsell CR. Energy drinks and adolescents: what's the harm? *Nutrition Reviews*, 73:247-57 (2015).
- Hatsukami D, Fischman M. Crack cocaine and cocaine hydrochloride. Are the differences myth or reality? *Journal of the American Medical Association* 276:1580-1588 (1996).
- Hikida T, Kimura K, Wada N, Funabiki K, Nakanishi S. Distinct roles of synaptic transmission in direct and indirect striatal pathways to reward and aversive behavior. *Neuron*, 66:896-907 (2010).
- Hughes JR, Oliveto AH, Liguori A, Carpenter J and Howard T. Endorsement of DSM-IV dependence criteria among caffeine users. *Drug Alcohol Depend* 52:99-107 (1998).
- Hyman SE, Malenka RC, Nestler EJ. Neural mechanisms of addiction: the role of reward-related learning and memory. *Annual Review of Neuroscience*, 29:565-598 (2006).

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

Jardim JR, Bizeto L, Mayer AF, Camelier A, Rosa FW, Oliveira D, Azevedo D, Saldiva PH, Martins MA, Bonassa J, Nascimento OA. An Inhalation Chamber Model for Controlled Studies of Tobacco Smoke Toxicity in Rodents. *Archivos de Bronconeumología* 46: 455-458 (2010).

Jarvis MF, Williams M. Direct autoradiographic localization of adenosine A2 receptors in the rat brain using the A2-selective agonist, [3H]CGS 21680. *European Journal of Pharmacology* 168: 243-246 (1989).

Jay TM. Dopamine: a potential substrate for synaptic plasticity and memory mechanisms. *Progress in Neurobiology*, 69:375-390 (2003).

Jones HE, Suarez Ordoñez R, Browne T. Little Fly Wing: a new drug of concern in Argentina. *Addiction*, 110:1534-1535 (2015).

Junta Nacional de Drogas Drogas: más información menos riesgos. (2007).

Junta Nacional de Drogas Pasta Base de Cocaína. Prácticas y gestión de riesgos en adolescentes uruguayos. Edición, Junta Nacional de Drogas. Presidencia de la República (2006).

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

Junta Nacional de Drogas. Sistema de Gestión de Usuarios en atención y tratamiento por consumo problemático de Drogas: Tratamiento Registra. Edición, Junta Nacional de Drogas. Presidencia de la República (2015).

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

Koob GF, Le Moal M. Psychostimulants. *Neurobiology of Addiction*, 69-120 (2006).

Koob GF, Volkow ND. Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35:217-238 (2010).

Kravitz AV, Tye LD, Kreitzer AC. Distinct roles for direct and indirect pathway striatal neurons in reinforcement. *Nature Neuroscience*, 15:816-818 (2012).

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

Londos C, Cooper DMF, Wolff J. Subclasses of external adenosine receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77: 2551-2554 (1980).

López-Hill X, Prieto J, Meikle M, Urbanavicius J, Prunell J, Abin-Carriquiry A, Umpiérrez E, Scorza C. 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 (2011).

Malave LB, Broderick PA. Caffeine's Attenuation of Cocaine-Induced Dopamine Release by Inhibition of Adenosine. *Journal of Caffeine Research*, 4:35-40 (2014).

Meikle MN, Urbanavicius J, Prunell G, Umpiérrez E, Abín-Carriquiry JA, Scorza MC. 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 (2009).

Moraes M, González G, Castelli L, Umpiérrez E, Sosa C. Consumo de pasta base de cocaína y cocaína en mujeres durante el embarazo. Capítulo 1. PBC que se comercializa en Uruguay. *Espacio Interdisciplinario*, Universidad de la República, Uruguay (2015).

Moratalla R. Neurobiología de la cocaína. *Trastornos Adictivos*, 10:143-50 (2008).

Morelli M, Simola N. Methylxanthines and drug dependence: A focus on interactions with substances of abuse. *Handbook of Experimental Pharmacology*, 200:483-507 (2011).

Nakahara Y, Ishigami A. Inhalation efficiency of free-base cocaine by pyrolysis of 'crack' and cocaine hydrochloride. *Journal of Analytical Toxicology*, 15:105-109 (1991).

Nehlig A, Daval JL, Debry G. Caffeine and the central nervous system: mechanisms of action, biochemical, metabolic and psychostimulant effects. *Brain Research Reviews* 17: 139-170 (1992).

Nehlig A. Are we dependent upon coffee and caffeine? A review on human and animal data. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 23:563-576 (1999).

Nestler EJ. The Neurobiology of Cocaine Addiction. *Science & Practice Perspectives*, 3:4-10 (2005).

Pascale A, Hynes M, Cumsille F, Bares C. 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. (2014).

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

Petzer A, Pienaar A, Petzer JP. The interactions of caffeine with monoamine oxidase. *Life Sciences*, 93:283-287 (2013).

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

Pontieri FE, Tanda G, Di Chiara G. Intravenous cocaine, morphine, and amphetamine preferentially increase extracellular dopamine in the "shell" as compared with the "core" of the rat nucleus accumbens. *Proc Natl Acad Sci USA*, 92:12304-12308 (1995).

PRADICAN. Informe final: Caracterización química de drogas cocaínicas, incautadas, en 27 ciudades de la subregión andina Bolivia, Colombia y Perú 2012. Informe Regional. Edición: Programa Anti-drogas Ilícitas de la Comunidad Andina (PRADICAN) - Unión europea (2012).

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

Prieto JP, Galvalisi M, López-Hill X, Meikle MN, Abin-Carriquiry JA, Scorza C. Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *The American Journal on Addictions*, 24:475-81 (2015).

- Prieto JP, Scorza MC, Serra GP, Perra V, Piras G, Galvalisi M, Abín-Carriquiry JA, Valentini V. Caffeine, a common active adulterant of cocaine, enhances the reinforcing effect of cocaine and its motivational value. *Psychopharmacology*, 233:2879-2889 (2016).
- Razafsha M, Behforuzi H, Harati H, Wafai R, Khaku A, Mondello S, Gold M, Kobeissy F. An updated overview of animal models in neuropsychiatry. *Neuroscience*, 240: 204-218 (2013).
- Robinson T, Berridge KC. The incentive sensitization theory of addiction: some current issues. *Philosophical Transactions of the Royal Society B- Biological Sciences*, 363:3137-3146 (2008).
- Robinson TE, Berridge KC. The neural basis of drug craving: an incentive-sensitization theory of addiction. *Brain Research Reviews* 18:247-291 (1993).
- Samaha AN, Robinson TE. Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends in Pharmacological Sciences* 26:82-7 (2005).
- Scorza C, Abin-Carriquiry AB, Prieto JP, Galvalisi M. Capítulo 7. Neurobiología de la acción de drogas psicoestimulantes. Consumo de alcohol, cocaína y cafeína en el embarazo: efectos sobre el embarazo y el niño. *Espacio Interdisciplinario de la Universidad de la República*, 89-100 (2013).
- Sellings LH, Clarke PB. Segregation of amphetamine reward and locomotor stimulation between nucleus accumbens medial *shell* and core. *The Journal of Neuroscience*, 23: 6295-6303 (2003).
- Solinas M, Ferré S, You ZB, Karcz-Kubicha M, Popoli P, Goldberg SR. Caffeine Induces Dopamine and Glutamate Release in the *Shell* of the Nucleus Accumbens. *Journal of Neuroscience* 22:6321-6324 (2002).
- Strain E, Griffiths R. Caffeine dependence: fact or fiction? *Journal of the Royal Society of Medicine*, 88:437-440 (1995).
- Triaca J, Cardeillac V, Idiarte Borda C. Características de los primeros usuarios que consultaron en el Centro de Referencia Nacional de la Red Drogas “Portal Amarillo”. *Revista de Psiquiatría del Uruguay*, 73:37-48 (2009).
- Vanderschuren LJ, Pierce RC. Sensitization processes in drug addiction. *Curr Top Behav Neurosci*, 3:179-195 (2010).
- Verster JC. Caffeine consumption in children, adolescents and adults. *Current Drug Abuse Reviews*, 7:133-4 (2014).
- Vidal Giné C, Ventura Vilamala M, Fornís Espinosa I, Gil Lladanosa C, Calzada Álvarez N, Fitó Fruitós A, Rodríguez Rodríguez J, Domingo Salvany A, de la Torre Fornell R. Crystals and tablets in the Spanish ecstasy market 2000-2014: Are they the same or different in terms of purity and adulteration? *Forensic Science International*, 263:164-8 (2016).
- Volkow N, Wang G, Fischman M, Foltin R, Fowler J, Abumrad N, Vitkun S, Logan J, Gatley S, Pappas N, Hitzemann R, Shea C. Relationship between subjective effects of cocaine and dopamine transporter occupancy. *Nature*, 386:827-830 (1997).
- Volkow ND, Baler RD. Addiction science: Uncovering neurobiological complexity. *Neuropharmacology*, 76:235-49 (2014).

- Volkow ND, Ding YS, Fowler JS, Wang GJ, Logan J, Gatley JS, Dewey S, Ashby C, Liebermann J, Hitzemann R, et al. Is methylphenidate like cocaine? Studies on their pharmacokinetics and distribution in the human brain. *Arch Gen Psychiatry*, 52:456-463 (1995).
- Volkow ND, Fowler JS, Wang GJ, Baler R, Telang F. Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, 56:3-8 (2009).
- Volkow ND, Morales M. The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162:712-725 (2015).
- Volkow ND, Wang GJ, Fischman MW, Foltin R, Fowler JS, Franceschi D, Franceschi M, Logan J, Gatley SJ, Wong C, Ding YS, Hitzemann R, Pappas N. Effects of route of administration on cocaine induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life Sciences* 67:1507-1515 (2000).
- Volkow ND, Wang GJ, Fowler JS, Tomasi D, Telang F. Addiction: beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 15037-15042 (2011).
- Volkow ND, Wang GJ, Logan J, Alexoff D, Fowler JS, Thanos PK, Wong C, Casado V, Ferre S, Tomasi D. Caffeine increases striatal dopamine D2/D3 receptor availability in the human brain. *Translational Psychiatry*, 5:e549 (2015).
- Volkow ND, Wang G-J, Ma Y, Fowler JS, Zhu W, Maynard L, Telang R, Vaska P, Ding Y-S, Wong C, Swanson JM: Expectation enhances the regional brain metabolic and the reinforcing effects of stimulants in cocaine abusers. *The Journal of Neuroscience*, 23:11461-11468 (2003).
- Wickens JR, Reynolds JNJ, Hyland BI. Neural mechanisms of reward-related motor learning. *Current Opinion in Neurobiology*, 13:685-690 (2003).
- Wise RA, Bozarth MA. A psychomotor stimulant theory of addiction. *Psychological Review*, 94:469-492 (1987).
- Wise RA. Dopamine and reward: the anhedonia hypothesis 30 years on. *Neurotoxicity Research*, 14:169-183 (2008).
- Yamada H, Bishnoi M, Keijzers KFM, van Tuijl IA, Small E, Shah HP, Bauzo RM, Kobeissy FH, Sabarinath SN, Derendorf H, Bruijnzeel AW. Preadolescent tobacco smoke exposure leads to acute nicotine dependence but does not affect the rewarding effects of nicotine or nicotine withdrawal in adulthood in rats. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior* 95: 401-409 (2010).
- Zweifel LS, Parker JG, Lobb CJ, Rainwater A, Wall VZ, Fadok JP, Darvas M, Kim MJ, Mizumori SJ, Paladini CA, Phillips PE, Palmiter RD. Disruption of NMDAR-dependent burst firing by dopamine neurons provides selective assessment of phasic dopamine-dependent behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 106:7281-7288 (2009).

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)