



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Carrera de Ciencias Biológicas
Tesis de Licenciatura

"Título: Efectos del consumo abusivo de pasta base de cocaína (PBC)
en adolescentes: identificación de factores inflamatorios y
epigenéticos asociados a los cambios en el dominio de atención"

"Title: Effects of abusive consumption of cocaine base paste (CBP) in
adolescents: identification of inflammatory and epigenetic factors
associated with changes in the attention domain"

Autora: Camila Mimura
Directora: Silvina Sonzogni
Codirectora: Mariela Chertoff

Lugar de trabajo: Laboratorio de Neuroepigenética y Adversidades
tempranas

Departamento de Química Biológica. Facultad de Ciencias Exactas y
Naturales, U.B.A.

Silvina Sonzogni

Camila Mimura

Mariela Chertoff

Agradecimientos

Esta tesis fue para mí un aprendizaje enorme, tanto en lo personal como para mi formación académica y profesional. Fue la mejor manera de terminar esta carrera larga pero hermosa, de la que me llevo hermosas personas y recuerdos. Fue mi primer encuentro con la investigación que potenció mi amor por la ciencia. Todo esto no hubiera sido posible si no fuera por muchas personas que me acompañaron durante este proceso.

Primero quiero agradecer a mi familia, mamá y papá, gracias por bancarme en este proyecto tan lindo. Gracias por la paciencia, por creer en mí e incentivar me a seguir adelante. Su amor y dedicación a su trabajo me inspira y me enorgullece, los amo. A mi hermana Carolina, gracias por ser mi compañera incondicional, mi amiga, mi persona preferida, mi orgullo y mi motor. Sos mi aliada más fiel, mi apoyo, mi oído, mi complice en todo. Te amo y te admiro.

A mis tíos y tías por entender las miles de veces que no pude ir a cumpleaños y festejos porque tenía que estudiar. Gracias por su empatía y su incentivo. A mis primitos, la luz de mis ojos, que siempre me sacan una sonrisa y son una pausa en cualquier crisis. A mi abuela por mostrarme el amor a las plantas, las flores y lo que la naturaleza nos tiene para ofrecer. Mi amor por la ciencia arrancó ahí, sembraste la semilla y te agradezco eternamente por eso. Te amo siempre.

A Silvi, mi directora, que desde un principio me tuvo confianza y me invitó a ser parte de este proyecto tan importante para ella. Agradezco las charlas, los abrazos, las videollamadas y el incentivo constante que me brindaste aun estando a kilómetros de distancia. A mi codirectora Marie, que fue mi gran apoyo este último tiempo. Gracias por siempre hacerte un lugar para mis consultas e inseguridades, por escucharme, aconsejarme y acompañarme durante este tramo.

A toda la gente del labo, que siempre estuvo dispuesta a ayudarme y aconsejarme. No puedo estar más agradecida de haber estado más de 2 años compartiendo con ustedes. La energía, las epireuniones, las ganas de hacer ciencia y el amor son un motor super importante para mí. Son una inspiración, mi primer grupo y los voy a recordar siempre con una sonrisa. Mención especial a Jaz y a Belu, gracias por el amor, los abrazos, los chistes y los chismes, las quiero.

A mis amigos de la primaria, mis primeros amigos en el mundo, mi familia. Gracias por acompañarme siempre, en cada paso, en cada tropezón, en cada locura. Son una alegría y un apoyo constante donde me siento mi mejor versión. Los amo eternamente

A mis amigas de la facultad, gracias por aceptarme y quererme por como soy. Encontrarlas a mitad de camino, hizo todo este último tramo mas lindo, las quiero

mucho. A mis amigos del grupo de mosquitos, de tecnópolis y de cursada. Me llevo a hermosas personas con las que espero seguir compartiendo mucho más tiempo.

A mis amigas de fútbol, por las risas, los llantos, los consejos y los abrazos de gol. Si hay algo que me hace más feliz que jugar a la pelota, es haberlo descubierto con ustedes. Por más paredes, remates y goles pero también por más charlas, mates, trucos y abrazos. Las admiro y las amo a cada una de ustedes.

Gracias a los jurados por aceptar esta propuesta y tomarse el tiempo para leer mi tesis y venir a la defensa. Diciembre se que es un mes complicado así que les agradezco la buena predisposición

Y por último, quiero agradecer a la Universidad Pública, que no solo tiene calidad académica, sino mentes brillantes y profesores que me inspiraron a ser docente y a seguir haciendo ciencia. El amor por la facultad se siente, el sentido de pertenencia, la resiliencia, la pasión. No puedo estar más orgullosa de haber elegido esta carrera y en esta facultad.

Índice

Resumen.....	6
Abstract.....	7
1. Introducción.....	8
1.1 Consumo abusivo de sustancias.....	8
1.2 Circuito de recompensa.....	9
1.3 Situación a nivel mundial del consumo de sustancias.....	10
1.4 Formas de consumo de la cocaína.....	12
1.5 Cocaínas fumables: Pasta base de cocaína.....	13
1.5.1 Proceso de producción de PBC.....	13
1.5.2 PBC y la presencia de adulterantes.....	15
1.5.3 Consumo abusivo de PBC en América latina y Argentina.....	15
1.5.4 Efectos fisiológicos asociados al consumo abusivo de PBC.....	16
1.6 Inflamación periférica como mediadora de la neuroinflamación en el abuso de sustancias.....	18
1.7 Mecanismos epigenéticos asociados al consumo abusivo de sustancias.....	20
1.7.1 Metilación del ADN y consumo abusivo de cocaína.....	20
2. Hipótesis.....	23
3. Objetivo general.....	23
3.1 Objetivos específicos.....	23
4. Materiales y métodos.....	24
4.1 Características de la población sobre la cual se extrajeron las muestras:.....	24
4.1.1 Criterios de inclusión y exclusión del protocolo.....	25
4.1.2 Demografía.....	26
4.2 Obtención y almacenamiento de muestras.....	27
4.3 Extracción de RNA.....	27
4.3.1 Cuantificación de la muestra de ARN y chequeo de la integridad de la misma.	
28	
4.4.1 Retrotranscripción (RT).....	28
4.4.2 Puesta a punto de los primers para medir la expresión por PCR en tiempo real (RT-qPCR).....	29
4.4.3 Análisis cuantitativo de la expresión génica través de LinRegPCR.....	30
4.5 Extracción de ADN.....	31
4.5.1 Cuantificación de la muestra de ADN y chequeo de la integridad de la misma.	
31	
4.6 Análisis del patrón general de metilación del ADN.....	32
4.6.1 Sonicado de muestras.....	32
4.6.2 Dotblot.....	33
4.6.3 Cuantificación.....	33

4.7 Evaluaciones neuropsicológicas de los individuos.....	34
4.7.1 Prueba rango de dígitos hacia adelante.....	34
4.7.2 Prueba de bloques de Corsi.....	35
4.7.3 Prueba de símbolo-dígito.....	35
4.7.4 Prueba de trazados parte A.....	35
4.8 Análisis estadístico.....	35
5. Resultados.....	36
5.1 Expresión de genes asociados a la inflamación.....	36
5.2 Análisis de la metilación global.....	38
5.3 Expresión de genes asociados a la maquinaria de metilación.....	39
5.4 Asociación entre las pruebas de atención y los cambios en la expresión génica de factores inflamatorios.....	42
5.5 Asociación entre las pruebas de atención y los cambios en la expresión génica de la maquinaria de metilación y metilación global.....	43
6. Discusión.....	45
6.1 La expresión de los genes proinflamatorios NFKb y TNF α se encuentra disminuida en el grupo PBC y CC.....	45
6.2 El nivel de metilación global (5mC) y la expresión de las metilasas Dnmt1 y Dnmt3A disminuye para el grupo PBC.....	46
6.3 El grupo PBC mostró un peor rendimiento en las pruebas de atención, con respecto al grupo Control y CC.....	47
6.4 Asociación entre el dominio de atención y la expresión de NFKB.....	47
6.5 Asociación entre el dominio de atención y la expresión de DNMT1.....	48
6.6 Trabajo con muestras humanas.....	49
7. Conclusión.....	50
8. Referencias.....	51

Resumen

La pasta base de cocaína (PBC) es un producto intermedio del proceso de obtención del clorhidrato de cocaína (CC). El consumo de PBC se instala en el mercado de las sustancias ilegales en Argentina en el transcurso de la profunda crisis socioeconómica de los años 2001 y 2002. Si bien la prevalencia de consumo en nuestro país es baja, se duplica o triplica si se considera la población por debajo de los 25 años o poblaciones de bajo nivel socioeconómico. El **objetivo general** de este estudio es caracterizar los mecanismos inflamatorios y epigenéticos involucrados en la adicción a la PBC y su relación con los dominios de atención. Para ello, se trabajó con una población de 14 adolescentes que cumplieron los criterios del DSM-IV para la dependencia de PBC, 16 cumplieron los criterios para la dependencia de CC (ambos grupos se encontraban al menos con un mes de abstinencia) y 12 sujetos control sin dependencia (CTR). Se incluyó el grupo CC como otro modelo de adicción para contrastar con los resultados de PBC. Para caracterizar los mecanismos inflamatorios se evaluaron cambios en la expresión de genes asociados a esta respuesta como NFKb, TNF α , IL-6, IL1 β e IL-10 en muestras de sangre. De los cinco genes analizados, se observó una disminución significativa en la expresión de NFKb y TNF α en el grupo PBC y CC con respecto al CTR. Para analizar cambios epigenéticos asociados al consumo de PBC se analizó la expresión génica de factores involucrados en la maquinaria de metilación y la metilación global del ADN. Al analizar la expresión de las enzimas encargadas de metilar (metil transferasa -DNMTs-) se observó una disminución en la expresión de DNMT1 y DNMT3A en el grupo PBC con respecto al CTR. No se observaron cambios en la expresión de las enzimas involucradas en la demetilación (*ten-eleven translocation protein -TET*). Al estudiar los cambios epigenéticos observamos una disminución significativa en el patrón de metilación global del ADN en muestras de saliva en el grupo PBC y CC con respecto al CTR, resultado que coincide con la disminución de DNMT1 y DNMT3A. Resultados previamente publicados pero realizados en esta población mostraron que el grupo PBC presenta un score menor en pruebas comportamentales que miden atención con respecto al grupo CTR y al grupo CC. Al asociar nuestros resultados con estos datos, observamos una correlación significativa entre el score de atención y la expresión de los genes NFKb y DNMT1. Estas correlaciones muestran que los individuos consumidores de PBC presentan un desempeño menor en pruebas de atención que coincide con una menor expresión de NFKb y DNMT1. Si bien estos resultados no demuestran causalidad son de gran relevancia para un mejor entendimiento de las neuroadaptaciones inducidas por el consumo abusivo de PBC y CC.

Abstract

Cocaine base paste or pasta base de cocaína (PBC) is an intermediate product in the process of obtaining cocaine hydrochloride (CC). The use of PBC became a major illegal substance in Argentina during the deep socioeconomic crisis of 2001 and 2002. Although the prevalence of consumption in our country is low, it doubles or triples if we consider the population under 25 years of age or populations of low socioeconomic level. The general objective of this study is to characterize the inflammatory and epigenetic mechanisms involved in PBC addiction and its relationship to attention domains. For this purpose, we worked with a population of 14 adolescents who met the DSM-IV criteria for PBC dependence, 16 met the criteria for CC dependence (both groups were abstinent for at least one month) and 12 control subjects without dependence (CTR). The CC group was included as another model of addiction to contrast with the PBC results. To characterize the inflammatory mechanisms, changes in the expression of genes associated with this response such as NFKb, TNF α , IL-6, IL1 β and IL-10 were evaluated in blood samples. Of the five genes analyzed, a significant decrease in the expression of NFKb and TNF α was observed in the PBC and CC group with respect to the CTR. a. To analyze epigenetic changes associated with PBC consumption, gene expression of factors involved in the methylation machinery and global DNA methylation was analyzed. When analyzing the expression of the enzymes responsible for methylation (DNA methyl transferase -DNMTs-), a decrease in the expression of DNMT1 and DNMT3A was observed in the PBC group with respect to the CTR. No changes were observed in the expression of ten-eleven translocation protein (TET) enzymes. When studying the changes in global DNA methylation we observed a significant decrease in the pattern of global DNA methylation in saliva samples of the PBC and CC group with respect to the CTR, a result that coincides with the decrease in DNMT1 and DNMT3A. Previously published results but performed in this population showed that the PBC group had lower scores in behavioral tests measuring attention than the CTR and CC groups. When associating our results with these data, we observed a significant correlation between the attention score and the expression of the NFKb and DNMT1 genes. This indicates that individuals who consume PBC present a lower performance in attention tests that coincides with a lower expression of NFKb and DNMT1. Although these results do not demonstrate causality, they are of great relevance for a better understanding of the neuroadaptations induced by the abusive consumption of PBC and CC.

1. Introducción

1.1 Consumo abusivo de sustancias

La Organización Mundial de la Salud (OMS), define a la adicción o consumo abusivo de sustancias, como un trastorno de salud mental caracterizado por la necesidad compulsiva de consumir una sustancia a pesar de las consecuencias perjudiciales que le trae al individuo y a sus relaciones personales.

Los procesos fisiológicos asociados al consumo abusivo de sustancias se pueden dividir en tres etapas: placer, tolerancia y *craving* (Figura 1). En la primera etapa, la droga genera una sensación de **placer o bienestar** (Koob & Volkow, 2010). Esta sensación está asociada al refuerzo positivo que induce la droga en las etapas tempranas de consumo que lleva a la repetición y eventualmente a la compulsión por seguir consumiendo (Wise & Koob, 2013). En una segunda etapa, cuando el consumo se vuelve repetitivo se genera **tolerancia**, que se refleja en la necesidad fisiológica de aumentar la dosis de la droga para obtener el efecto buscado, o incluso para suprimir la abstinencia (Volkow & Fowler, 2000). Estos procesos fisiológicos que implican la generación de aprendizajes y memorias emocionales llevan a la compulsión, cuando el sujeto no logra suspender el consumo, pese a percibir un daño asociado e incluso sin conseguir una sensación de placer (Goodman & Packard, 2016). A estos procesos se le suma que ante la suspensión del uso de una sustancia se genera un síndrome de abstinencia relacionado a la droga que se consumía (Bell et al., 2014). Esto deriva en una tercera etapa donde se observa el **craving** o deseo muy grande de consumir, que genera la búsqueda de la droga (Koob & Volkow, 2010) y en consecuencia, la recaída. En esta etapa avanzada de consumo, el refuerzo negativo juega un rol importante, donde se observa malestar físico y emocional, disforia, alexitimia (incapacidad de corresponder las acciones con las emociones) e irritabilidad crónica (Wise & Koob, 2013).

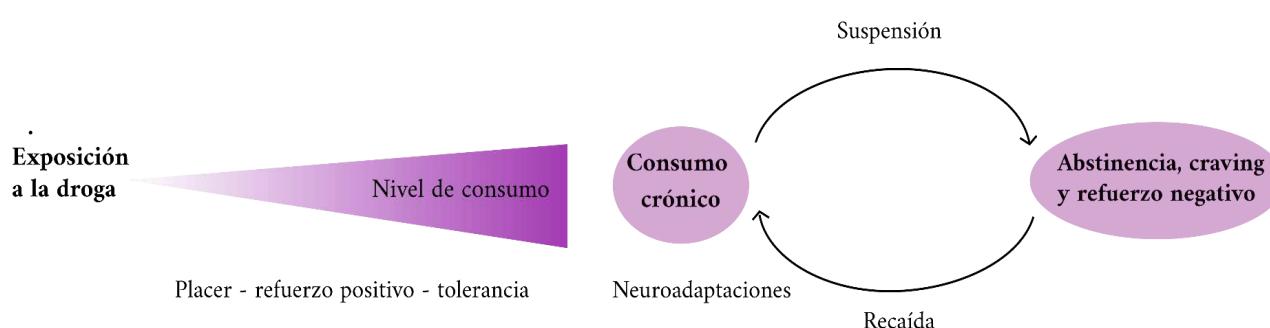


Figura 1: Imagen que representa el ciclo de la adicción. Se ilustra la exposición inicial, luego como la sensación de placer y los refuerzos positivos pueden llevar a un aumento en el nivel de consumo y a la tolerancia. Esto puede culminar en un consumo crónico, asociado a episodios de abstinencia y recaídas. Imagen modificada y adaptada de Jessica N. Cleck and Julie A. Blendy

2008 (Cleck & Blendy, 2008).

1.2 Circuito de recompensa

El ciclo de la adicción está estrechamente relacionado con la activación del circuito de recompensa en el cerebro. Este circuito, es responsable de generar sensaciones de placer y refuerzo ante estímulos positivos. La estimulación excesiva y repetida de este sistema provoca una liberación masiva de dopamina, creando un refuerzo positivo intenso (Koob & Volkow, 2010). Con el tiempo, el cerebro se adapta a estos niveles anormales de recompensa, reduciendo su sensibilidad natural, lo que lleva a la necesidad de mayores estímulos para obtener el mismo efecto placentero. Es decir que el uso continuo de sustancias abusivas disminuye los niveles de producción natural de dopamina, lo que induce la dependencia de las drogas para mantener los niveles basales. Este fenómeno perpetúa el ciclo de búsqueda y consumo compulsivo característico de la adicción, mientras las funciones de control y regulación emocional se ven deterioradas (Ungar-Sargon, 2024).

La **vía dopaminérgica (DAnérgicas) mesocorticolímbica** del circuito de recompensa actúa como mediador de los efectos gratificantes de los reforzadores naturales (por ejemplo, comida, bebida y sexo) y de las drogas de abuso (Wise, 1980). Este sistema, está formado por cuerpos celulares de neuronas DAnérgicas que se proyectan desde el área tegmental ventral (VTA) a varias estructuras como la **vía mesolímbica** y la **vía mesocortical** (Figura 2). La vía mesolímbica incluye regiones como el n úcleo accumbens (NAc), el p álido ventral, la amigdala, el hipocampo y el n úcleo del lecho de la estría terminal (BNST). La **vía mesocortical**, incluye la corteza prefrontal (CPF), la corteza orbitofrontal (CFO) y el cíngulo anterior (Feltenstein et al., 2021). El n úcleo accumbens (NAc) y la corteza prefrontal (CPF) tienen particular relevancia en el consumo de drogas. El NAc cumple un rol importante en la adicción ya que est á asociado al procesamiento cognitivo de la motivaci ón, recompensa, placer, refuerzo positivo entre otras (Hyman et al., 2006). Por su parte, la CPF est á involucrada en la regulaci ón de las emociones, motivaci ón, socializaci ón en tanto una disfunci ón en esta regi ón se la asocia a desordenes psiquiátricos y neurol ógicos como la ansiedad, depresi ón, adicciones, etc (Xu et al., 2019).

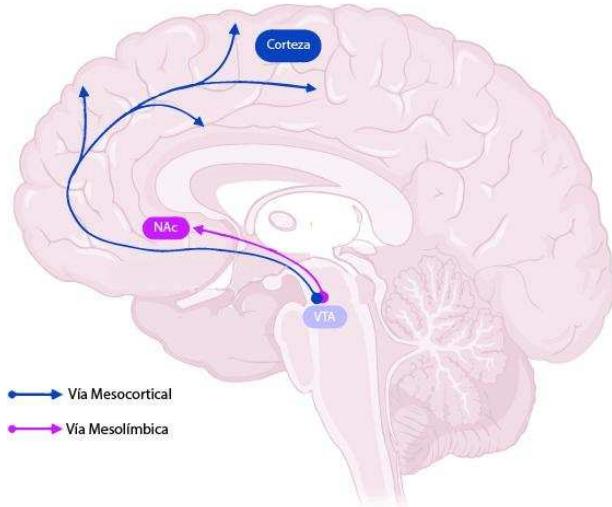


Figura 2: Esquema del circuito de recompensa que señalan la vía mesolímbica y la vía mesocortical. En rosa se representa la proyección de las neuronas DAnérgicas de la VTA al NAc a través de la vía mesolímbica. Por otro lado, en azul se representa como las neuronas dopaminérgicas en el área tegmental ventral (VTA) se proyectan hacia la corteza prefrontal (PFC) a través de la vía mesocortical. Imagen extraída y modificada de Haiyun Xu, 2022

Los circuitos mesolímbico y mesocortical operan en paralelo, con papeles diferentes en el proceso de adicción (Camí & Farré, 2003). La vía mesolímbica (especialmente el VTA y el NAc) está implicada en el refuerzo agudo de la droga y en el consumo ocasional, y la vía mesocortical (en particular la corteza prefrontal) están implicadas en la intensificación/dependencia. Ambas vías están implicadas en la mediación de las respuestas condicionadas, la necesidad de consumo y la pérdida de control conductual que se cree que subyacen a la abstinencia y la recaída (Feltenstein et al., 2021).

1.3 Situación a nivel mundial del consumo de sustancias

Según el Informe Mundial sobre las Drogas 2020 presentado por la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), durante el periodo de 2006 al 2018, la prevalencia del consumo de drogas aumentó más del 12% para la población adulta, pasando del 4,8 % en 2009 al 5,4 % en 2018. El aumento de consumo de drogas fue más elevado en los países en desarrollo que en los países desarrollados, una tendencia explicada mayormente por las diferencias en las tasas de crecimiento demográfico y la concentración del consumo de drogas entre los adolescentes y jóvenes, que tienen un mayor peso en la estructura poblacional de los países en desarrollo. Otro factor demográfico de relevancia es la creciente urbanización de estos países, ya que el consumo de drogas es mayor en las zonas urbanas que en las rurales (UNODC, 2020).

Por otro lado, en 2021 más de 296 millones de personas consumieron drogas, lo que supone un aumento de 23% con respecto a la década anterior. El cannabis sigue siendo

la droga más consumida; según las estimaciones, 219 millones de personas (el 4,3 % de la población mundial adulta) consumieron cannabis, 36 millones de personas habían consumido anfetaminas, 22 millones habían consumido cocaína y 20 millones habían consumido sustancias de la familia del éxtasis en el año anterior. En términos generales, el consumo abusivo de drogas se ha disparado hasta los 39.5 millones, lo que supone un aumento de 45% en 10 años.

Particularmente para el consumo de cocaína, la prevalencia estimada del consumo ha aumentado ligeramente desde 2010 al 2020, pero el número de personas que consumen cocaína ha aumentado aún más, un 32% (Figura 3) (UNODC,2020). Se estima que en 2020, aproximadamente 21,5 millones de personas consumieron al menos una vez en el último año, lo que representa el 0,4% de la población mundial de entre 15 y 64 años.

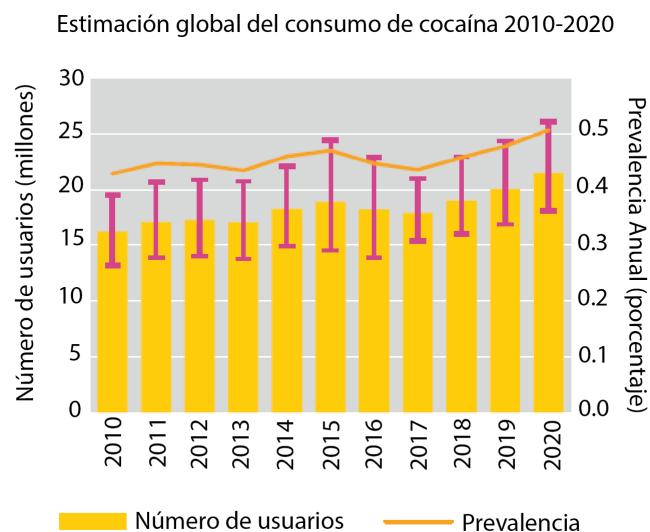


Figura 3: Prevalencia y número de usuarios (millones) que consumieron cocaína entre el año 2010 y el año 2020, en un rango etario de 15 a 64 años. En el eje y u ordenada de la izquierda se grafica el número de personas y en el eje y u ordenada de la derecha la prevalencia anual. UNODC, World Drug Report 2022 (United Nations publication, 2022).

Más allá de la relevancia de esta problemática a nivel mundial, la demanda de tratamientos para trastornos relacionados con las drogas continúa en gran medida insatisfecha de acuerdo con el Informe. En 2021, solo una de cada cinco personas que padecía trastornos relacionados con las drogas seguía un tratamiento para su consumo, y las disparidades en el acceso a tratamientos entre regiones son cada vez mayores.

Dentro de los tratamientos que han demostrado eficacia para la adicción a las drogas se encuentran los enfoques conductuales, como la terapia cognitivo-conductual. Sin embargo, esta terapia implica un alto costo y requiere personal especializado, lo que acentúa las desigualdades al acceso de estos tratamientos (Mellentin et al., 2017). A su

vez, esta terapia usualmente se encuentra acompañada del uso de medicamentos para reducir los síntomas de la abstinencia. Estos varían según el tipo de droga y generalmente imitan compuestos que proporcionan un alivio o prolongan la sensación de recompensa, cuya dosis puede reducirse gradualmente hasta finalmente abstenerse (Koijam et al., 2024). El éxito de las estrategias actuales es limitado con una tasa de recaída del 40% al 60%.

1.3.1 Consumo abusivo de cocaína a nivel regional

Los países sudamericanos han informado diferentes tendencias en la prevalencia del consumo de cocaína durante la última década, siendo Argentina el país con mayor aumento. Según datos de la ONU, entre 2010 y 2020, el porcentaje de personas que consumieron cocaína en Argentina pasó del 0,7% al 1,6% de la población, porcentaje que equivale a 4,7 millones de personas (Figura 4). Esta tendencia de aumento posiciona a Argentina, como uno de los principales mercados de cocaína en la región (UNODC,2022)

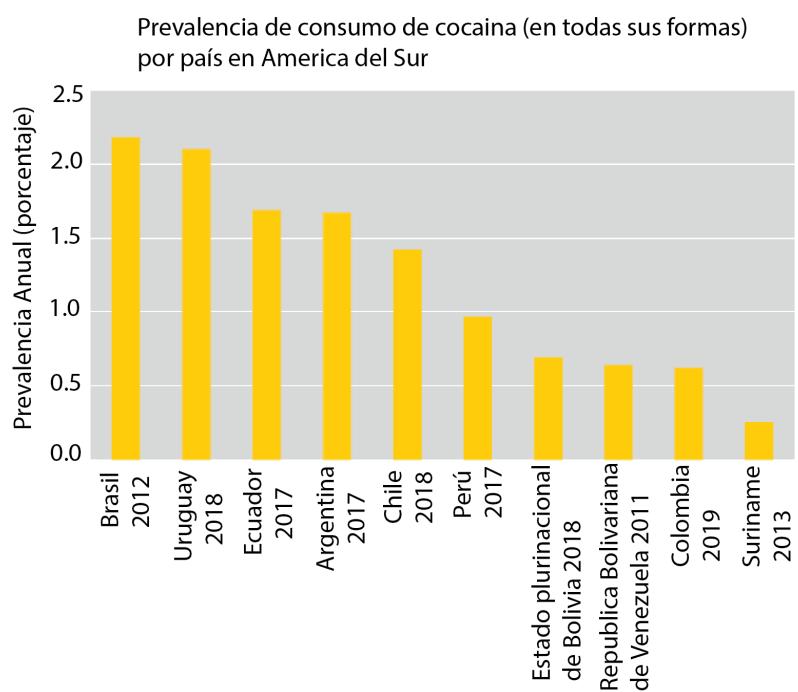


Figura 4: Gráfico extraído del informe de drogas a nivel mundial del 2022 de Naciones Unidas (UNODC,2022) donde se observaban los datos de prevalencia anual de consumo de cocaína (en todas sus formas) en los diferentes países de América del Sur. UNODC, World Drug Report 2022 (United Nations publication, 2022).

1.4 Formas de consumo de la cocaína

La cocaína, desde el punto de vista químico, es la benzoilmetilecgonina, es decir un éster del ácido benzoico y una base que contiene nitrógeno (Figura 5). Las dos formas

químicas principales en que se presenta la cocaína son la sal soluble en agua y la cocaína base insoluble en agua. Generalmente, la cocaína en forma de sal puede inyectarse o consumirse por inhalación nasal, mientras que la forma base insoluble se consume mediante el fumado (Raverta et al., 2016)

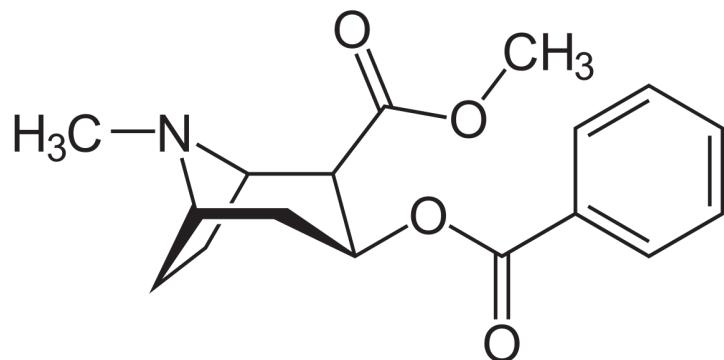


Figura 5: Estructura de la cocina o benzoilmetylcgonina

Estas formas de consumo tienen diferentes características, partiendo de la base que la ruta de ingreso al organismo es diferente, así como la pureza del producto y el agregado de adulterantes. A su vez difieren en la latencia, magnitud y duración de sus efectos agudos, así como la frecuencia de uso y la cantidad de ingesta por sesión (Gossop et al., 1994). Las cocaínas fumables presentan un mayor potencial de abuso debido a un refuerzo más fuerte (y una llegada más rápida al cerebro) en comparación con las vías con inicio más lento de los efectos (por ejemplo: consumo de cocaína por inhalación nasal) (Hatsukami, 1996)

1.5 Cocaínas fumables: Pasta base de cocaína

Según la definición de Castaño, las cocaínas fumables son sustancias derivadas de la hoja de coca (*Erythroxylum coca*) que después de su procesamiento químico adquieren características físicoquímicas que le dan puntos de fusión bajos y pueden ser volatilizados por sublimación o ebullición utilizando calor (Castaño, 2000a). Tanto la Pasta Base de Cocaína (PBC), como el Crack y la Base Libre, son cocaínas fumables. De todas ellas, el PBC se instaló a principios del siglo XXI en América del Sur, principalmente en Argentina, Chile, Uruguay y Brasil (Raverta et al., 2016).

1.5.1 Proceso de producción de PBC

Generalmente, el proceso de producción de la pasta base de cocaína (Figura 6) involucra disolver en agua las hojas de coca junto con sustancias alcalinas como carbonatos o hidróxidos (de sodio, de potasio o de calcio). Esas hojas de coca humedecidas se maceran en kerosene, para extraer la cocaína junto con los otros alcaloides. Al líquido resultante de la maceración se lo mezcla con ácido sulfúrico para generar sulfato de cocaína y así separar la cocaína del kerosene y del resto de las grasas y ceras de la hoja

de coca (Castaño, 2000a). Por último, se agrega amoníaco para precipitar la cocaína, que luego se filtra y se deja secar.

La pasta base de cocaína se refiere a uno de los productos intermedios del proceso de extracción del clorhidrato de cocaína (Castaño, 2000a). Es un producto con menos pureza que la cocaína que resulta más fácil de elaborar, más económico y de fácil acceso para el consumidor. Posee un color amarillento o amarronado y es semisólida, conteniendo cocaína en forma de sal y base libre, otros alcaloides, residuos de los procesos de extracción (ElSohly et al., 1991) y una amplia gama de adulterantes incorporados para incrementar su volumen, peso o atractivo (Castaño, 2000a)

PROCESO SIMPLIFICADO DE PRODUCCIÓN DE LAS COCAÍNAS FUMABLES

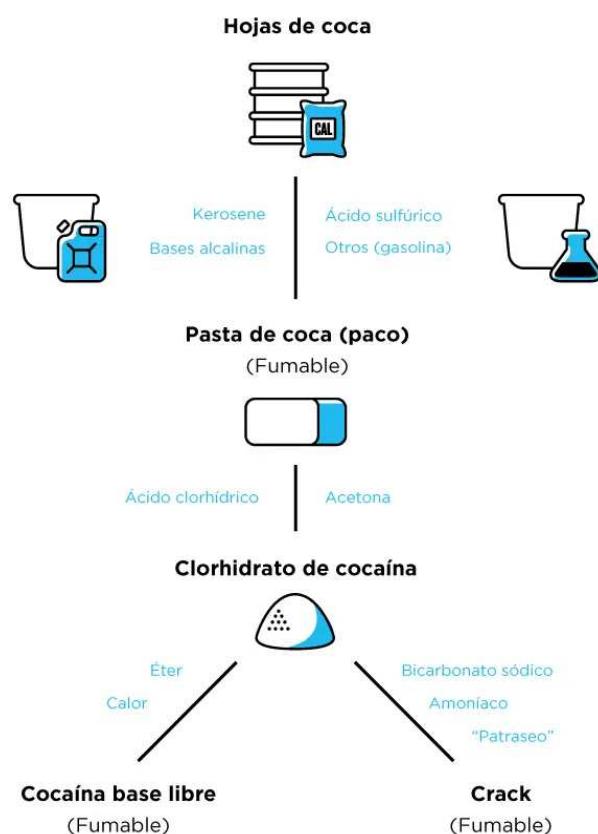


Figura 6: Este diagrama muestra esquemáticamente cómo se procesan las diferentes formas de cocaína fumables. La PBC corresponde a la pasta de coca (paco) en la imagen. El último paso para la obtención de "base libre" y "crack" es lo que vulgarmente se denomina "patraseo". Modificado de (Castaño, 2000).

La base libre y crack se obtienen a partir del clorhidrato de cocaína pero difieren fundamentalmente por su proceso de elaboración. La base libre se obtiene añadiendo éter y calor elevado al clorhidrato de cocaína. En cambio si lo que se utiliza es

bicarbonato sódico, amoniaco y agua con calor moderado, el producto final será el Crack (Castaño, 2000a). Ambas formas involucran procedimientos rudimentarios de laboratorio que los mismos consumidores incluso pueden realizar y al cual ellos mismos vulgarmente llaman “patraseo” (volver atrás) (Castaño, 2000a).

1.5.2 PBC y la presencia de adulterantes

En Argentina, según muestras incautadas desde octubre de 2014 hasta febrero del año 2015, los principales adulterantes encontrados en muestras de cocaínas fumables fueron: cafeína (35%), lidocaína (32%) y fenacetina (29%). La **cafeína** es una sustancia psicoactiva que tiene la propiedad de potenciar las acciones psicoestimulantes y reforzadoras de la cocaína (Reventa et al., 2016). Por otra parte, la **lidocaína** es un fármaco perteneciente a la familia de los anestésicos locales que ejerce sus acciones anestésicas a través del bloqueo de canales de sodio, alterando la transmisión de los potenciales de acción, bloqueando las fibras nerviosas que transmiten el tacto, impulsos motores o quinestesia (sensación de movimiento de músculos, tendones y articulaciones). Por último, la **fenacetina** posee propiedades analgésicas (reduce el dolor muscular) y antipiréticas (comúnmente se utiliza para tratar la fiebre y bajar la temperatura corporal).

En los últimos años, se ha detectado también la presencia de **levamisol**, un antiparasitario de uso veterinario que aumenta los niveles de dopamina en el cerebro, con el objetivo de prolongar los efectos de la cocaína, pero que tiene un gran riesgo asociado por producir agranulocitosis (Pellegrini et al., 2013). Esta última es una condición médica grave caracterizada por una disminución de granulocitos en la sangre que deja al cuerpo más expuesto a infecciones debilitando el sistema inmune. Además de los adulterantes ya nombrados, se utilizan productos como lactosa, talco, manitol, harina de trigo, polvo de ladrillo y azúcar morena, para aumentar el volumen (Pascale et al, 2014).

Tanto la ruta de ingreso al organismo como la presencia de adulterantes son determinantes críticos asociados al consumo abusivo de PBC. Se postula que la PBC produce una activación de manera más brusca del sistema de recompensa facilitando el aprendizaje contextual, lo que estaría muy relacionado a su alto potencial adictivo (de la Fuente et al., 2021).

1.5.3 Consumo abusivo de PBC en América latina y Argentina

El consumo de PBC aparece en América del Sur a principios de la década del '70. Sin embargo, se instala en el mercado de las sustancias ilegales en la Argentina en el transcurso de la profunda crisis socioeconómica de los años 2001 y 2002 aumentando su consumo en un 200% desde el 2001 hasta el 2005 y afectando principalmente a los sectores de menores recursos (SEDRONAR, 2005). Si bien la prevalencia de consumo de

PBC en los últimos años es baja (0,9%), la misma se duplica o triplica si se considera la población por debajo de los 25 años y de bajo nivel socioeconómico. Estos sectores más vulnerables tienden a acceder a drogas más baratas y de peor calidad, lo cual aumenta el riesgo de dependencia y pone en riesgo su salud (Camarotti et al., 2017).

Dos estudios realizados en 2006 y 2009 mostraron que los consumidores de PBC en la población general son en su mayoría varones de hasta 25 años. También se observó que en estudiantes secundarios de la CABA (SEDRONAR, 2007), el PBC y los inhalantes son las drogas que se consumen a más temprana edad; resultando la media de edad de inicio a los 12 años para ambas sustancias mientras que el promedio de edad de inicio en el consumo de otras drogas como la marihuana, cocaína y éxtasis es alrededor de los 14 años (Brasesco, M. V., Canay, R., & Legisa, A., 2010). Estos datos indican que el consumo de PBC representa un serio problema dada la baja edad y la situación de vulnerabilidad de las personas que lo consumen.

1.5.4 Efectos fisiológicos asociados al consumo abusivo de PBC

El consumo abusivo de PBC tiene efectos a diferentes niveles tanto a nivel físico, orgánico y psicológico. Esta sustancia, al ser una forma de cocaína fumable, posee una rápida absorción pulmonar y efectos intensos de corta duración (Castaño, 2000b). La PBC produce una respuesta rápida de placer intenso de 3 a 4 segundos que decae rápidamente. Los consumidores de PBC suelen presentar aumento de la presión arterial, temperatura corporal, frecuencia respiratoria y cardíaca, así como alteraciones motrices e hipersensibilidad sensorial (Castaño, 2000a). Al cesar estos efectos, aparece un síndrome ansioso-depresivo, donde el consumidor experimenta angustia y *craving* (Castaño, 2000a). La intensa respuesta de *craving* puede provocar intoxicaciones severas o psicosis (Castaño, 2000a). Postconsumo se presenta un estado de agotamiento, irritabilidad, sudoración y sueño (Castaño, 2000a). Estos síntomas pueden desaparecer en pocas horas y dar paso a un nuevo episodio de consumo (Castaño, 2000a). El consumo prolongado de PBC, lleva a la delgadez extrema, problemas de vista, heridas en los labios producidas por la pipa además de problemas pulmonares con dificultad para respirar y daños neurológicos. Además, se caracteriza por la pérdida de proyectos y de sentidos, desmotivación, despersonalización, miedo, paranoia y a nivel social, lleva a la pérdida de redes sociales familiares, escolares, laborales, etc (Brasesco, M. V., Canay, R., & Legisa, A., 2010).

1.5.5 Efectos conductuales y neurológicos asociados al consumo abusivo de PBC

Si bien hay pocos estudios que aborden los efectos conductuales producidos por el consumo abusivo de PBC, se ha demostrado en modelos animales que ratones hembra CF-1 (5 semanas) inyectados con PBC de forma diaria, y sujetos luego a 10 días de abstinencia, presentaban un comportamiento de tipo ansioso y alteraciones en la

memoria de reconocimiento (Berardino et al., 2019). Por otro lado, en un estudio realizado con ratas macho donde se les inyectó peritonealmente PBC se demostró cómo se generaba una sensibilización conductual medida a través de una prueba de locomoción en un campo abierto. En ella se observó que la respuesta de los animales a la droga aumentaba la locomoción progresivamente tras exposiciones repetidas (más allá de que la cantidad inyectada era la misma) resultando en un comportamiento más hiperactivo (Prieto et al., 2015).

Resultados recientemente publicados del laboratorio colaborador indican que adolescentes consumidores de PBC presentan déficits de funciones ejecutivas (como la planificación, toma de decisiones, flexibilidad cognitiva, razonamiento abstracto etc) y atención (de forma sostenida) que correlacionan con una reducción del volumen del caudado bilateral, un área central en el control de estas funciones (de la Fuente et al., 2019). En este trabajo, se observó que los consumidores de cocaína por inhalación nasal poseían una tendencia hacia el deterioro del procesamiento relacionado con la memoria, mientras que el grupo consumidor de PBC mostró un déficit de atención más fuerte.

Además, en otro trabajo se midió la empatía al dolor mostrándole a los sujetos diferentes escenarios, en donde se evaluó su respuesta a través del lenguaje corporal y preguntas estandarizadas (Baez et al., 2021). En este contexto, se observó que los consumidores de PBC poseían una disminución de la empatía que se correlacionaba con una disminución del volumen de materia gris en regiones del cerebro asociadas a la cognición social como, el lóbulo parietal inferior derecho y giro supramarginal y angular.

Por otra parte, un estudio del flujo sanguíneo a través de una tomografía por emisión de fotón simple (SPECT) cerebral mostró que consumidores de PBC muestran una disminución en la actividad en la PFC (Ferrando y cols. 2009).

1.5.6 Cambios moleculares en el sistema nervioso central asociado al consumo abusivo de PBC

Hasta el momento no hay reportes que demuestren cambios a nivel molecular asociados al consumo de PBC en muestras humanas, sin embargo, se han observado diversos cambios en modelos animales expuestos tanto a PBC como a otras formas de cocaína.

En ratones inyectados con PBC de forma diaria (y luego de 10 días de abstinencia) se encontraron alteraciones en la expresión de los genes de expresión temprana (de su abreviatura en inglés *-Inmediately early genes- IEG*) en el NAc y en la CPF (Berardino et al., 2019). Los IEG se inducen rápidamente y su expresión es influenciada por sustancias adictivas. Además se ha propuesto que podrían ser importantes en la activación de genes target que regulan la adaptaciones implicadas en el proceso adictivo (Bisagno & Cadet,

2019). Por ejemplo, la inyección aguda de cocaína puede provocar aumentos sustanciales en la expresión de c-Fos en la NAc (Hope et al., 1992).

A su vez, otros estudios muestran que genes como Drd1a, Gria1, Cnr1, involucrados en la señalización sináptica, la plasticidad neuronal y la regulación de comportamientos complejos como la recompensa, la memoria y la adicción, se expresan diferencialmente en el NAc y PFC en ratones tratados con PBC y cafeína como adulterante. Esta expresión diferencial estaba asociada a la sensibilización locomotora inducida por PBC. La sensibilización locomotora se refiere al fenómeno en el cual la exposición repetida a una droga como PBC provoca un aumento progresivo en la actividad locomotora en respuesta a la misma dosis de la sustancia. (Prieto et al., 2020).

1.6 Inflamación periférica como mediadora de la neuroinflamación en el abuso de sustancias

Si bien no hay reportes que demuestren cambios a nivel molecular en la respuesta inflamatoria periférica asociados al consumo de PBC en muestras humanas, se han observado alteraciones en los factores inflamatorios en otras sustancias de abuso como la cocaína y el alcohol.

La disfunción del sistema inmunológico y la inflamación crónica han sido asociadas a la fisiopatología del consumo de sustancias (Lacagnina et al., 2017). Las respuestas inflamatorias desencadenadas por el abuso de sustancias están mediadas por citoquinas, y este grupo incluye interleuquinas (IL), quimiocinas, interferones (IFN) y factores de necrosis tumoral (TNF) . Estas citoquinas son pequeñas proteínas generadas por células del sistema inmunológico, como macrófagos y linfocitos (Agarwal et al., 2022) .

Una de las principales vías de señalización por las que se activa el sistema inmune innato es a través del factor nuclear NF- κ B (*nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of the activated B cell*) que promueve la expresión de mediadores inflamatorios. Este factor de transcripción activa la liberación de citoquinas proinflamatorias como interleuquina 1 β (IL-1 β) y el factor de necrosis tumoral (TNF- α) que, en el contexto de abuso de sustancias, intervienen en la neuroinflamación y se han relacionado a los procesos neurobiológicos que ocurren durante el desarrollo de una adicción. A su vez, la activación del receptor de TNF- α estimula a NF- κ B (Gerondakis et al., 2014), generando un feedback positivo sobre esta vía de señalización. Por otro lado, citoquinas como IL-6 o IL-10 pueden tener acciones proinflamatorias o antiinflamatorias dependiendo de cada situación.

En el SNC, la microglía (una de las principales células inmunitarias residentes en el cerebro) desempeña un papel importante en la progresión de la adicción. Se ha observado que los ciclos repetidos de administración de drogas provoca una inducción progresiva y persistente de la neuroinflamación mediante la liberación de citocinas proinflamatorias

microgliales y esto puede afectar la función neuronal (Li et al., 2024). Por lo tanto, se ha propuesto que la neuroinflamación está involucrada en las adaptaciones neuronales tras la exposición crónica a sustancias adictivas (Lacagnina et al., 2017).

Se ha propuesto que los factores proinflamatorios de las células del sistema inmune son liberados en la sangre por el consumo de sustancias adictivas, los mismos atraviesan la barrera hematoencefálica induciendo, a su vez, la liberación de factores proinflamatorios por parte de las células microgliales en el cerebro (Figura 7). Además, la inflamación periférica puede asociarse a la neuroinflamación porque puede producir la alteración de la barrera hematoencefálica y de esta manera facilitar, aún más, la infiltración de mediadores inflamatorios en el sistema nervioso central (Morcuende et al., 2021)

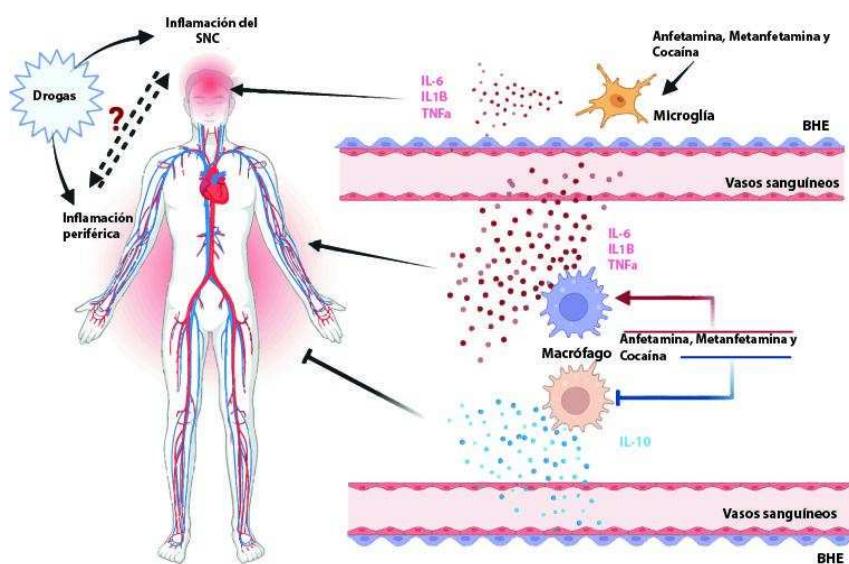


Figura 7: Relación entre la inflamación periférica y la neuroinflamación inducida por psicoestimulantes. Los psicoestimulantes pueden inducir inflamación periférica y del sistema nervioso central (SNC) a través de las células inmunitarias. Por un lado, activan los macrófagos y promueven la producción de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) y la inhibición de la producción de IL-10. Por otro lado, los psicoestimulantes activan la microglía y promueven la liberación de citoquinas proinflamatorias (IL-1 β , TNF- α e IL-6) a través de la microglía en el cerebro. Sin embargo, no está claro si la inflamación periférica y del SNC se activan directamente entre sí en el contexto de la adicción a psicoestimulantes. Imagen modificada y extraída de Hongyuan Li, 2024

Una de las sustancias de abuso más estudiadas con respecto a cambios inflamatorios a nivel periférico es el alcohol. Se ha demostrado que altas concentraciones de alcohol aumentan la actividad de NFkB en cultivos astrogliales humanos. En muestras de sangre humanas, por su parte, se observó un aumento de los factores proinflamatorios TNF- α y IL-1 β en sangre de consumidores crónicos de alcohol.

En cuanto al consumo de cocaína se ha encontrado que la expresión y/o fosforilación de

las subunidades de NFkB y la actividad de NFkB están reguladas positivamente en el NAc por la acción crónica de administración de cocaína *in vivo* en ratones mediando la morfología neuronal (Russo et angal., 2009). En humanos, por su parte, se ha demostrado que el consumo crónico de cocaína conduce a un aumento de los niveles de IL-6 (actuando de forma proinflamatoria) en suero y una disminución de los niveles de la citoquina antiinflamatoria IL-10 (Moreira et al., 2016). En términos generales se ha asociado al consumo de cocaína con un aumento de marcadores proinflamatorios periféricos (Correia et al., 2020)

1.7 Mecanismos epigenéticos asociados al consumo abusivo de sustancias

Los mecanismos epigenéticos son aquellos que están involucrados en el control de la expresión génica y están asociados a modificaciones químicas en la cromatina pero no a los cambios en la secuencia del ADN. Estas modificaciones químicas inducen cambios en la estructura de la cromatina (condensación y descondensación) que produce el ocultamiento o exposición de regiones génicas específicas. La exposición y el ocultamiento permiten o inhiben el acceso de la maquinaria transcripcional respectivamente y, por lo tanto, la expresión génica se activa o reprime. Los mecanismos epigenéticos incluyen la metilación del ADN; la modificación de las histonas (acetilación, metilación, sumoilación, fosforilación, ubiquitilación, dopaminilación y crotonilación, entre otros) y regulación de la expresión génica mediante ARN no codificantes (Koijam et al., 2024).

La regulación de la expresión génica que se produce en respuesta a estímulos ambientales involucra mecanismos epigenéticos y es por esta razón que ha emergido en los últimos años como factor asociado a los comportamientos adictivos. Se plantea que el consumo abusivo de sustancias provoca alteraciones epigenéticas, y, de manera similar, los cambios epigenéticos inducidos por el ambiente también pueden promover la adicción. De esta manera, el consumo abusivo de sustancias puede inducir cambios en la expresión de numerosos genes a través de mecanismos epigenéticos en diversas regiones del cerebro. A su vez, estos cambios pueden estar acompañados de modificaciones en la estructura y función de distintos circuitos neuronales (Koijam et al., 2024). Se ha propuesto que algunas de estas modificaciones epigenéticas pueden ser hereditarias y pueden provocar cambios en la fisiología y el comportamiento de los descendientes. Por ejemplo, la exposición al consumo de cocaína por parte de los padres aumenta el riesgo de que la descendencia abuse de sustancias en general (Pierce et al., 2018).

1.7.1 Metilación del ADN y consumo abusivo de cocaína

La metilación del ADN es una modificación covalente que involucra la transferencia de un grupo metilo a la citosina en la posición 5 (5metC). La metilación ocurre principalmente en los residuos de citosina contiguos a una guanina que se concentran

en regiones genómicas llamadas islas CpG. Se estima que el genoma humano contiene alrededor de 29.000 islas CpG con ubicaciones cercanas al sitio de inicio de la transcripción. La adición del grupo metilo es realizada por las enzimas metil transferasa (DNMTs). Tanto la metilación del ADN como las proteínas que controlan este proceso actúan en forma dinámica y están involucradas en los procesos de embriogénesis, diferenciación, renovación tisular y respuesta al ambiente (Martin & Fry, 2018). La DNMT1 es la encargada del mantenimiento de la metilación durante la replicación y las DNMT3A y DNMT3B son encargadas de las metilaciones *de novo*. Los cambios de metilación pueden ocurrir de forma específica en un locus, de forma global o en ambas formas (Tavares et al., 2022).

Estudios clínicos y epidemiológicos han indicado que, cambios en el patrón de la metilación global del ADN pueden asociarse a los complejos cambios que ocurren en el desarrollo de una adicción (Anier et al., 2018). Estos cambios, además de afectar la estabilidad genómica, también inducen cambios en la expresión génica (Vaillancourt et al., 2017). En particular, la maquinaria de metilación del ADN se ha observado que se encuentra desregulada en las vías de recompensa del cerebro después de la exposición crónica a la cocaína. La expresión de estos genes ha sido estudiada en distintas regiones del cerebro en modelos de animales de adicción, sin embargo, poco se sabe sobre los cambios que ocurren a nivel periférico cuando se trata de muestras humanas.

Se ha encontrado un aumento de la expresión de DNMT3A y DNMT3B en el núcleo accumbens (NAc) con un tratamiento agudo de cocaína en ratón (Anier et al., 2010). A su vez, en un modelo de sensibilización conductual en ratones tratados con cocaína, se observó un aumento de la expresión de las metilasas en células periféricas de la sangre (Anier et al., 2018). Por otro lado, según experimentos de autoadministración de cocaína en ratas, se reveló que DNMT3A2 regula los recuerdos asociados a señales de drogas que impulsan la reinstauración de la búsqueda de cocaína en el NAc. De esta forma, se cree que esta enzima está relacionada con el deseo y la recaída en contextos de adicción cocaína (Cannella et al., 2018).

Como existen enzimas encargadas de metilar el ADN, también hay enzimas involucradas en la remoción de la 5metC. Las enzimas metil-citosina dioxygenasas de la familia *ten-eleven translocation protein* (TET) son las enzimas involucradas en el proceso de demetilación. Las TETs inducen la oxidación del grupo metilo de 5mC, transformándolo en un grupo hidroxilo y produciendo 5hmC (5-hidroximetilcitosina). Este último producto puede volver a oxidarse por las TETs en 5fC (5-formilcitosina) y 5caC (5-carboxicitosina). Estas formas oxidadas transitorias pueden ser reconocidas y eliminadas por el sistema de reparación por escisión de bases (BER, por sus siglas en inglés), lo que da lugar a la restauración de una citosina sin metilar (Guo et al., 2011).

Se ha demostrado que la expresión de TET1, pero no TET2 y TET3, está regulada

negativamente en el NAc del ratón, después de 24 hrs de la administración repetida de cocaína. Esta disminución de TET1 se observó tanto a nivel del mRNA (medido a través de RT-qPCR) y a nivel proteína (a través de western blot e inmunohistoquímica) (Feng et al., 2015). Por otra parte, se observó una disminución de aproximadamente el 40% en el ARNm de TET1 en la NAc de personas con consumo abusivo de cocaína examinados post mortem (Feng et al., 2015). Estos resultados podrían implicar a TET1 en el proceso adictivo del consumo de cocaína.

Aunque la metilación y la maquinaria encargada de la metilación del ADN ha demostrado ser un mecanismo involucrado en la regulación de la expresión génica, su papel en la adicción a sustancias psicoactivas, y en particular al PBC, sigue siendo poco entendido.

Considerando la naturaleza multifactorial de la adicción a drogas, y en particular el significativo componente social asociado al abuso de PBC, nuestro laboratorio estableció una colaboración con el Instituto de Neurociencia Cognitiva y Traslacional (INCYT) para llevar a cabo un estudio multidisciplinario que integra enfoques psiquiátricos, neuropsicológicos, neuroanatómicos, genéticos y epigenéticos. En esta tesis se presentan algunos de los resultados obtenidos, constituyendo un trabajo pionero en el área, desarrollado a partir de muestras humanas.

2. Hipótesis

Nuestra hipótesis sostiene que, dada la gran toxicidad de la PBC y el inicio temprano de su consumo abusivo, se generaría cambios en la expresión génica asociados a la inflamación y a la maquinaria de metilación. A su vez, estas alteraciones estarían acompañadas de cambios en el patrón general de metilación que impactan en múltiples funciones asociadas a la atención.

3. Objetivo general

Considerando la naturaleza multifactorial de la adicción a drogas, y en particular el gran componente social asociado al abuso de PBC, el objetivo general de este estudio es caracterizar los mecanismos inflamatorios y epigenéticos involucrados en la adicción a la PBC y su relación con los dominios de atención.

3.1 Objetivos específicos

Objetivo 1: Evaluar cambios en la expresión de genes asociados a la inflamación en muestras biológicas de adolescentes consumidores de PBC.

Objetivo 2: Evaluar el patrón general de metilación y cambios en la expresión de las enzimas asociadas a la maquinaria de metilación en muestras biológicas de adolescentes consumidores de PBC.

Objetivo 3: Establecer si hay asociación entre los datos obtenidos de las evaluaciones neuropsicológicas y los cambios en la expresión génica asociados a la inflamación y a la maquinaria de metilación.

4. Materiales y métodos

4.1 Características de la población sobre la cual se extrajeron las muestras:

Para realizar este trabajo se tomaron muestras de sangre y de saliva de 42 participantes, de los cuales 14 cumplieron los criterios del DSM-IV para la dependencia de PBC, 16 cumplieron los criterios para la dependencia de cocaína (CC) y 12 eran sujetos control sin dependencia o adicción (CTR). La historia de consumo se evaluó a través de una entrevista neuropsiquiátrica exhaustiva sobre el abuso de sustancias junto con un cuestionario ASSIST (The Alcohol, Smoking and Substance Involvement Screening Test). Se incluyó el grupo CC como otro modelo de adicción para contrastar con los resultados de PBC. La historia de consumo fue realizada por psiquiatras especialistas en adicciones de la institución colaboradora.

En el momento del estudio, todos los participantes dependientes de drogas estaban voluntariamente internados en comunidades terapéuticas distribuidas en Buenos Aires ubicadas en La Matanza, Belgrano, Quilmes, Guillermo Enrique Hudson, San Fernando, El Palomar, Hurlingam, Barracas, Villa Soldati, San Miguel, Saavedra y Retiro. Los sujetos presentaban al menos un año de consumo abusivo de la droga (PBC o CC) y al menos un mes desde el último consumo. Los controles fueron voluntarios que no tenían antecedentes de abuso de drogas ni diagnóstico previo de trastornos neurológicos y/o psiquiátricos. El no consumo de sustancias se confirmó mediante una prueba de orina (QuickTestTM) de detección de cocaína, anfetaminas o metanfetaminas, benzodiazepinas, cannabis y barbitúricos y sus metabolitos.

Ningún participante presentó antecedentes de enfermedad neurológica o trastorno activo del Eje I anterior al inicio del consumo de drogas evaluado con MINI-Plus o lesión en la cabeza con pérdida de conciencia mayor a 30 min. Tampoco se encontraban bajo tratamiento con psicofármacos al menos un mes antes de su inclusión en el estudio.

Cabe aclarar que todos los participantes proporcionaron un consentimiento firmado de acuerdo con la Declaración de Helsinki. Además, para preservar la identidad de los sujetos, las muestras se encuentran codificadas con números. El protocolo de estudio fue aprobado por el Comité de Ética institucional de la fundación Favaloro, Hospital Universitario (Nº 609/16, registro 554).

Los grupos de sujetos PBC y CC presentaron una preferencia significativa por el uso de PBC y CC, respectivamente. Cabe señalar que ambos grupos consumieron, además de PBC y CC, otras sustancias como: tabaco, alcohol, marihuana entre otras (De la Fuente et al., 2019). Su clasificación dentro de cada grupo de consumo se basó en la droga de abuso que motivó su hospitalización según se evaluó mediante la entrevista MINI-Plus, así como en la información brindada durante la entrevista clínica, y tras el consenso de tres psiquiatras clínicos especializados en trastornos por abuso de sustancias.

4.1.1 Criterios de inclusión y exclusión del protocolo

Los criterios de inclusión fueron ajustados para controlar que nuestros sujetos representen el resultado del uso crónico de la droga durante el periodo crítico de la adolescencia. Como grupo control, se realizaron los mismos estudios en un grupo de adolescentes del mismo rango de edades, género, educación y nivel socioeconómico, sin consumo de sustancias. Los criterios de inclusión fueron los siguientes:

- Sujetos adolescentes (16-22 años) internados voluntariamente en comunidades terapéuticas
- Presentar al menos un año de abuso de la droga que motivó la hospitalización
- Presentar al menos un mes desde el último uso de la droga.

Por otro lado, los criterios de exclusión fueron:

- Individuos sin administración de psicofármacos al menos un mes antes de la evaluación o con dosis bajas.
- No presentar diagnóstico psiquiátrico primario de depresión, trastorno de ansiedad u otro cuadro psiquiátrico o neurológico mayor (evaluado con la MINI-Plus).
- Además, se excluyeron participantes con alta incidencia psiquiátrica familiar a través de una evaluación de la psicopatología familiar

En la figura 8 se observa la línea temporal de cómo se extrajeron las muestras y los estudios realizados en esta población.



Figura 8: Esquema representativo del diseño experimental del estudio. A partir de la entrevista psiquiátrica sobre el abuso de sustancias, los participantes se dividieron en 3 grupos: CTR, CC y PBC. Posteriormente se les extrajo las muestras biológicas para analizar la respuesta inflamatoria y

la metilación del ADN y finalmente se les realizó una evaluación neuropsicológica donde se midió la atención.

4.1.2 Demografía

Las muestras fueron emparejadas por variables demográficas de edad, sexo (masculino:femenino), educación y nivel socioeconómico. El nivel socioeconómico fue medido como capacidad de acceso a consumo con el cuestionario adaptado al español ESOMAR (Investigaciones de Mercado y Opinión Pública, 2000; Research, 2003). La escala consiste en las siguientes categorías (muy alta:alta: media alta: media:media baja:baja). En este cuestionario se realizaron preguntas en base al acceso de bienes y servicios como cantidad de vehículos, habitaciones y acceso a internet. Además, se les realizó un cuestionario de necesidades básicas insatisfechas (Dirección Nacional de Relaciones Económicas con las Provincias (DINREP), 2014) agregando la categoría calle para los sujetos que se encontraban en tal situación previo a la internación (insatisfechas:satisfechas:viviendo en la calle). En este cuestionario se realizaron preguntas en relación a las características de la vivienda, acceso a la educación y situación laboral de los integrantes con los que convive el sujeto.

Al comparar entre los grupos las frecuencias de cada categoría perteneciente a cada variable (por ejemplo frecuencia de mujeres de la variable sexo para el grupo control, PBC y CC), no se observaron diferencias significativas (Tabla 1). En las variables cuantitativas de edad y educación se calcularon las medias de cada grupo y, al realizar un Anova y una prueba de Tukey de múltiples comparaciones, tampoco se observaron diferencias significativas entre grupos.

	PBC(N = 15)	CC (N = 17)	CTR (N = 17)	Chi-cuadrado
Sexo (M:F)	13:2	16:1	15:2	$\chi^2 = .552, p = .759$
Mano dominante (D:I)	14:1	17:0	17:0	$\chi^2 = 2.314, p = .314$
Nivel socioeconómico (MA:A:MA:M:MB:B)	0:1:2:4:5	1:3:4:4:1	0:1:0:9:6	$\chi^2 = 13.17, p = .106$
Necesidades Básicas (I:S:C)	7:1:1	5:9:0	8:8:0	$\chi^2 = 8.67, p = .070$

Tabla 1: Análisis de variables demográficas cualitativas en los individuos de cada grupo. Para evaluar si había diferencias significativas se utilizó el estadístico de chi cuadrado y se tomó un nivel de significancia de $p = 0,05$ como criterio de referencia para indicar diferencias estadísticamente significativas en los resultados obtenidos

				Tukey				
	PBC(N = 15)	CC(N = 17)	CTR(N = 17)	ANOVA	CTR PBC	vs CTR CC	vs PBC CC	vs
Edad	20.30(2.55)	20.20(2.56)	19.10 (2.64)	F(2) = 1.064, n.s. p = .353		.n.s.	.n.s.	
Educación	8.53(1.81)	9.41(1.62)	9.88 (1.11)	F(2) = 3.161, n.s. p = .052		n.s.	n.s.	

Tabla 2: Análisis de variables demográficas cuantitativas en los individuos de cada grupo. Para evaluar si había diferencias significativas se utilizó el estadístico el estadístico de Anova y el test a posterior Tukey y se tomó un nivel de significancia de $p = 0,05$ como criterio de referencia para indicar diferencias estadísticamente significativas.

4.2 Obtención y almacenamiento de muestras

Primero se obtuvo la muestra de sangre y se la colocó en tubos especiales Tempus Blood RNA Tube (Thermo Fisher) para su conservación y posterior extracción de mRNA. Luego se tomaron las muestras de saliva (5 ml) por colección pasiva dentro del mismo rango horario (12:00 a 14:00 horas).

Todas las muestras se alicuotaron y conservaron a -80°C para su posterior extracción.

Para el desarrollo de esta tesis de licenciatura, se partió de las muestras de sangre y saliva ya tomadas.

4.3 Extracción de RNA

El RNA fue aislado con el kit Tempus Spin RNA isolation reagent Kit (Applied Biosystems) siguiendo las instrucciones del fabricante. El proceso de extracción consiste, en términos generales, en un paso de aislamiento y un paso de purificación.

Para el aislamiento, primero se transfirió la muestra de sangre desde el tubo Tempus donde se encontraba almacenado a un tubo falcon de 50 ml. Se completó a un volumen final de 12 ml de PBS 1X y se vortexeó durante 30 segundos para completar la lisis celular (ya realizada en tubo inicial) y liberación del ARN. Luego por centrifugación se obtuvo un pellet con el ARN. Éste luego fue resuspendido con la solución de resuspensión que posee el kit.

Para la purificación del RNA resuspendido, se lo pasó por una columna de purificación y se realizaron una serie de lavados. Finalmente, se colocó la columna de purificación en

un nuevo tubo y se le agregó la solución de elución del kit y se lo dejó incubando en calor durante unos minutos. Por último se realizó una última centrifugación del eluido y se almacenó la muestra a -80 grados centígrados.

4.3.1 Cuantificación de la muestra de ARN y chequeo de la integridad de la misma

Se cuantificaron las muestras de ARN con el NanoDrop. La concentración de ARN se determina midiendo la absorbancia a 260 nm (una unidad de absorbancia = 40 µg/ml de ARN). Para analizar su pureza y la posible contaminación por proteínas analizó el cociente 260/280.

También se evaluó la integridad del ARN a través de una electroforesis. Para ello, se corrieron 500 ng de RNA de las muestras en un gel de 1,5% agarosa. Se tomaron los recaudos correspondientes para evitar contaminaciones y se desinfectó la cuba de electroforesis y los elementos de siembra con RNAzap (NaOH 0,1 M y EDTA 1mM).

Como se observa en la Figura 9, las muestras que se encontraban íntegras presentaban dos bandas correspondientes a las dos subunidades mayores del RNA ribosomal (18S y 28S). Sin embargo, algunas de las muestras ejemplificadas en la imagen se encontraban degradadas (como la 55 y la 23).

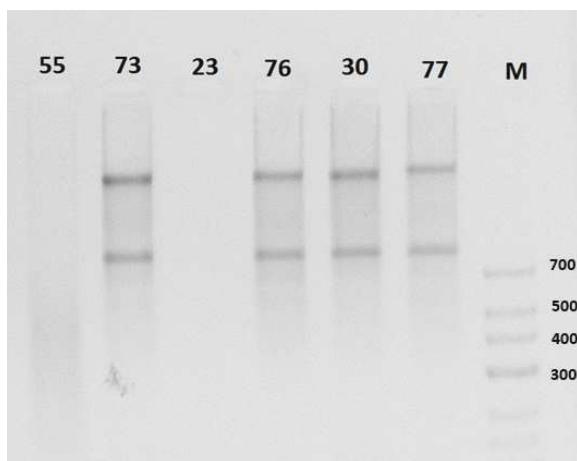


Figura 9: Análisis de la integridad de RNA a través de una electroforesis en gel de agarosa 1,5%. Las seis primeras calles corresponden a muestras elegidas al azar para chequear la eficiencia de la extracción. La última calle corresponde al marcador de peso molecular de ADN. En las muestras 73, 76, 30 y 77 se observan las subunidades 18S y 28S

4.4 Análisis de cambios en la expresión génica por RT-qPCR

4.4.1 Retrotranscripción (RT)

Para realizar la medición de la expresión génica por la técnica de RT-qPCR, primero se hizo una retrotranscripción de las muestras utilizando 800 ng totales de ARN. Para la retrotranscripción (RT) se utilizó oligo-dT dado que se aparea con sus colas de poli-A de los mARNs.

Para ello, se preparó una mezcla general de dNTPs 10 mM, oligo-dT 100 mM y agua en proporciones 1:1:1. Luego se llevaron los tubos al termociclador (Biorad MyCycler) para calentarlos durante 5 minutos a 65 grados. Pasado ese tiempo, se los enfrió en hielo y se les agrego, por un lado, a todas las muestras salvo a los controles (control sin retrotranscriptasa), una mezcla de la enzima transcriptasa (M-MLV), buffer de reacción 5x y agua (en proporciones 1:4:2) y, por otro lado, a las muestras control se les agregó la misma mezcla pero sin la enzima, reemplazando su volumen con agua. La reacción de RT se finalizó en el termociclador siguiendo un programa que consistió en 50 min a 37 °C y 15 minutos a 70 °C para inactivar la retrotranscriptasa.

4.4.2 Puesta a punto de los primers para medir la expresión por PCR en tiempo real (RT-qPCR)

El ADNc (ácido desoxirribonucleico copia) obtenido de la RT fue utilizado para establecer la eficiencia de cada par de primers. Para poner a punto los primers, se utilizó un mix de muestras de prueba a las que se realizó primero una PCR para verificar la amplificación del fragmento deseado. Luego, se realizaron PCRs en tiempo real (RT-qPCR) con diluciones seriadas de la muestra corroborando, a través de la curva de melting, la especificidad del primer. Con los datos de las diluciones seriadas se obtuvo la eficiencia. Se consideró puesto a punto un primer cuando la eficiencia estuvo cercana a 100 (80 y 110%). Cabe destacar que para la puesta a punto de cada par de primers se modificó la dilución de cADN, la concentración de MgCl₂ y la temperatura de hibridización.

Las reacciones de RT-qPCR se hicieron por separado para cada par de primers. De forma general cada una llevó 1,25 µl de buffer de reacción 10X (Inbio), 0,25 µl de mezcla de dNTPs 2 mM cada uno, 2 µl de MgCl₂ 25 mM, 0,5 µl de mezcla de primers directo (F) y reverso (R) 0,5 µM cada uno, 0,1 µl de enzima Taq polimerasa (5.000 U/ml) (Inbio). La mezcla de reacción fue llevada a un volumen final de 12,5 µl con agua. La reacción de PCR se llevó a cabo en el equipo Step One Plus (Applied Biosystems) y consistió de los siguientes pasos: desnaturalización inicial a 95 °C por 10 min, desnaturalización a 94 °C por 15 s, hibridización a 63 °C por 20 s, síntesis a 72 °C por 25 s (estos últimos 3 pasos se repitieron por 40 ciclos), y curva de fusión (desde 60 °C se aumentó la temperatura de a 0,5 °C hasta 95 °C y se midió la fluorescencia en cada punto, para corroborar la especificidad).

Cada muestra fue analizada por duplicado para cada gen. Se utilizó 1 gen de referencia Hprt (hipoxantina guanina fosforibosil transferasa) que se utilizó luego para relativizar la expresión. Los niveles de expresión en todos los casos se calcularon mediante el programa LinReg PCR (Ruijter et al., 2009). En las Tablas 3 y 4 se muestran las secuencias de los pares de primers utilizados y las condiciones finales establecidas para cada uno.

Gen	Primer Forward (5' a 3')	Primer Reverse (3' a 5')
IL-1 β	GGATATGGAGCAACAAGTGGTGT	CACGCAGGACAGGTACAGATT
NF-kB	GCACCCTGACCTTGCCTATT	GCTTTTTCCCGATCTCCA
TNF α	GCCTCTCTCCTCCTGATCG	CAGCTTGAGGGTTGCTACA
IL-6	TGTGAAAGCAGCAAAGAGGCAGTG	ACAGCTCTGGCTTGTCCCTCACTA
IL-10	CATCAAGGCGCATGTGAAC	CACAGGGAAGAAATCGATGACAG
IL-4	AGTTCCACAGGCACAAGCAG	ACTCTGGTGGCTTCCTTCAC
DNMT1	CTGACCTGCTTCAGTGTGT	CAAAGCCAGTGATCCACCATT
DNMT3A	TATTGATGAGCGCACAAGAGAGC	GGTGTCCAGGGTAACATTGAG
TET1	TTCCCCGAATCAAGCGGAAG	ACGGTCTCAGTGTACTCCCTAAG
TET2	ATATGCCTTCACTCGGGTCAC	GCTGAGGTTTTCCCAC
TET3	TGCAGGTTGTCCGTCTGATG	ACTACGCTCCTCCTTCGG
HPRT	TGTGGAAGATATAATTGACACTGG C	ATCCAACACTTCGTGGGTC

Tabla 3: Secuencias de los pares de primers utilizados para la RT-qPCR.

Primer	Tamaño del fragmento (Pb)	Tº de Annealing (ºC)	Concentración de MgCl ₂ (mM)	Dilución del ADNc
HPRT	125	63	8	1/10
IL-6	197	58	3	1/5
IL-1b	115	60	3	1/5
NFKb	71	60	3	1/5
TNF-a	195	60	3	1/5
IL-10	86	63	4	1/5
TET1	91	63	4	1/5
TET2	177	63	3	1/5
TET3	109	63	3	1/5
DNMT1	190	65	3	1/5
DNMT3A	110	65	4	1/5

Tabla 4: Condiciones experimentales óptimas para cada gen.

4.4.3 Análisis cuantitativo de la expresión génica través de LinRegPCR

LinRegPCR es un software diseñado para analizar datos de las RT-qPCR de manera más

precisa que los métodos tradicionales que dependen del umbral de ciclo (Cq o Ct). LinRegPCR se enfoca en la fase exponencial temprana de la curva de amplificación, que es donde la amplificación del ADN es más eficiente. LinRegPCR determina una fluorescencia de referencia (baseline), el umbral (threshold) y aplica una regresión lineal a los datos de la fase exponencial. Este ajuste lineal permite estimar la eficiencia de la amplificación por muestra (a través de la pendiente) y la cantidad inicial de ADN (N0).

Entonces, al tener en cuenta la eficiencia de cada muestra se puede calcular la cantidad inicial de ADN (N0) de una forma más precisa. Este parámetro se calcula a través de la siguiente fórmula:

$$N0 = \frac{F}{E^c}$$

donde F es la fluorescencia medida en cualquier ciclo dentro de la fase exponencial, E es la eficiencia calculada, y C es el número de ciclos que han transcurrido.

Con este software se obtiene el valor de N0 como medida de la expresión génica. Como ya se nombró anteriormente, cada muestra se analizó por duplicado, por lo tanto se dividió el promedio de N0 de cada muestra para los diferentes genes por el promedio de N0 de HPRT (usado como gen de referencia) de la muestra correspondiente. Si la relación de los duplicados estaba por fuera del rango 0.5-2 la muestra fue excluida.

4.5 Extracción de ADN

A partir de las muestras de saliva se extrajo el ADN con el Kit Purelink genomic DNA de Thermo Fisher. Para ello, se realizó un protocolo de purificación por columna que consistió en varios pasos. Primero, para lisar la muestra se homogeneizó con acetato de sodio e isopropanol, luego se centrifugó y se resuspendió el pellet resultante en PBS. Se incorporó el buffer de lisis, el cual se lo dejó incubando por unos minutos. Luego, esta solución resultante se la pasó por la columna y se la centrifugó para descartar el líquido restante. Para los siguientes pasos se colocó la columna (con el DNA pegado a ella) en un tubo nuevo y se realizaron dos pasos de lavado. Para finalizar este proceso de aislamiento de DNA, se le agregó a la columna el buffer de elución, se lo dejó incubando unos minutos y luego se realizó una última centrifugación a máxima velocidad en donde la solución eluida poseía el ADN purificado.

4.5.1 Cuantificación de la muestra de ADN y chequeo de la integridad de la misma

Se calculó la concentración de ADN, utilizando el NanoDrop (una unidad de absorbancia = 50 µg/ml de ADN). Para analizar su pureza y la posible contaminación por proteínas se tuvo en cuenta el cociente 260/280.

Por último para chequear la integridad del ADN se corrió un gel de agarosa 1% y se analizó el patrón de corrida (Figura 10). En la figura 11 se ejemplifica la integridad de unas muestras con una única banda de alto peso molecular.

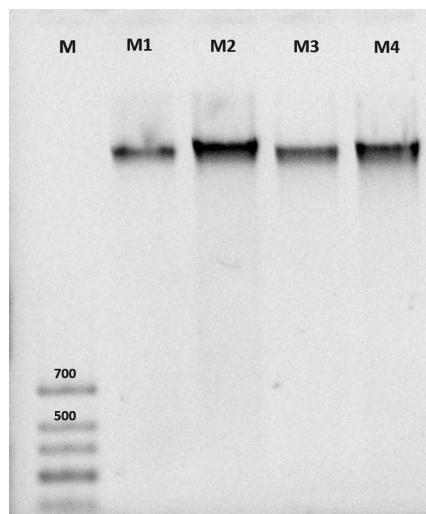


Figura 10: Evaluación de la integridad del ADN obtenida luego de la extracción en un gel de agarosa 1 %. La primera calle corresponde al marcador de peso molecular mientras que las 4 siguientes corresponden a muestras elegidas al azar para evaluar la integridad de las mismas. En las muestras 1, 2, 3 y 4 se observa una sola banda intensa, que verifica que se encontraban íntegras.

4.6 Análisis del patrón general de metilación del ADN

Para analizar el patrón global de metilación del ADN utilizamos un anticuerpo específico que detecta la modificación de la citocina en la posición cinco (5metCit) en el ADN. El nivel global de metilación se realizó mediante la técnica de DOTBlot.

4.6.1 Sonicado de muestras

Para la detección de esta marca en el ADN se requieren fragmentos entre 300- 500 pb de ADN que se obtienen por sonicación. Por lo tanto, previo a la siembra de las muestras en la membrana se realizó la puesta a punto del sonicado de las muestras. Se probaron diferentes repeticiones de un sonicado de 15 seg con 50% de intensidad esperando 1 minuto entre cada medición (dos repeticiones, cuatro repeticiones, seis repeticiones y ocho repeticiones) con 4 muestras aleatorias utilizando el FISHER sonic dismembrator model 300.

Al correr las muestras de las diferentes condiciones en un gel de agarosa 2,5 %, se consideró que la condición óptima fue sonicar 4 veces para obtener los fragmentos en el rango deseado de 300 y 500 pb .

Luego de sonicar las muestras, las mismas fueron tratadas con una solución de desnaturalización 10X (200 mM NaOH, 20 mM EDTA) y calentadas por 10 minutos a 95 grados. Luego, se les agregó rápidamente saline-sodium citrate (SSC) buffer 20X .

4.6.2 Dot blot

Se sembraron todas las muestras por duplicado (con la misma cantidad de ADN) en membranas de nylon que se encontraban dentro de una cámara de vacío para dot blot. Además, se incluyó un blanco (únicamente con buffer) y una curva con distintas diluciones de ADN de 2 ng/ul, 4 ng/ul, 6 ng/ul y 8 ng/ul para cada membrana. Al aplicar vacío, las muestras se unen a la membrana en forma de puntos.

Una vez sembradas las muestras en las distintas membranas se dejaron secar durante dos horas a 80°C para asegurar la fijación a la misma. Luego, las membranas fueron incubadas con una solución de bloqueo (leche descremada en polvo 5% con PBS-Tween) por una hora para reducir los sitios potenciales de unión de proteínas irrelevantes. Luego de dos lavados con PBS 1X, se incubó con el anticuerpo primario específico para 5metC (1/1000, clone 33D3, MABE146 – Millipore) en agitación durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente, la membrana se lavó 2 veces con PBS-Tween 0,05%, durante 10 min y se incubó con el anticuerpo secundario (anti mouse) (1/3000, Sigma A4416) conjugado con la enzima peroxidasa de rabanito (HRP) diluido en solución de bloqueo durante 60 min a temperatura ambiente.

Para revelar se utilizó el kit de detección ECL (Amersham Pharmacia Biotech), basado en la producción de quimioluminiscencia como consecuencia de la digestión de un sustrato de la enzima HRP. La señal fue detectada en un analizador de imágenes Amersham™Imager 600. Se capturaron varias imágenes con diferentes tiempos de exposición y se eligió la mejor imagen teniendo en cuenta su saturación y nitidez.

4.6.3 Cuantificación

Para cuantificar el nivel de metilación global de cada una de las muestras, se analizó la intensidad en cada uno de los pocillos de la membrana de nylon a través del programa ImageJ. Para estimar la concentración de la marca 5mC se utilizó la curva de diluciones de ADN (Figura 11). Para cada membrana se usó un círculo con área constante para todas las muestras. A cada valor de intensidad se le restó el blanco (la intensidad obtenida en un pocillo vacío sin muestra). Finalmente, a través de la ecuación de la recta de diluciones, se estimó la concentración de esta marca en cada pocillo.

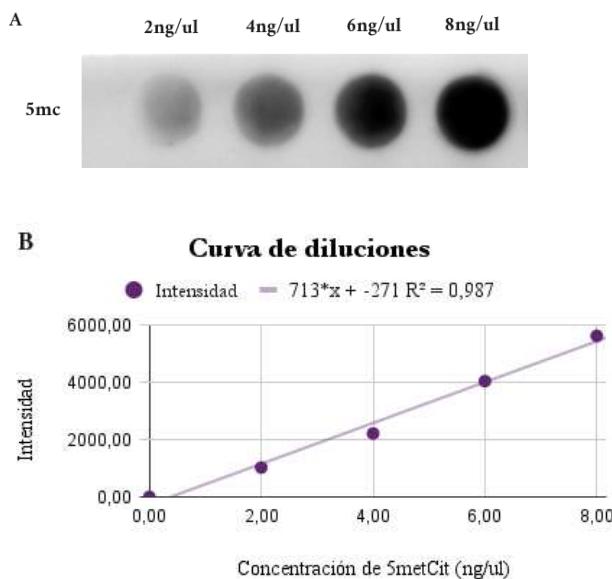


Figura 11: Cuantificación de la membrana de Dotblot. **A:** Membrana representativa del DotBlot con la curva de dilución sembrada por simplificado **B:** Ejemplo de una curva de dilución para calcular la concentración de 5mC conociendo la intensidad a través de la ecuación de la recta.

4.7 Evaluaciones neuropsicológicas de los individuos

Psicólogas/os especializados de del Instituto de Neurociencia Cognitiva y Traslacional -INCYT- (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas - Fundación INECO - Universidad Favaloro INCYT) le realizaron a las/os participantes de este estudio distintas evaluaciones neuropsicológicas para abordar el análisis de funciones ejecutivas, memoria y atención con una serie de pruebas estandarizadas.

Para la realización de esta tesis trabajamos particularmente con los datos de atención, estos resultados si bien ya están publicados e indican que adolescentes consumidores de PBC presentan déficits de atención (de la Fuente et al., 2021) nuestro objetivo principal es correlacionar estos datos a los obtenidos a nivel molecular.

Las pruebas de atención realizadas fueron: la prueba de rango de dígitos hacia adelante, la de bloques de Corsi, la prueba de símbolo-dígito y la prueba de trazados parte A. De cada prueba se obtiene un score que resulta en un score final que corresponde al desempeño en tareas de atención. Utilizando el score final se evaluó la diferencia entre los grupos de consumo y se correlacionaron estos datos con la expresión génica de genes asociados a la inflamación y los niveles de metilación. A continuación se describen brevemente cada una de las pruebas realizadas.

4.7.1 Prueba rango de dígitos hacia adelante

Los participantes recibieron secuencias de números que debían repetir en el mismo orden en que se les presentaban (Weschler, 1999).

4.7.2 Prueba de bloques de Corsi

Se les mostró un conjunto de nueve bloques dispuestos en un tablero, y se les pidió que señalaran los bloques en el orden en que se les habían mostrado (Corsi, 1972).

4.7.3 Prueba de símbolo-dígito

Se presentaron nueve símbolos, cada uno asociado a un número, y los participantes debían completar los números correspondientes a cada símbolo en los espacios vacíos lo más rápido posible dentro de un límite de 90 segundos. Esta prueba evaluaba la velocidad de atención, la búsqueda visual y la atención sostenida (Smith, 1973).

4.7.4 Prueba de trazados parte A

Los participantes tenían que conectar 25 números dispuestos al azar en una hoja de papel, usando un lápiz sin levantararlo, lo que permitía medir la velocidad de atención, la secuenciación y la búsqueda visual. La puntuación se basó en el tiempo total necesario para completar la tarea (Reitan and Wolfson, 1993).

4.8 Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de los datos se utilizó el programa Graphpad Prism 8.0.2. En todos los resultados primero se analizaron los supuestos de normalidad y homogeneidad de varianzas con las pruebas de Shapiro-Wilks y la prueba de homocedasticidad Brown-Forsythe, respectivamente. Se analizó la presencia de outliers con una significancia de 0,05 a través del test de Grubbs. Este método utiliza un estadístico de prueba (Z) que representa la probabilidad de ver ese valor atípico suponiendo que los datos subyacentes sean gaussianos.

Para analizar las diferencias entre los grupos, en los casos donde se cumplió el supuesto de normalidad y homogeneidad de varianzas, se realizó un ANOVA de un factor para analizar el efecto del consumo y posteriormente una prueba de Tukey. En cambio, si los datos presentaban una distribución normal pero una heterogeneidad de varianzas se realizó un Brown-Forsythe ANOVA y un posterior test de Games-Howell's para comparar entre los grupos. Por otro lado, en los casos donde no se cumplió el supuesto de normalidad se realizó una prueba no paramétrica de Krustall Wallis y luego se utilizó el test a posteriori de Dunn para hacer comparaciones múltiples entre los grupos.

Para el análisis de las correlaciones entre las pruebas de atención y los cambios moleculares, se aplicó el análisis de Pearson o de Spearman según la distribución y normalidad de los datos. Finalmente, se utilizaron los coeficientes de las regresiones lineales y p valores para determinar las diferencias significativas.

5. Resultados

5.1 Expresión de genes asociados a la inflamación

Se ha propuesto que el estudio de marcadores inflamatorios periféricos es de gran relevancia para un mejor entendimiento de los procesos patofisiológicos asociados al consumo de drogas (Pera et al., 2010). Distintos procesos inflamatorios han sido relacionados a muchas enfermedades neuropsiquiátricas como la depresión, ansiedad o el abuso de sustancias (Bauer & Teixeira, 2019).

Para determinar si el consumo abusivo de PBC y CC está asociado a cambios en la expresión de genes asociados a la inflamación se analizó la expresión diferencial por RT-qPCR en muestras de sangre de NFKb, IL-1 β y TNF α , los cuales son considerados proinflamatorios (Crews et al., 2011). También se analizó la expresión de IL-10 el cual es considerado antiinflamatorio e IL-6 que pareciera tener un rol dual (Opal & DePalo, 2000).

Al analizar la expresión de NFKb (Figura 12A) se observó que los datos tenían una distribución normal y las varianzas resultaron homogéneas. El análisis del ANOVA de un factor para ver diferencias entre los grupos mostró que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos (pvalor=<0,0001, mediaPBC=0,076, n=14; mediaCC=0,097 n=16; mediaCTR=0,18, n=12). Con el test a posteriori de Tukey se observó que hay una disminución de la expresión de NFKb en el grupo PBC y CC con respecto al control (CTRvsPBC p-valor=<0,0001; CTRvsCC p-valor <0,0001).

Al analizar la expresión de IL-1 β (Figura 12B) los datos presentaron una distribución normal y las varianzas resultaron homogéneas. El análisis del ANOVA de un factor para ver diferencias entre los grupos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos (pvalor=0,22; mediaPBC=2,58, n=14; mediaCC=2,47 n=14; mediaCTR= 3,10, n=12).

Para TNF α (Figura 12C) los datos resultaron normales y las varianzas resultaron homogéneas. El análisis del ANOVA de un factor para ver diferencias entre los grupos indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos (pvalor = <0,0001, mediaPBC=0,153, n =15; mediaCC =0,150 n=14; mediaCTR= 0,243 ,n =10). Con el test a posteriori de Tukey se observó que hay una disminución de la expresión de TNF α en el grupo PBC y CC con respecto al control (CTRvsPBC p-valor=<0,0001; CTRvsCC p-valor <0,0001).

Por otra parte, para IL-6 (Figura 12D) el grupo CC no presentó una distribución normal mientras que los grupos CTR y PBC si mientras que las varianzas resultaron homogéneas. Se realizó un test no paramétrico de Kruskal Wallis en donde se observó que no había cambios significativos en la expresión de IL-6 en los distintos grupos (pvalor =0,21; medianaPBC =0,026, n =10; medianaCC =0,018 n=11; medianaCTR= 0,014, n =

8).

Por último, para IL-10 (Figura 12E) el grupo CC no presentó una distribución normal mientras que los grupos CTR y PBC si. Sin embargo, las varianzas resultaron homogéneas. Se realizó un test no paramétrico de Kruskal Wallis que mostró que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los grupos (pvalor =0,34; medianaPBC =0,016, n=9; medianaCC =0,017 n=9; medianaCTR= 0,010, n = 7).

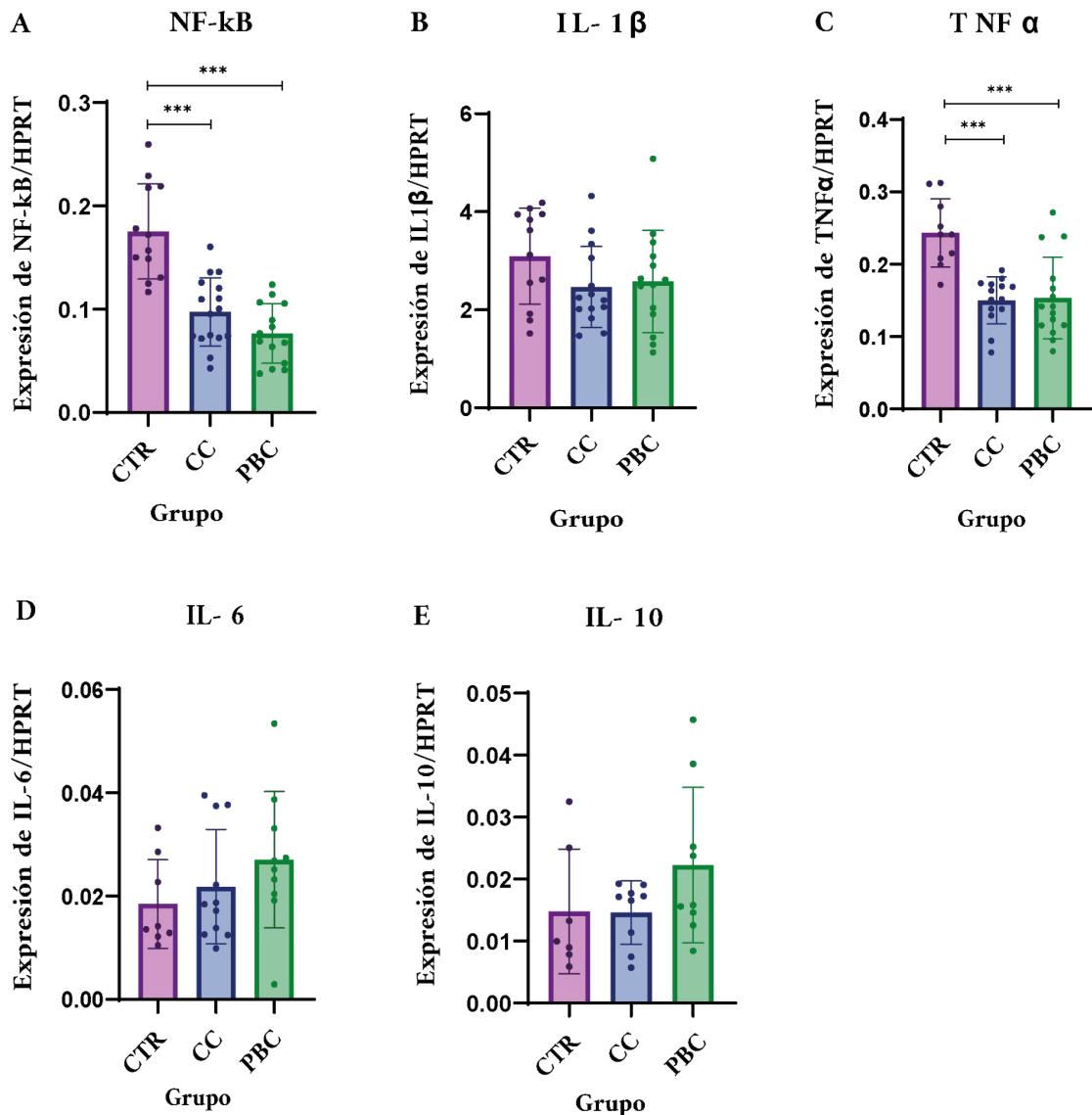


Figura 12: Medición de la expresión de genes asociados a la respuesta inflamatoria, se midió por RT-qPCR en muestras de sangre de los grupos CTR, CC y PBC . Para los genes medidos la expresión se normalizó al gen de referencia HPRT. Tres asteriscos (***) muestran una diferencia significativa de $p<0,0001$. A: NF-Kb; mediante un ANOVA de un factor ($p<0,0001$) y el post test de Tukey se observó una disminución significativa de la expresión tanto en el grupo CC como PBC con respecto al CTR B: IL-1 β ; no se observaron diferencias significativas ns $p=0,22$ C: TNF α ; a

través de un ANOVA de un factor ($p<0,0001$) y el post test de Tukey se observó una disminución de expresión significativa tanto en el grupo CC como PBC con respecto al CTR. D: IL-6;ns $p=0,21$. E: IL-10;ns $p=0,34$.

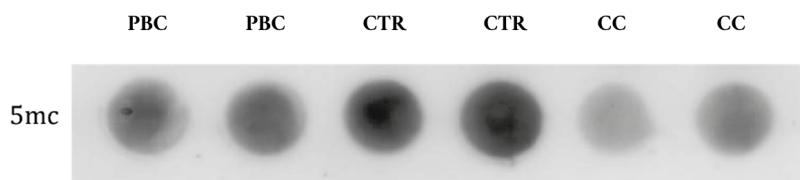
En conjunto estos datos indicarían que hay una disminución de los genes proinflamatorios NFKb y TNF α en el grupo PBC y CC comparado al control. No se observaron cambios en la expresión de IL-6, IL1b e IL10.

5.2 Análisis de la metilación global

Para evaluar diferencias en la metilación global del ADN, las muestras de ADN provenientes de saliva se sembraron en membrana de Nylon utilizando el aparato de DotBlot, se utilizó un anticuerpo específico para 5-metil-citosina (5mC) y la concentración de esta marca en cada muestra fue inferida a partir de la curva de diluciones sembrada en cada membrana.

Al analizar los datos mostraron una distribución normal pero no presentaron homogeneidad de varianzas. Se realizó un Brown-Forsythe ANOVA y se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos (p -valor=0,026; mediaPBC=2,92, n=15; mediaCC=2,99 n=13; mediaCTR=4,91, n=17). Con el test a posteriori de Games-Howell's se observó una tendencia que indica de mayor intensidad de 5mC del grupo control con respecto al grupo PBC (Figura 13) (CTRvsPBC p -valor=0,07; CTRvsCC p -valor=0,11).

A



B

Metilación

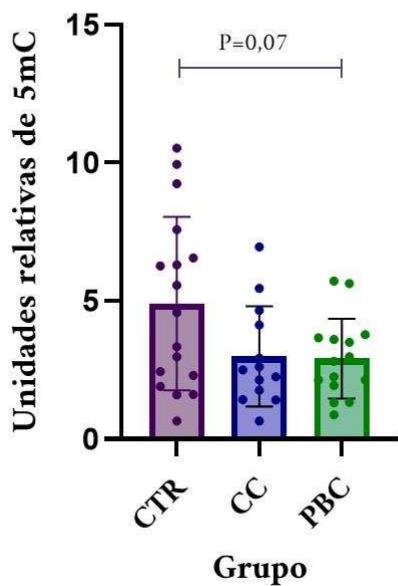


Figura 13 : Medición de la metilación global del ADN, se midió utilizando la técnica de DotBlot en muestras de ADN de saliva de los grupos CTR, CC y PBC usando un anticuerpo específico de 5mC. A: Membranas representativas del dotBlot con las muestras por duplicado. B: Análisis de la metilación global mediante un Brown-Forsythe ANOVA ($p=0,026$) y con un post test de Games-Howell's se observó una tendencia que muestra una disminución de la metilación global en el grupo PBC con respecto al control ($p=0,07$).

Estos resultados indican una tendencia que muestra una disminución en la metilación global del ADN del grupo PBC con respecto al grupo CTR.

5.3 Expresión de genes asociados a la maquinaria de metilación

Para analizar si la disminución en la metilación global de ADN estaba asociada a cambios en la expresión de la maquinaria de metilación, se estudió la expresión génica de las enzimas asociadas al proceso de metilación DNMT1, DNMT3A y las enzimas involucradas en la demetilación del ADN TET1, TET2 y TET3. Esto fue realizado a partir del ARNm extraído de las muestras de sangre en los diferentes grupos.

Al analizar la expresión de DNMT1 (Figura 14A) los datos resultaron normales y a su vez,

las varianzas resultaron homogéneas. El análisis del ANOVA de un factor para ver diferencias entre los grupos indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos (pvalor=<0,0001, mediaPBC=0,029, n =11; mediaCC =0,038 n=15; mediaCTR= 0,053, n=12). Con el test a posteriori de tukey se observó que hay una disminución de la expresión de DNMT1 en el grupo PBC y CC con respecto al control (CTRvsPBC p-valor<0,0001; CTRvsCC p-valor=0,0006). A su vez, se observa una tendencia de PBC a tener una menor expresión de DNMT1 con respecto a el grupo CC con un p-valor=0,052.

Por otra parte, para DNMT3A (Figura 14B) el grupo PBC no presentó una distribución normal mientras que los grupos CTR y CC si. Las varianzas tampoco resultaron homogéneas. Por lo tanto, se realizó un test no paramétrico de Kruskal Wallis en donde se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los grupos (pvalor=0,018; medianaPBC=0,046, n=14; medianaCC=0,065 n=15; medianaCTR=0,096, n=12). Con el test a posteriori de Dunn se observó que hay una disminución de la expresión de DNMT3A en el grupo PBC con respecto al control con un p-valor=0,014.

Para TET1 (Figura 14C) los grupos CC y PBC no presentaron una distribución normal mientras que el grupo CTR si. Por su parte, las varianzas resultaron homogéneas. Se realizó un test no paramétrico de Kruskal Wallis en donde no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre las medianas de los grupos (p-valor=0,61; medianaPBC =0,0058, n=14; medianaCC =0,0065 n=15; medianaCTR= 0,0082, n=12).

En el caso de TET2 (Figura 14D) los datos indican una distribución normal y las varianzas resultaron homogéneas. El análisis del ANOVA de un factor para ver diferencias entre los grupos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos (p-valor=0,61; mediaPBC =1,33, n=14; mediaCC=1,14 n=13; mediaCTR= 1,30, n=12).

Por último, TET3 (Figura 14E) los datos mostraron una distribución normal y las varianzas resultaron homogéneas. El análisis del ANOVA de un factor para ver diferencias entre los grupos indica que no hay diferencias estadísticamente significativas entre las medias de los grupos (p-valor=0,21; mediaPBC=1,45, n=13; mediaCC=1,31 n=15; mediaCTR=1,52, n=12).

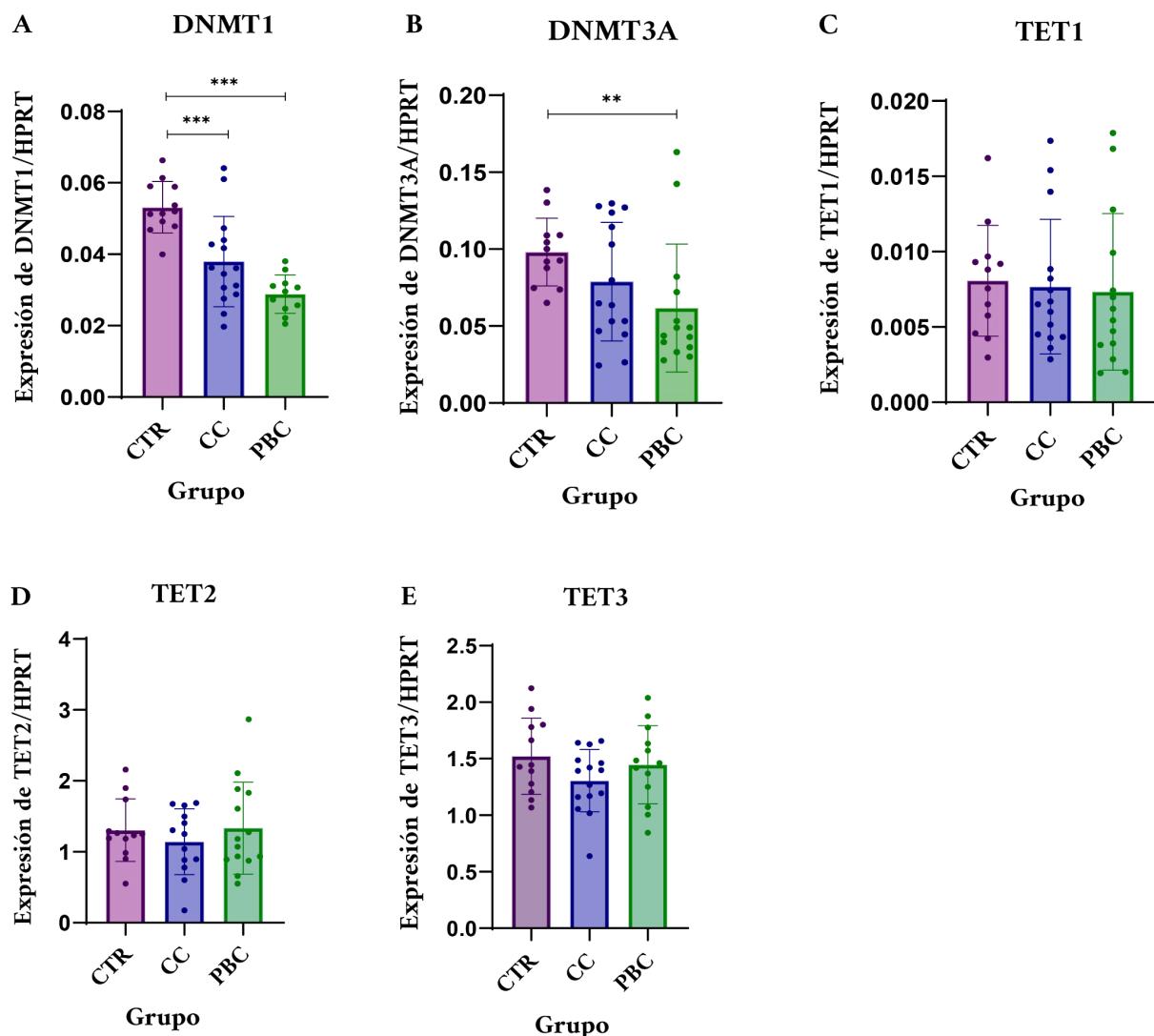


Figura 14 : Medición de la expresión de genes relacionados a la maquinaria de metilación, se realizó por RT-qPCR en muestras de sangre. Para los genes medidos la expresión se normalizó al gen de referencia HPRT. A: DNMT1; mediante un ANOVA de un factor ($p<0,001$) y el post test de Tukey se observó una disminución significativa de la expresión tanto en el grupo CC como PBC con respecto al CTR CTRvsPBC $p<0,0001$; CTRvsCC $p=0,0006$. B: DNMT3A; mediante la prueba de Krustall Wallis ($p=0,018$) y el post test de Dunn se observó una disminución significativa en el grupo PBC con respecto al CTR (CTRvsPBC $p=0,014$) C: TET1 ;no se observaron diferencias significativas (ns) $p=0,61$. D: TET2 $p=0,61$; ns. E, TET3; $p=0,21$

Estos resultados indican diferencias significativas en la expresión de los genes asociados a la maquinaria de metilación. Específicamente se observaron diferencias en la expresión de DNMT1 y DNMT3A encargadas del proceso de metilación. Esta disminución en la expresión de las metilasas DNMT1 y DNMT3A podría explicar la menor metilación del ADN a nivel global (menor concentración de 5mC) en el grupo PBC.

5.4 Asociación entre las pruebas de atención y los cambios en la expresión génica de factores inflamatorios

Con el fin de establecer si hay una asociación entre los resultados encontrados a nivel molecular y los estudios conductuales se realizaron correlaciones entre la expresión génica de los marcadores inflamatorios con los dominios comportamentales de atención previamente publicados.

Al analizar los datos de atención en nuestra población (una subpoblación a la cual le hicimos las mediciones moleculares) (Figura 15A) los datos resultaron normales y las varianzas resultaron homogéneas. El análisis del ANOVA de un factor para ver diferencias entre los grupos indica que hay una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de los grupos ($p\text{valor}=0,0006$, mediaPBC=-0,63, $n=15$; mediaCC=0,33 $n=17$; mediaCTR=0,33, $n=17$). Con el test a posteriori de tukey se observó que el grupo PBC presentó un peor desempeño en las pruebas de atención con respecto al grupo CC y al control (CTRvsPBC $p\text{-valor}=0,0018$; CCvsPBC $p\text{-valor} =0,0018$), corroborando los resultados previamente publicados.

Luego, realizamos correlaciones entre los datos obtenidos en el dominio de atención con los genes asociados a la inflamación. A partir de estos resultados se observó que solamente NFKB correlaciona de manera positiva y estadísticamente significativa con el dominio de atención (Figura 15B) (Correlación de Spearman $R^2=0,368$, $p\text{-valor}= 0,017$), indicando que aquellos sujetos que presentaban un peor desempeño en este dominio se corresponden con una disminución en la expresión de NFKB.

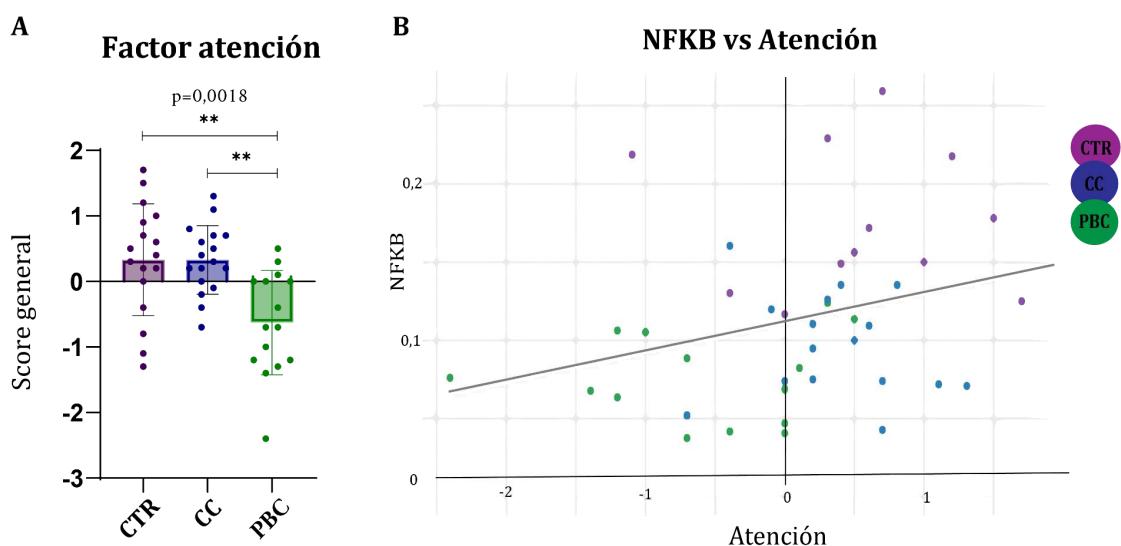


Figura 15: Asociación entre las pruebas de atención y los genes asociados a la respuesta inflamatoria, A: Índice o score obtenido de la cuantificación de las pruebas de atención (prueba rango de dígitos hacia adelante, de bloques de Corsi, de símbolo-dígito y de trazados parte A) en cada uno de los grupos. Se observó a través de un ANOVA de un factor ($p= 0,0006$) y el post test de Tukey diferencias significativas entre el grupo PBC y los grupos CC y CTR. B: Gráfico que

muestra una correlación significativa entre el factor atención y la expresión de NFKB (correlación de Spearman p valor=0,017). Con los otros factores inflamatorios no se observaron correlaciones significativas.

Estos resultados muestran entonces una correlación significativa entre la expresión de NFKB y el score de atención. Es decir que un peor desempeño en las pruebas de atención por parte del grupo PBC se condice con una menor expresión de NFKB. Por el contrario, un mejor rendimiento en estas pruebas, se asociaría a una mayor expresión de este factor inflamatorio.

5.5 Asociación entre las pruebas de atención y los cambios en la expresión génica de la maquinaria de metilación y metilación global

Para establecer si hay una asociación entre los resultados encontrados en relación a la metilación y los estudios comportamentales se realizaron correlaciones entre la expresión génica de la maquinaria de metilación y los niveles de metilación global del ADN con los dominios comportamentales de atención. A partir de estos resultados se observó que solamente DNMT1 correlaciona de manera positiva y estadísticamente significativa con el dominio de atención (figura 16) (Correlación de Pearson $R^2=0,45$, p -valor=0,003). Indicando que aquellos sujetos que presentaban un peor desempeño en este dominio se corresponden con una disminución en la expresión de DNMT1.

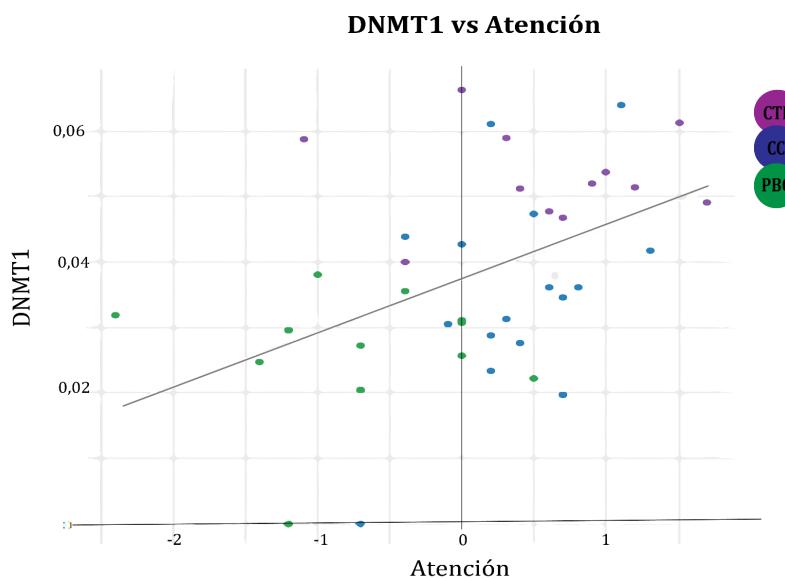


Figura 16: Gráfico que muestra una correlación significativa entre el factor atención y la expresión de DNMT1 (correlación de Pearson p -valor=0,003). Con los otros factores no se observaron correlaciones significativas

Estos resultados muestran entonces una correlación significativa entre la expresión de DNMT1 y el score de atención. Es decir que un peor desempeño en las pruebas de

atención por parte del grupo PBC se condice con una menor expresión de DNMT1. Por el contrario, un mejor rendimiento en estas pruebas, se asociaría a una mayor expresión de DNMT1.

6. Discusión

6.1 La expresión de los genes proinflamatorios NFKb y TNF α se encuentra disminuida en el grupo PBC y CC

Si bien se ha reportado que los psicoestimulantes, como la anfetamina, la cocaína, la metanfetamina y otras sustancias similares, inducen cambios agudos y crónicos en la inflamación mediante mediadores proinflamatorios y antiinflamatorios, y esto sucede tanto en la periferia como en el SNC (Macur & Ciborowski, 2021), se ha planteado que las respuestas proinflamatorias son comunes en diversas drogas de abuso (Li et al., 2024). A su vez, se ha reportado que durante el consumo de cocaína en humanos hay un aumento de factores proinflamatorios (Morcuende et al., 2021) y una disminución de factores anti inflamatorios en suero (Moreira et al., 2016). Esta misma tendencia se observa en consumidores crónicos de crack (otra forma de cocaína fumable), con un aumento de IL-1 β y TNF- α en suero (Narvaez et al., 2013). Sin embargo el nivel de estos marcadores depende mucho del momento en el que se extrae la muestra y la etapa del ciclo de la adicción en que se encuentra la persona. Estos datos en conjunto no coinciden con lo observado en este trabajo, nuestros resultados indican que hay una disminución significativa de los genes proinflamatorios NFKb y TNF α en el grupo PBC y CC comparado al control. Creemos que estas diferencias pueden estar dadas porque las y los adolescentes que participaron de este estudio se encontraban en periodo de abstinencia según uno de los criterios de inclusión (presentar al menos un mes desde último consumo).

En este sentido, en un trabajo donde se estudió el perfil de citoquinas proinflamatorias en plasma en consumidores de cocaína que se encontraban en abstinencia (emparejados por edad, sexo y masa corporal), se observó una disminución en el nivel plasmático del factor de necrosis tumoral (TNF- α) en comparación con sujetos de control sanos. En cuanto a la IL-1 β , también se observaron niveles plasmáticos más bajos en los individuos consumidores de cocaína con al menos dos semanas de abstinencia en comparación con los controles sanos (Araos et al., 2014). Por otra parte, en periodos de abstinencia de consumidores de alcohol, se ha observado una disminución de citoquinas inflamatorias y un aumento de citoquinas antiinflamatorias en suero (González-Quintela et al., 2000). Estos datos coinciden con lo observado en nuestro trabajo. Aunque no podemos asociar directamente la disminución observada en los factores inflamatorios con el periodo de no consumo, este hallazgo representa un primer indicio de cómo se ve afectada la respuesta inflamatoria.

A su vez es importante remarcar que este es el primer reporte que muestra resultados asociados al consumo de PBC con la inflamación en adolescentes de nuestro país. Sin embargo, sería importante seguir profundizando para dilucidar si esta disminución es una adaptación asociada al periodo de abstinencia o es el resultado del consumo crónico de PBC y CC o ambas.

6.2 El nivel de metilación global (5mC) y la expresión de las metilasas Dnmt1 y Dnmt3A disminuye para el grupo PBC.

En el grupo consumidor de PBC, se observó una tendencia que indica una disminución de la metilación global que condice con una disminución significativa de la expresión de DNMT1 y DNMT3A. Para el grupo CC, solo se observó una disminución significativa de la expresión de la metilasa DNMT1.

Los mecanismos epigenéticos asociados a las adicciones son procesos dinámicos y específicos del tipo celular (Vaillancourt et al., 2017). Se ha observado que la exposición crónica a la cocaína y al crack interfiere con la sistema de recompensa cerebral mediante varios mecanismos, entre ellos alteración de la dinámica de metilación del ADN (Vaillancourt et al., 2017). Si bien la expresión de los genes de la maquinaria de metilación ha sido estudiada en distintas regiones del cerebro en modelos de animales de adicción, poco se sabe sobre los cambios epigenéticos que ocurren a nivel periférico cuando se trata de muestras humanas.

La expresión de DNMTs relacionada con la cocaína se ha investigado principalmente en la NAc en ratones, donde la expresión de DNMT depende en gran medida del modo de administración de cocaína y del transcurso del tiempo experimental (Vaillancourt et al., 2017). Por ejemplo, una única inyección intraperitoneal de cocaína en ratones se relacionó con un aumento de la transcripción de DNMT3A después de una abstinencia aguda (1,5 horas) y prolongada (24 h) (Anier et al., 2010). Por el contrario, la autoadministración crónica de cocaína seguida de 24 h de abstinencia da como resultado una disminución de la expresión de DNMT1 y DNMT3a en NAc (LaPlant et al., 2010). Sin embargo, si la abstinencia se extiende a 28 días, este patrón se invierte, con una mayor expresión de DNMT3a. Este estudio demuestra además, que la expresión de DNMT3A está regulada dinámicamente en la NAc en respuesta al comportamiento de búsqueda y abstinencia de cocaína (Vaillancourt et al., 2017). Se cree que la abstinencia a la cocaína estaría induciendo cambios en la metilación del ADN y que estos cambios podrían jugar un rol activo en el proceso de craving de esta droga (LaPlant et al., 2010). Por otro lado, en un estudio realizado con muestras de cerebro postmortem en humanos que fueron consumidores abusivos de alcohol, se observó una hipometilación global del ADN y una disminución en la transcripción de DNMT1 en el núcleo central y basolateral de la amígdala y la corteza prefrontal superior (Ponomarev et al., 2012).

Estos últimos resultados citados se corresponden con los resultados que se obtuvieron en la tesis. Estas similitudes podrían deberse a que se está analizando el consumo abusivo de sustancias en humanos en ambos casos, en donde los individuos no se encontraban en la etapa de consumo activo. Es importante tener en cuenta que en este trabajo se analizaron los cambios en la metilación en muestras de saliva y no en cerebro, sin embargo, se ha demostrado que la utilización de tejidos periféricos, como sangre o saliva, pueden ser usados para predecir lo que pueda ocurrir en el cerebro (Pfaffe et al., 2011).

Este es el primer estudio que muestra cambios epigenéticos asociados al consumo de PBC. La bibliografía y estudios en relación a esta temática es diversa y escasa. Teniendo en cuenta que las marcas epigenéticas pueden ser dinámicas en este contexto y que dependen del organismo, región, sustancia, momento y forma en la que se la estudia, más estudios serán necesarios para poder caracterizar los mecanismos epigenéticos en consumidores de PBC.

6.3 El grupo PBC mostró un peor rendimiento en las pruebas de atención, con respecto al grupo Control y CC.

Los datos obtenidos por las evaluaciones neuropsicológicas se corresponden con los resultados anteriormente publicados sobre esta población (de la Fuente et al., 2021). Como los individuos con los que se trabajó son una subpoblación de la población original, estos resultados eran esperados. Que el score de atención del grupo PBC haya sido significativamente menor que el grupo control y que el grupo CC, resalta la potencia del estudio y lo característico que son los efectos de la pasta base de cocaína. En el trabajo donde se analizó la atención y la memoria se observó una diferencia clara entre los grupos PBC y CC, donde el grupo CC presentaba consecuencias principalmente en la memoria y el grupo PBC en la atención. Estas diferencias puede estar asociadas a la vía de administración y los adulterantes presentes en la pasta base

Otros estudios han demostrado que consumidores crónicos de cocaína presentaban ralentizaciones en la velocidad de procesamiento así como dificultades en las tareas donde se requería atención sostenida y cambios de escenario (Potvin et al., 2014).

En conclusión, estos resultados respaldan la relevancia de tener en cuenta la vía de administración y los adulterantes presentes en la pasta base para la evaluación de los cambios en el comportamiento, particularmente en el dominio de la atención (de la Fuente et al., 2021). Como se mencionó anteriormente en la introducción, existen trabajos que demostraron cómo la cafeína potenciaba el efecto de sensibilización locomotora en ratones consumidores de PBC (Prieto et al., 2015), por lo que los diferentes adulterantes presentes en esta sustancia podrían llegar a exacerbar la respuesta conductual.

6.4 Asociación entre el dominio de atención y la expresión de NFKB

Al tratar de relacionar los cambios en la expresión génica de factores asociados a la respuesta inflamatoria con el dominio de atención, se observó que solamente NFKB correlaciona de manera positiva y estadísticamente significativa con este parámetro. Los individuos pertenecientes al grupo PBC, presentaron un peor desempeño en este dominio y esto coincide con una disminución en la expresión de NFKB.

Si bien hay mucha información de NFKB con respecto a la regulación en la respuesta inflamatoria, poco se sabe sobre sus implicancias a nivel comportamental asociados a la

atención. Se ha demostrado que NFKB está involucrado en el aprendizaje y la memoria en un modelo de ratón (Kutschmidt et al., 2006). Por ejemplo, en hipocampo de ratón la expresión de NFKB aumenta durante la formación y consolidación de la memoria (Ahn et al., 2008).

Por otro lado, otros estudios en ratón establecen un rol directo de NFKB en NAc regulando la plasticidad estructural frente al consumo crónico de cocaína. Se encontró que la activación de NFKB aumenta el número de dendritas en neuronas del NAc mientras que una inhibición de la actividad de este factor disminuye el número de dendritas basales y bloquea el incremento de las mismas después de un consumo crónico de cocaína (Russo et al., 2009). Trabajos similares asocian a NFKB con la sinaptogénesis inducida como neuroadaptaciones por el consumo abusivo de sustancias (Boersma et al., 2011). Además, NFKB está involucrado en procesos de diferenciación, formación y supervivencia de los axones, así como en la integración de neuronas en una red neuronal (Imielski et al., 2012).

Si bien los trabajos previamente mencionados fueron obtenidos de analizar lo que sucede en el cerebro, es importante destacar que van en la misma dirección a lo observado en este estudio que muestra la regulación de NFKB en tejidos periféricos. Hasta el momento no se encuentran trabajos que relacionen este factor con la atención en humanos. Sin embargo, los estudios previamente citados relacionan a NFKB con la sinaptogénesis, plasticidad estructural, memoria y aprendizaje por lo que una disminución en la expresión de este factor podría llegar a explicar el rendimiento de los consumidores de pasta base en las pruebas de atención y representan un punto de partida para futuras investigaciones en esta área.

6.5 Asociación entre el dominio de atención y la expresión de DNMT1

Al analizar la relación entre los genes asociados a la maquinaria de metilación con el dominio de atención, se observó que solamente DNMT1 correlaciona de manera positiva y estadísticamente significativa con este parámetro. Al igual que lo observado para NFKB, los consumidores de pasta base presentaron un peor desempeño en las pruebas de atención asociado a una menor expresión de DNMT1. Esta metilasa es conocida por su rol en el mantenimiento de la metilación durante la replicación, por lo que una menor expresión podría llegar a alterar el patrón global y local de metilación del ADN.

El trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) es un trastorno del desarrollo neurológico que es causado por factores genéticos y ambientales y su interacción. Se cree que las modificaciones epigenéticas del ADN, incluida la metilación, regulan el comportamiento y podrían actuar como biomarcadores de este tipo de trastornos (Meijer et al., 2020). Se han logrado identificar diferencias en los perfiles de metilación del ADN en sangre periférica entre individuos con ADHD e individuos control. También se encontró una menor metilación global de los participantes con este

trastorno con respecto a los controles sanos (Meijer et al., 2020). Este último resultado se condice con lo observado en este trabajo, donde una menor expresión de metilasas (lo que llevaría a una menor metilación) se asocia con un peor desempeño en las pruebas de atención.

Además del mantenimiento de la metilación en la replicación, estudios recientes (Bachmann et al., 2021) , definen a DNMT1 como una de las principales enzimas que ejecutan metilaciones del ADN en el contexto de la modulación de la actividad neuronal. En este trabajo, tras la desactivación de DNMT1 en neuronas excitadoras derivadas de iPSC (células madre pluripotentes inducidas), se observó reducción de neuronas activas lo que apunta a una correlación entre la actividad de DNMT1 y la transmisión sináptica (Bachmann et al., 2021). Si bien no se han reportado estudios que asocien a esta metilasa con la atención, una menor expresión de esta enzima podría afectar la transmisión sináptica y en consecuencia afectar el dominio de atención.

6.6 Trabajo con muestras humanas

Los resultados que se describen en este trabajo se obtuvieron en el marco de una colaboración iniciada entre el Laboratorio de Psicología Experimental y Neurociencias (INCYT-CONICET) y nuestro laboratorio con el objetivo de conocer y estudiar las bases estructurales y moleculares de los efectos del consumo de Pasta Base de Cocaína (PBC) sobre la cognición y la conducta en adolescentes. En este estudio se abordó la problemática desde una mirada interdisciplinaria para caracterizar de manera global los procesos que se ven afectados en el consumo abusivo de PBC. Es el primer trabajo realizado en nuestra región con muestras humanas. Si bien los datos obtenidos son de interés para futuros tratamientos y prevención de recaídas, somos conscientes que tiene sus limitaciones asociadas al N poblacional y el hecho de no poder controlar otros posibles factores que influyan en los resultados obtenidos. En este sentido, en los modelos de roedores se puede controlar más eficientemente la vía de administración de la droga (intraperitoneal, subcutánea, intravenosa, inhalación etc), el tipo de administración de la misma (contingente y no contingente, aguda y crónica) , la dosis (concentración) y el momento de extracción de la muestra (durante el consumo, en abstinencia) entre otras cosas. Sin embargo, los resultados obtenidos en muestras humanas adquieren relevancia ya que reflejan de manera más directa las respuestas biológicas.

Entonces, más allá de las limitaciones, en nuestro estudio se trabajó con una población lo más homogénea posible con criterios de exclusión muy estrictos. Emparejados en sexo, edad, situación académica y económica, sin trastornos psiquiátricos primarios ,con al menos un mes de abstinencia y un año de consumo de la sustancia que llevó a su internación. A pesar del N pequeño, se pudieron obtener resultados significativos que demuestran la potencia de este estudio.

7. Conclusión

Se observó que el consumo abusivo de PBC tiene efectos a diferentes niveles. A nivel epigenético, observamos una disminución en la metilación global del ADN y una menor expresión de las metilasas DNMT1 y DNMT3A. A nivel de la respuesta inflamatoria, observamos una disminución de los factores proinflamatorios NFKB y TNF α . A nivel comportamental, observamos un peor desempeño en las pruebas de atención. Al correlacionar los resultados observamos que el menor desempeño en las tareas de atención podrían estar asociados a una disminución de NFKB y DNMT1 (Figura 17).

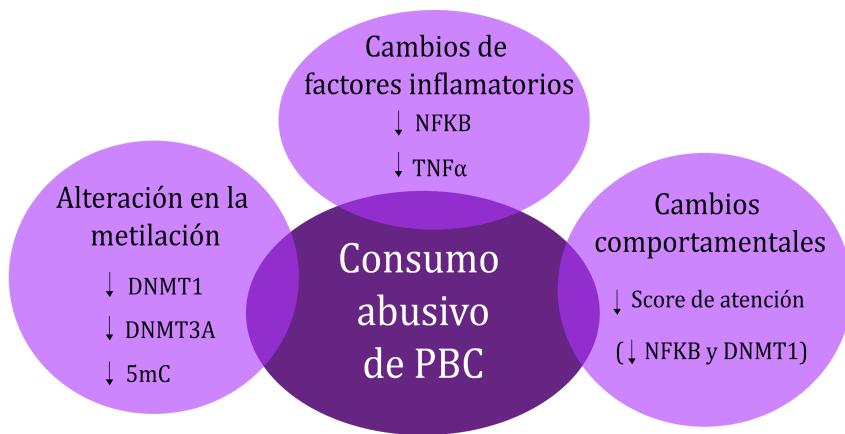


Figura 17: Esquema representativo que muestra un resumen de los resultados obtenidos y muestra cómo el consumo abusivo de PBC genera cambios a nivel epigenético, inflamatorio y comportamental.

Es importante destacar que a diferencia del CC, la PBC es una droga de consumo en América del Sur, razón por la cual hay muy pocos estudios que se lleven a cabo en centros de otras regiones, esto implica que las tareas de investigación, prevención y tratamiento debe ser llevada a cabo por la comunidad académica de nuestra región.

8. Referencias

- Abin-Carriquiry, J. A., Martínez-Busi, M., Galvalisi, M., Minteguiaga, M., Prieto, J. P., & Scorza, M. C. (2018). Identification and quantification of cocaine and active adulterants in coca-paste seized samples: Useful scientific support to health care. *Neurotoxicity Research*. <https://doi.org/10.1007/s12640-018-9887-1>
- Agarwal, K., Manza, P., Chapman, M., Nawal, N., Biesecker, E., McPherson, K., Dennis, E., Johnson, A., Volkow, N. D., & Joseph, P. V. (2022). Inflammatory markers in substance use and mood disorders: A neuroimaging perspective. *Frontiers in Psychiatry*. <https://doi.org/10.3389/fpsyg.2022.863734>
- Ahn, H. J., Hernandez, C. M., Levenson, J. M., Lubin, F. D., Liou, H.-C., & Sweatt, J. D. (2008). C-Rel, an NF-κB family transcription factor, is required for hippocampal long-term synaptic plasticity and memory formation. *Learning & Memory*. <https://doi.org/10.1101/lm.866408>
- Ang, E., Chen, J., Zagouras, P., & Others. (2001). Induction of nuclear factor-κB in nucleus accumbens by chronic cocaine administration. *Journal of Neurochemistry*.
- Anier, K., Malinovskaja, K., Aonurm-Helm, A., Zharkovsky, A., & Kalda, A. (2010). DNA methylation regulates cocaine-induced behavioral sensitization in mice. *Neuropsychopharmacology: Official Publication of the American College of Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.128>
- Anier, K., Urb, M., Kipper, K., Herodes, K., Timmus, T., Zharkovsky, A., & Kalda, A. (2018). Cocaine-induced epigenetic DNA modification in mouse addiction-specific and non-specific tissues. *Neuropharmacology*. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2018.06.036>
- Araos, P., Pedraz, M., Serrano, A., Lucena, M., Barrios, V., García-Marchena, N., Campos-Cloute, R., Ruiz, J. J., Romero, P., Suárez, J., et al. (2014). Plasma profile of pro-inflammatory cytokines and chemokines in cocaine users under outpatient treatment: Influence of cocaine symptom severity and psychiatric co-morbidity: Inflammation and cocaine addiction. *Addiction Biology*.
- Bachmann, S., Linde, J., Bell, M., Spehr, M., Zempel, H., & Zimmer-Bensch, G. (2021). DNA methyltransferase 1 (DNMT1) shapes neuronal activity of human iPSC-derived glutamatergic cortical neurons. *International Journal of Molecular Sciences*. <https://doi.org/10.3390/ijms22042034>
- Baez, S., Fittipaldi, S., de la Fuente, L., Carballo, M., Ferrando, R., García-Cordero, I., Gonzalez Campo, C., Garcia, A. M., Sedeño, L., & Ibañez, A. (2021). Empathy deficits and their behavioral, neuroanatomical, and functional connectivity correlates in smoked cocaine users. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.pnpbp.2021.110328>
- Bauer, M. E., & Teixeira, A. L. (2019). Inflammation in psychiatric disorders: What comes first? *Annals of the New York Academy of Sciences*. <https://doi.org/10.1111/nyas.13712>
- Bell, R. P., Garavan, H., & Foxe, J. (2014). Neural correlates of craving and

- impulsivity in abstinent former cocaine users: Towards biomarkers of relapse risk. *Neuropharmacology*.<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2014.05.011>
- Bernardino, B. G., Fesser, E. A., Belluscio, L. M., Gianatiempo, O., Pregi, N., & Cánepa, E. T. (2019). Effects of cocaine base paste on anxiety-like behavior and immediate-early gene expression in nucleus accumbens and medial prefrontal cortex of female mice. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-019-05321-0>
 - Bereczkei, T., & Csanaky, A. (1996). Evolutionary pathway of child development: Lifestyles of adolescents and adults from father-absent families. *Human Nature*. <https://doi.org/10.1007/BF02733397>
 - Boersma, M. C. H., Dresselhaus, E. C., De Biase, L. M., Mihalas, A. B., Bergles, D. E., & Meffert, M. K. (2011). A requirement for nuclear factor-kappaB in developmental and plasticity-associated synaptogenesis. *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.2456-10.2011>
 - Bonfiglio, J. I., Rival, J. M., & Espínola, S. R. (2016). Barómetro del narcotráfico y las adicciones en la Argentina: serie del bicentenario 2010–2016: informe n.º 3, año 2016: venta de drogas y consumos problemáticos: una aproximación diagnóstica a las adicciones en jóvenes de barrios vulnerables.
 - Brasesco, M. V., Canay, R., & Legisa, A. (2010). Consumo de Paco y otras sustancias psicoactivas en niños y niñas en situación de calle. <http://psico.usal.edu.ar/archivos/psico/otros/paco.pdf>
 - Tervo-Clemmens, B., Simmonds, D., Calabro, F. J., Day, N. L., Richardson, G. A., & Luna, B. (2018). Adolescent cannabis use and brain systems supporting adult working memory encoding, maintenance, and retrieval. *NeuroImage*, 169, 496–509. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2017.12.041>
 - Camarotti, A. C., Jones, D., & Leo, P. F. D. (Directores). (2017). Historia de los tratamientos para los consumos de drogas. <https://www.teseopress.com/drogasyconversion/chapter/ana-clara-camarotti-y-martin-gelman/>
 - Camí, J., & Farré, M. (2003). Drug addiction. *The New England Journal of Medicine*, 349(10), 975–986. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023160>
 - Castaño, G. A. (2000a). Cocaínas fumables en Latinoamérica. *Adicciones*
 - Castaño, G. A. (2000b). Cocaínas fumables en Latinoamérica. *Adicciones*. <https://doi.org/10.20882/adicciones.664>
 - Correia, C., Romieu, P., Olmstead, M. C., & Befort, K. (2020). Can cocaine-induced neuroinflammation explain maladaptive cocaine-associated memories? *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*, 111, 69–83. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.01.001>
 - Corsi, P. M. (1972). Human memory and the medial temporal region of the brain. *McGill University*.
 - Crews, F. T., Zou, J., & Qin, L. (2011). Induction of innate immune genes in brain create the neurobiology of addiction. *Brain, Behavior, and Immunity*.

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2011.03.003>

- Davis, R. L., & Syapin, P. J. (2004). Ethanol increases nuclear factor-kappa B activity in human astroglial cells. *Neuroscience Letters*.<https://doi.org/10.1016/j.neulet.2004.08.051>
- De la Fuente, A., Sedeno, L., Vignaga, S. S., Ellmann, C., Sonzogni, S., Belluscio, L., García-Cordero, I., Castagnaro, E., Boano, M., Cetkovich, M., Torralva, T., Cánepa, E. T., Tagliazucchi, E., García, A. M., & Ibañez, A. (2019). Multimodal neurocognitive markers of interoceptive tuning in smoked cocaine. *Neuropsychopharmacology*.<https://doi.org/10.1038/s41386-019-0370-3>
- De la Fuente, A., Vignaga, S. S., Prado, P., Figueiras, R., Lizaso, L., Manes, F., Cetkovich, M., Tagliazucchi, E., & Torralva, T. (2021). Early onset consumption of coca paste associated with executive-attention vulnerability markers linked to caudate-frontal structural and functional abnormalities. *Drug and Alcohol Dependence*.<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2021.108926>
- ElSohly, M. A., Brenneisen, R., & Jones, A. B. (1991). Coca paste: Chemical analysis and smoking experiments. *Journal of Forensic Sciences*.
- Feltenstein, M. W., See, R. E., & Fuchs, R. A. (2021). Neural substrates and circuits of drug addiction. *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine*.<https://doi.org/10.1101/cshperspect.a039628>
- Ferrando, R., Bocchino, S., Barrachina, A., Ferro, A., Rodríguez, J., Silveira, A., Ventura, R., Gioia, A., López, A., Langhain, M., Cardoso, A., Zurmendi, P., Triaca, J., & Lago, G. (2009). Alteraciones de la perfusión cerebral en consumidores activos de pasta base de cocaína. *Revista Psiquiatría del Uruguay*.
- Garcia, E. J., & Cain, M. E. (2021). Isolation housing elevates amphetamine seeking independent of nucleus accumbens glutamate receptor adaptations. *The European Journal of Neuroscience*.<https://doi.org/10.1111/ejn.15441>
- Gerondakis, S., Fulford, T. S., Messina, N. L., & Grumont, R. J. (2014). NF-κB control of T cell development. *Nature Immunology*.<https://doi.org/10.1038/ni.2785>
- González-Quintela, A., Dominguez-Santalla, M. J., Pérez, L. F., Vidal, C., Lojo, S., & Barrio, E. (2000). Influence of acute alcohol intake and alcohol withdrawal on circulating levels of IL-6, IL-8, IL-10, and IL-12 cytokine.<https://doi.org/10.1006/cyto.2000.0715>
- Goodman, J., & Packard, M. G. (2016). Memory systems and the addicted brain. *Frontiers in Psychiatry*.<https://doi.org/10.3389/fpsyg.2016.00024>
- Gossop, M., Griffiths, P., Powis, B., & Strang, J. (1994). Cocaine: Patterns of use, route of administration, and severity of dependence. *The British Journal of Psychiatry*.<https://doi.org/10.1192/bjp.164.5.660>
- Hatsukami, D. K., & Fischman, M. W. (1996). Crack cocaine and cocaine hydrochloride: Are the differences myth or reality? *JAMA: Journal of the American Medical Association*.<https://doi.org/10.1001/jama.276.19.1580>
- Hyman, S. E., Malenka, R. C., & Nestler, E. J. (2006). Neural mechanisms of addiction: The role of reward-related learning and memory. *Annual Review of Neuroscience*.<https://doi.org/10.1146/annurev.neuro.29.051605.113009>

- Imielski, Y., Schwamborn, J. C., Lüningschrör, P., Heimann, P., Holzberg, M., Werner, H., Leske, O., Püschel, A. W., Memet, S., Heumann, R., Israel, A., Kaltschmidt, C., & Kaltschmidt, B. (2012). Regrowing the adult brain: NF-κB controls functional circuit formation and tissue homeostasis in the dentate gyrus. *PloS One*. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0030838>
- Kaltschmidt, B., Ndiaye, D., Korte, M., Pothion, S., Arbibe, L., Prüllage, M., Pfeiffer, J., Lindecke, A., Staiger, V., Israël, A., Kaltschmidt, C., & Mémet, S. (2006). NF-κB regulates spatial memory formation and synaptic plasticity through protein kinase A/CREB signaling. *Molecular and Cellular Biology*. <https://doi.org/10.1128/MCB.26.8.2936-2946.2006>
- Kiluk, B. D., Babuscio, T. A., Nich, C., & Carroll, K. M. (2013). Smokers versus snorters: Do treatment outcomes differ according to route of cocaine administration? *Experimental and Clinical Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1037/a0034173>
- Koijam, A. S., Singh, K. D., Nameirakpam, B. S., Haobam, R., & Rajashekhar, Y. (2024a). Drug addiction and treatment: An epigenetic perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115951>
- Koijam, A. S., Singh, K. D., Nameirakpam, B. S., Haobam, R., & Rajashekhar, Y. (2024b). Drug addiction and treatment: An epigenetic perspective. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.115951>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of addiction. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Lacagnina, M. J., Rivera, P. D., & Bilbo, S. D. (2017). Glial and neuroimmune mechanisms as critical modulators of drug use and abuse. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2016.121>
- Ladd-Acosta, C., Pevsner, J., Sabunciyan, S., Yolken, R. H., Webster, M. J., Dinkins, T., Callinan, P. A., Fan, J.-B., Potash, J. B., & Feinberg, A. P. (2007). DNA methylation signatures within the human brain. *American Journal of Human Genetics*. <https://doi.org/10.1086/524110>
- LaPlant, Q., Vialou, V., Covington, H. E., Dumitriu, D., Feng, J., Warren, B. L., Maze, I., Dietz, D. M., Watts, E. L., Iñiguez, S. D., Koo, J. W., Mouzon, E., Renthal, W., Hollis, F., Wang, H., Noonan, M. A., Ren, Y., Eisch, A. J., Bolaños, C. A., ... Nestler, E. J. (2010). Dnmt3a regulates emotional behavior and spine plasticity in the nucleus accumbens. *Nature Neuroscience*. <https://doi.org/10.1038/nn.2619>
- Li, H., Watkins, L. R., & Wang, X. (2024). Microglia in neuroimmunopharmacology and drug addiction. *Molecular Psychiatry*. <https://doi.org/10.1038/s41380-024-02443-6>
- Macur, K., & Ciborowski, P. (2021). Immune system and methamphetamine: Molecular basis of a relationship. *Current Neuropharmacology*.
- Malenka RC, Nestler EJ, Hyman SE (2009). Sydor A, Brown RY (eds.). *Molecular Neuropharmacology: A Foundation for Clinical Neuroscience* (2nd ed.). New York: McGraw-Hill Medical.
- Martin, E. M., & Fry, R. C. (2018). Environmental influences on the epigenome:

- Exposure-associated DNA methylation in human populations. *Annual Review of Public Health*. <https://doi.org/10.1146/annurev-publhealth-040617-014629>
- Meijer, M., Klein, M., Hannon, E., van der Meer, D., Hartman, C., Oosterlaan, J., Heslenfeld, D., Hoekstra, P. J., Buitelaar, J., Mill, J., & Franke, B. (2020). Genome-wide DNA methylation patterns in persistent attention-deficit/hyperactivity disorder and in association with impulsive and callous traits. *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00016>
 - Mellentin, A. I., Skøt, L., Nielsen, B., Schippers, G. M., Nielsen, A. S., Stenager, E., & Juhl, C. (2017). Cue exposure therapy for the treatment of alcohol use disorders: A meta-analytic review. *Clinical Psychology Review*. <https://doi.org/10.1016/j.cpr.2017.07.006>
 - Morcuende, A., Navarrete, F., Nieto, E., Manzanares, J., & Femenía, T. (2021). Inflammatory biomarkers in addictive disorders. *Biomolecules*. <https://doi.org/10.3390/biom11121824>
 - Moreira, F. P., Medeiros, J. R. C., Lhullier, A. C., Souza, L. D. de M., Jansen, K., Portela, L. V., Lara, D. R., da Silva, R. A., Wiener, C. D., & Oses, J. P. (2016). Cocaine abuse and effects in the serum levels of cytokines IL-6 and IL-10. *Drug and Alcohol Dependence*. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.11.024>
 - Narvaez, J. C. M., Magalhães, P. V., Fries, G. R., Colpo, G. D., Czepielewski, L. S., Vianna, P., Chies, J. A. B., Rosa, A. R., Von Diemen, L., Vieta, E., Pechansky, F., & Kapczinski, F. (2013). Peripheral toxicity in crack cocaine use disorders. *Neuroscience Letters*. <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2013.03.045>
 - Nennig, S. E., & Schank, J. R. (2017). The role of NF- κ B in drug addiction: Beyond inflammation. *Alcohol and Alcoholism*. <https://doi.org/10.1093/alcalc/agw098>
 - Opal, S. M., & DePalo, V. A. (2000). Anti-inflammatory cytokines. *Chest*. <https://doi.org/10.1378/chest.117.4.1162>
 - Owesson-White, C. A., Ariansen, J., Stuber, G. D., Cleaveland, N. A., Cheer, J. F., Wightman, R. M., & Carelli, R. M. (2009). Neural encoding of cocaine-seeking behavior is coincident with phasic dopamine release in the accumbens core and shell. *The European Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1111/j.1460-9568.2009.06916>.
 - Pascale, A. y otros. (2014). Consumo de pasta base de cocaína en América del Sur. Washington, DC: CICAD-OEA.
 - Pellegrini, D., Young, P., Grosso, V., Massa, V., & Bruetman, J. (2013). Agranulocitosis por levamisol asociado a cocaína.
 - Pera, J., Korostynski, M., Krzyszkowski, T., Czopek, J., Slowik, A., Dziedzic, T., Piechota, M., Stachura, K., Moskala, M., Przewlocki, R., & Szczudlik, A. (2010). Gene expression profiles in human ruptured and unruptured intracranial aneurysms: What is the role of inflammation? *Stroke*. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.109.562009>
 - Pfaffe, T., Cooper-White, J., Beyerlein, P., Kostner, K., & Punyadeera, C. (2011). Diagnostic potential of saliva: Current state and future applications. *Clinical Chemistry*, 57(5), 675–687. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2010.153767>

- Pierce, R. C., Fant, B., Swinford-Jackson, S. E., Heller, E. A., Berrettini, W. H., & Wimmer, M. E. (2018). Environmental, genetic and epigenetic contributions to cocaine addiction. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0008-x>
- Ponomarev, I., Wang, S., Zhang, L., Harris, R. A., & Mayfield, R. D. (2012). Gene coexpression networks in human brain identify epigenetic modifications in alcohol dependence. *The Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.3136-11.2012>
- Potvin, S., Stavro, K., Rizkallah, E., & Pelletier, J. (2014). Cocaine and cognition: A systematic quantitative review. *Journal of Addiction Medicine*. <https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000066>
- Prieto, J. P., Galvalisi, M., López-Hill, X., Meikle, M. N., Abin-Carriquiry, J. A., & Scorza, C. (2015). Caffeine enhances and accelerates the expression of sensitization induced by coca paste indicating its relevance as a main adulterant. *The American Journal on Addictions*. <https://doi.org/10.1111/ajad.12245>
- Prieto, J. P., González, B., Muñiz, J., Bisagno, V., & Scorza, C. (2020). Molecular changes in the nucleus accumbens and prefrontal cortex associated with the locomotor sensitization induced by coca paste seized samples. *Psychopharmacology*. <https://doi.org/10.1007/s00213-020-05474-3>
- Raverta, C., Chasin, A. A. M., Duffau, B., Barboza, F., & Scorza, C. (2016). Análisis de caracterización química de cocaínas fumables.
- Reitan, R. M., & Wolfson, D. (1993). The Halstead Reitan Neuropsychology Battery: Theory and Clinical Interpretation. *Neuropsychology Press*.
- Russo, S. J., Wilkinson, M. B., Mazei-Robison, M. S., Dietz, D. M., Maze, I., Krishnan, V., Renthal, W., Graham, A., Birnbaum, S. G., Green, T. A., Robison, B., Lesselyong, A., Perrotti, L. I., Bolaños, C. A., Kumar, A., Clark, M. S., Neumaier, J. F., Nestler, E. J. (2009). Nuclear factor kappa B signaling regulates neuronal morphology and cocaine reward. *The Journal of Neuroscience*. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.6173-08.2009>
- Samaha, A. N., & Robinson, T. E. (2005). Why does the rapid delivery of drugs to the brain promote addiction? *Trends in Pharmacological Sciences*. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2004.12.007>
- SEDRONAR. (2005). Informe sobre el consumo de drogas en Argentina. Secretaría de Políticas Integrales sobre Drogas de la Nación Argentina.
- Sinha, R., & Jastreboff, A. M. (2013). Stress as a common risk factor for obesity and addiction. *Biological Psychiatry*. <https://doi.org/10.1016/j.biopsych.2013.01.032>
- Smith, A. (1973). Symbol Digit Modalities Test: Manual. Western Psychological Corporation, Los Angeles, Calif.
- Tavares, N. T., Gumauskaitė, S., Lobo, J., Jerónimo, C., & Henrique, R. (2022). DNA methylation biomarkers for prediction of response to platinum-based chemotherapy: Where do we stand? *Cancers*. <https://doi.org/10.3390/cancers14122918>
- Ungar-Sargon, J. (2024). The neurobiology of addiction. *Science Vision*

Publication. <https://www.scivisionpub.com/articles/the-neurobiology-of-addiction-3278.html>

- UNODC. (2020). Informe mundial sobre las drogas 2020. Naciones Unidas.
- UNODC. (2022). Informe mundial sobre las drogas 2022. Naciones Unidas.
- UNODC. (2023). Informe mundial sobre las drogas 2023. Naciones Unidas.
- Vaillancourt, K., Ernst, C., Mash, D., & Turecki, G. (2017). DNA methylation dynamics and cocaine in the brain: Progress and prospects. *Genes*. <https://doi.org/10.3390/genes8050138>
- Vallejo-Reyes, F. (2019). Evaluación de la función ejecutiva en usuarios con dependencia de pasta base de cocaína mediante una batería neuropsicológica. *Psykhe*, 28(1). <https://doi.org/10.7764/psykhe.28.1.111>
- Volkow, N. D., & Fowler, J. S. (2000). Addiction, a disease of compulsion and drive: Involvement of the orbitofrontal cortex. *Cerebral Cortex*. <https://doi.org/10.1093/cercor/10.3.318>
- Volkow, N. D., Wang, G. J., Fischman, M. W., Foltin, R., Fowler, J. S., Franceschi, D., Logan, J., Gatley, S. J., Wong, C., Ding, Y. S., Hitzemann, R., & Pappas, N. (2000). Effects of route of administration on cocaine-induced dopamine transporter blockade in the human brain. *Life Sciences*. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(00\)00731-1](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(00)00731-1)
- Weschler, D. (1999). *Wechsler Abbreviated Scale of Intelligence*. Psychological Corporation, San Antonio, TX.
- Wise, R. A. (1980). Action of drugs of abuse on brain reward systems. *Pharmacology, Biochemistry, and Behavior*. [https://doi.org/10.1016/s0091-3057\(80\)80033-5](https://doi.org/10.1016/s0091-3057(80)80033-5)
- Wise, R. A., Wang, B., & You, Z.-B. (2008). Cocaine serves as a peripheral interoceptive conditioned stimulus for central glutamate and dopamine release. *PLoS One*.
- Wise, R. A., & Koob, G. F. (2013). The development and maintenance of drug addiction. *Neuropsychopharmacology*. <https://doi.org/10.1038/npp.2013.261>
- Xu, P., Chen, A., Li, Y., Xing, X., & Lu, H. (2019). Medial prefrontal cortex in neurological diseases. *Physiological Genomics*. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.00006.2019>
- Zou, J., & Crews, F. (2010). Induction of innate immune gene expression cascades in brain slice cultures by ethanol: Key role of NF-κB and proinflammatory cytokines. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*.