



Centro de Investigación y de Estudios  
Avanzados del Instituto Politécnico  
Nacional, Sede Sur  
Departamento de Farmacobiología

**Efectos farmacológicos de adulteraciones  
comunes de drogas: metanfetamina con cafeína  
y fentanilo con xilacina**

TESIS

que presenta

**PALMIRA ACOSTA MARES**

Para obtener el grado de

**MAESTRA EN CIENCIAS**  
en Neurofarmacología y Terapéutica Experimental

Directora de la Tesis:  
Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo

Ciudad de México

Enero, 2024

Este trabajo se realizó en el laboratorio 10 del departamento de Farmacobiología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional bajo la dirección de la Dra. Silvia Lorenia Cruz Martín del Campo. Con el apoyo del Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías a través de la beca No. 802402 y del Programa de Asesoramiento sobre Drogas del Plan Colombo.

## **AGRADECIMIENTOS**

A mis papás por siempre ser mi fuente de inspiración y apoyo. Por ser mi ejemplo de resiliencia y fortaleza. Por siempre motivarme a continuar y recordarme que, con su apoyo, todo se vuelve más sencillo.

A mis hermanos y a toda mi familia por siempre estar.

A mi directora la Dra. Silvia Cruz, por la confianza depositada en mí, por brindarme el espacio y las herramientas para desarrollar este proyecto, por todo el trabajo y tiempo dedicado a mi formación, por todas las enseñanzas y la paciencia.

A mi comité sinodal la Dra. Carolina López Rubalcava y la Dra. Nayeli Páez por los valiosos consejos, por su orientación y sugerencias que enriquecieron este proyecto y me ayudaron a tener nuevas perspectivas.

A la M. en C. Araceli Hernández por apoyarme siempre que lo necesité, por los consejos y por facilitar las condiciones apropiadas para trabajar.

A la Dra. Zyanya Espinosa por ser mi guía y enseñarme todos los métodos, técnicas para poder desarrollar mi proyecto, por los valiosos consejos y por siempre orientarme cuando me sentí perdida.

A la Dra. Valeria Violante por siempre tener la disposición de apoyarme, por encaminar mis ideas, por compartirme sus conocimientos y por sus invaluable aportaciones a mi formación.

A mis demás compañeros, ahora amigos del laboratorio 10: Dam, Viri, Fridita, Mons, Gaby e Iván, por siempre escucharme, por compartir los espacios, los consejos y las risas. Porque el contar con ustedes hace todo menos difícil.

A Diana, Juli y Evita, porque compartir el camino con ustedes aligeraba la carga, por estar siempre dispuestas a ayudarme, por brindarme su escucha, sus consejos y su amistad.

A Marce y Marco por ser mis mentores y darme siempre sus mejores consejos.

A mis demás compañeros de la maestría JP, Pao, Erick e Imix por la compañía y el apoyo mutuo.

A Shareny por siempre saber qué hacer y apoyarme con todos los trámites.

A Pao, Hec, Benito, Luis, Vale, Mariana, Denisse, Capu, Alux, Ema, Esme, Ara y Rodrigo por la amistad.

Al CONAHCYT, al CINVESTAV y al Plan colombo por los recursos otorgados para el desarrollo de este proyecto.

## DEDICATORIA

*A mis abuelas Mari y Andrea,  
que desde donde se encuentran  
son la luz que guía mi camino.*

## ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| 1. INTRODUCCIÓN.....   | 10 |
| 1.1 Generalidades de los adulterantes .....  | 11 |
| 1.2 Metanfetamina .....  | 11 |
| 1.3 Cafeína.....   | 14 |
| 1.4 Fentanilo .....  | 17 |
| 1.5 Xilacina.....  | 20 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....   | 23 |
| 3. OBJETIVO GENERAL.....   | 24 |
| 3.1 Objetivos específicos .....  | 24 |
| 4. HIPÓTESIS .....   | 25 |
| 5. MATERIALES Y MÉTODOS.....   | 26 |
| 5.1 Animales .....   | 26 |
| 5.2 Fármacos.....  | 26 |
| 5.3 Pruebas de letalidad .....   | 26 |
| 5.4 Evaluación de la actividad locomotora.....   | 26 |
| 5.5 Evaluación de la antinocicepción.....  | 27 |
| 5.6 Evaluación de la coordinación motora .....   | 27 |
| 5.7 Evaluación de la abstinencia .....   | 28 |
| 5.8 Análisis estadístico.....  | 28 |
| Diseño experimental.....   | 28 |
| 6. RESULTADOS .....  | 33 |
| 6.1 La cafeína potencia la letalidad de la metanfetamina.....  | 33 |
| 6.2 La letalidad inducida por la combinación de cafeína con metanfetamina no se puede prevenir con adenosina.....              | 33 |
| 6.3 La cafeína incrementa la hiperlocomoción inducida por metanfetamina.....   | 33 |
| 6.4 La metanfetamina induce sensibilización locomotora pero no la cafeína ni la combinación de cafeína con metanfetamina ..... | 35 |
| 6.5 La cafeína y la metanfetamina inducen sensibilización cruzada .....  | 38 |
| 6.6 La xilacina potencia la letalidad del fentanilo y la muerte se previene con una dosis alta de naloxona.....                | 38 |
| 6.7 La xilacina incrementa el efecto antinociceptivo del fentanilo.....  | 39 |
| 6.8 La combinación de xilacina con fentanilo no afecta la coordinación motora ...  | 41 |

|   |    |
|---|----|
| 6.9 La xilacina no modifica la tolerancia ni abstinencia inducidas por fentanilo .... | 41 |
| 7. DISCUSIÓN.....   | 44 |
| 7.1. Sobre los efectos de combinar metanfetamina y cafeína .....                      | 44 |
| 7.2. Sobre los efectos de combinar xilacina con fentanilo.....                        | 46 |
| 8. CONCLUSIÓN.....  | 48 |
| 9. PERSPECTIVAS .....   | 48 |
| 10. REFERENCIAS .....   | 50 |

### Índice de tablas y figuras:

|  |    |
|--|----|
| Figura 1. Estructura química de la metanfetamina (A) y la cafeína (B).....   | 12 |
| Figura 2. Mecanismo de acción de la metanfetamina.....   | 14 |
| Figura 3. Inhibición alostérica de los receptores D2 por la activación de los receptores A2A.....                  | 16 |
| Figura 4. Estructura química de fentanilo (A) y xilacina (B). .....  | 18 |
| Figura 5. Vía de señalización de los receptores a opioides.....  | 19 |
| Figura 6. Mecanismo de acción de la xilacina.....  | 22 |
| Figura 7. Esquema de los experimentos con la combinación de cafeína y metanfetamina.....                           | 30 |
| Figura 8. Esquema de los experimentos con la combinación de xilacina y fentanilo. ....                             | 32 |
| Figura 9. Letalidad inducida por metanfetamina y cafeína. ....   | 34 |
| Figura 10. La cafeína incrementa la hiperlocomoción en ratones inducida por la metanfetamina.....                  | 35 |
| Figura 11. Promedio de actividad locomotora por cada día, por grupos.....  | 37 |
| Figura 12. La xilacina potencia la letalidad del fentanilo.....  | 39 |
| Figura 13. La xilacina incrementa la antinocicepción en ratones inducida por el fentanilo.....                     | 40 |
| Tabla 1. La coordinación motora no se altera con los diferentes tratamientos. ....                                 | 41 |
| Figura 14. La tolerancia inducida por fentanilo no se altera con la presencia de xilacina. ....                    | 42 |
| Figura 15. Conductas evaluadas después de 24 horas de abstinencia por supresión a los diferentes tratamientos..... | 43 |

## ABREVIATURAS

|                  |  |
|------------------|--|
| %MEP             | Porcentaje máximo de efecto posible                            |
| AC               | Adenilato ciclasa  |
| Ad               | Adenosina  |
| Act              | Actividad  |
| AMP <sub>c</sub> | Adenosina monofosfato cíclica                                  |
| AUC              | Área bajo la curva   |
| Caf              | Cafeína  |
| DAT              | Transportador de dopamina                                      |
| DEA              | Administración de control de drogas (por sus siglas en inglés) |
| DL <sub>10</sub> | Dosis letal 10   |
| Fen              | Fentanilo  |
| Fig              | Figura   |
| GABA             | Ácido $\gamma$ -aminobutírico                                  |
| GIRK             | Canal rectificador de potasio                                  |
| h                | Horas  |
| i.p.             | Intraperitoneal  |
| kg               | Kilogramos   |
| MAPK             | Proteína quinasa activada por mitógeno                         |
| MDMA             | 3,4-metilendioximetanfetamina                                  |
| Met              | Metanfetamina  |
| mg               | Miligramos   |
| min              | Minutos  |
| NET              | Transportador de noradrenalina                                 |
| Nlx              | Naloxona   |
| ONU              | Organización de las Naciones Unidas                            |
| PKA              | Proteína quinasa A   |
| SERT             | Transportador de serotonina                                    |
| TLR4             | Receptor tipo Toll 4   |
| v/v              | Volumen/volumen  |
| VMAT             | Transportador vesicular de monoaminas                          |
| Xil              | Xilacina   |

**RESUMEN**

La cafeína (CAF) se usa frecuentemente como adulterante de otros psicoestimulantes, como la metanfetamina (MET). La xilacina (XIL) se emplea en la medicina veterinaria como sedante; sin embargo, recientemente ha sido utilizada para adulterar opioides como el fentanilo (FEN). El objetivo de este trabajo es estudiar los efectos letales y conductuales producidos por la combinación de MET+CAF y de FEN+XIL. Se usaron grupos independientes de ratones Swiss Webster macho de 5 a 6 semanas de edad (n=10) para cada tratamiento. Se evaluó: (a) la letalidad producida al combinar MET+CAF o FEN+XIL a sus dosis letales al 10% (DL<sub>10</sub>) y su posible prevención con adenosina (AD), y naloxona (NLX) y yohimbina (YOH) respectivamente; (b) el efecto de MET+CAF a dosis bajas (0.3+17.7 mg/kg i.p.) sobre la actividad locomotora evaluada en campo abierto; (c) la sensibilización locomotora inducida por administraciones repetidas de CAF y MET (0.5 y 10 mg/kg, i.p.); (d) el efecto antinociceptivo de FEN+XIL (0.3+5.6 mg/kg, i.p.) en la prueba de retiro de la cola (tail flick); (e) el efecto sobre la coordinación motriz de FEN+XIL (0.1+5.6 mg/kg, i.p.) evaluada en la prueba de rota-rod. Estos datos se compararon con los observados con los tratamientos individuales. Adicionalmente se evaluó la tolerancia al efecto antinociceptivo de administraciones repetidas de FEN+XIL, (0.3+5.6 mg/kg, i.p.), así como los signos de abstinencia por supresión a las 24 horas de la última administración. Ambas combinaciones aumentaron significativamente el porcentaje de letalidad. Solo la NLX (30 mg/kg, i.p.) previno la letalidad ocasionada por FEN+XIL, mientras que la AD (10 y 30 mg/kg, i.p.) no previno la letalidad inducida por MET+CAF. La CAF incrementó la hiperlocomoción inducida por la MET y produjo sensibilización cruzada. La XIL incrementó el efecto antinociceptivo de FEN, no modificó la tolerancia ni la abstinencia a FEN. En conclusión, la presencia de adulterantes exagera los efectos adversos de las

drogas de abuso potencialmente nocivos, el estudio de estos efectos y su mecanismo de acción deben continuar con el fin de prevenir y responder de forma más eficiente ante los riesgos a la salud que estos implican.

#### ABSTRACT

Caffeine (CAFF) is a psychostimulant frequently used as drug of abuse adulterant like methamphetamine (METH). Xylazine (XYL) is used in veterinary medicine as a sedative, however, recently it has been used for adulterating opioids like fentanyl (FEN). The aim of this work was to describe lethal and behavioral effects of combining METH+CAFF and FEN+XYL.

Independent group male mice 5 to 6 weeks of age were used for each experiment (n=10). We evaluated (a) the lethality produced of combining METH+CAFF or FEN+XYL at their lethal doses 10 (LD<sub>10</sub>) and its possible prevention with adenosine (AD), naloxone (NLX) and yohimbine (YOH) respectively; (b) the effect of low doses of METH+CAFF (0.3+17.7 mg/kg, i.p.) on locomotor activity evaluated in an open field; (c) the locomotor sensitization induced for repetitive administrations of CAFF and METH (0.5 and 10 mg/kg, i.p.); (d) the antinociceptive effect of FEN+XYL (0.3+5.6 mg/kg, i.p.) in tail flick test; (e) the effects on motor coordination of FEN+XYL (0.1+5.6 mg/kg, i.p.) evaluated in the rotarod. These data were compared with individual treatment. In addition, it was evaluated the tolerance to the antinociceptive effect of FEN+XYL (0.1+5.6 mg/kg, i.p.) as well as the signs of withdrawal for suppression after 24 hours of the last administration.

Both combinations increased the lethality percentage. Only the NLX (30 mg/kg, i.p.) prevented the lethality caused by FEN+XYL, whereas the AD did not prevent the death produced by METH+CAFF. The CAFF increased the hyperlocomotion induced by METH and produced cross sensitization. The XYL increased the antinociceptive effect of FEN and did not alter the tolerance or withdrawal to FEN.

In conclusion, adulterants exacerbate potentially harmful adverse effects of drugs of abuse. The study of these effects and their mechanism of action must continue in order to prevent and respond more efficiently to the health risks that

they imply.

## 1. INTRODUCCIÓN

El trastorno por uso de sustancias se caracteriza por la búsqueda compulsiva de una o más drogas de abuso y por la pérdida de control sobre su consumo (Koob & Volkow, 2016). Es un problema de salud que afecta a millones de personas en el mundo. De acuerdo con reportes internacionales, durante el año 2021 aproximadamente 296 millones de personas consumieron drogas ilícitas y 500,000 personas murieron por causas relacionadas con el consumo de drogas (World Drug Report, 2023).

En el mercado ilegal, las drogas de abuso frecuentemente se encuentran combinadas con otras sustancias (Pascale et al., 2019.). De acuerdo con su propósito y origen, éstas pueden clasificarse de la siguiente manera (Cole et al., 2011, 2010; Pascale et al., 2019.):

- Contaminantes químicos: residuos resultantes del proceso de síntesis.
- Contaminantes biológicos: bacterias y hongos acumulados durante el proceso de manufactura o almacenamiento.
- Sustitutos: sustancias farmacológicamente activas que se presentan en lugar de la droga.
- Diluyentes: sustancias inertes que comparten características morfológicas con la droga.
- Adulterantes: sustancias farmacológicamente activas con propiedades similares a la droga.

Estudiar los efectos de las drogas adulteradas es fundamental para conocer las posibles consecuencias a la salud y buscar maneras de prevenir el riesgo de muerte.

El principal objetivo de combinar las drogas de abuso con sustitutos, diluyentes o adulterantes es incrementar el volumen de la droga, reducir los costos de producción, incrementar las ganancias y aumentar los efectos psicoactivos.

Sin embargo, las combinaciones pueden generar mayores efectos nocivos; por ejemplo, las sustancias pueden resultar tóxicas por sí mismas, potenciar los efectos tóxicos de la droga, y aumentar el riesgo de desarrollar dependencia (di Trana & Montanari, 2022).

### **1.1 Generalidades de los adulterantes**

Las sustancias utilizadas como adulterantes poseen características físicas y químicas que mimetizan el aspecto y los efectos de la droga base, aparentan buena calidad, e incrementan o potencian sus efectos (Cole et al., 2011).

Añadir componentes farmacológicamente activos a las drogas tiene implicaciones importantes en la salud pública. Usualmente los usuarios afrontan efectos adversos inesperados porque desconocen la calidad y cantidad de las sustancias que se combinan con las drogas que consumen habitualmente (Minutillo et al., 2019). Además, el personal de salud también puede enfrentar dificultades cuando los consumidores no responden a los tratamientos convencionales. Varios reportes han asociado a los adulterantes con un mayor riesgo de muerte y con un incremento significativo en los daños en la salud por un consumo crónico de drogas adulteradas (Pascale A., et al., 2019). En este trabajo estamos interesados en el efecto de dos adulterantes comunes: la cafeína y la xilacina. En las secciones siguientes, se presentan las características de las sustancias utilizadas en este estudio.

### **1.2 Metanfetamina**

La metanfetamina es un psicoestimulante tipo anfetamina, usado ampliamente como droga de abuso desde la segunda guerra mundial (Anglin et al., 2000). Existen 2 formas en las que se puede encontrar en el mercado ilegal, cristales y polvo. Los cristales tienen un nivel de pureza alto, pero el polvo suele ser menos puro y estar adulterado (Cruickshank & Dyer, 2009). Desde la década de los 1980s, se han encontrado muestras de metanfetamina o anfetamina mezcladas con sustitutos y diluyentes, principalmente con azúcares y cafeína (Brown & Malone, 1976; Cole et al., 2010; King, 1997; Lambrechts et al., 1986).

Actualmente, en México, la metanfetamina ocupa el segundo lugar de droga de mayor impacto solo después de la marihuana y representando el 10% del total de los casos (Centros de Integración Juvenil, A.C., 2023).

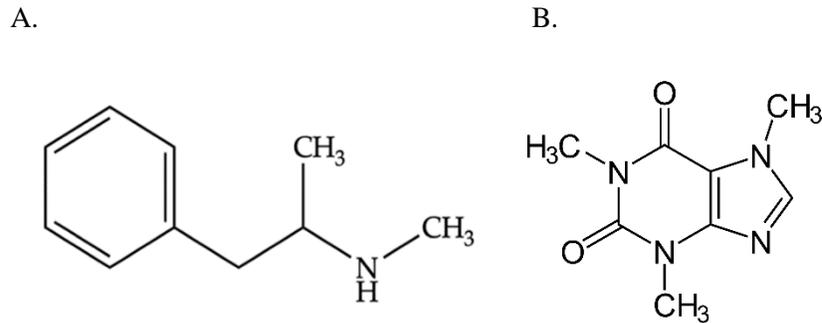


Figura 1. Estructura química de la metanfetamina (A) y la cafeína (B).

#### Farmacocinética

La metanfetamina se absorbe rápidamente por el tracto gastrointestinal, y, dependiendo de la vía de administración, en seres humanos, la concentración máxima en sangre se puede alcanzar en un rango de dos a 150 minutos (Cruickshank & Dyer, 2009). Se metaboliza por la enzima CYP2D6 y se convierte en parahidroximetanfetamina o anfetamina por medio de una hidroxilación o N-desmetilación (Li et al., 2010). Se excreta principalmente por la orina, con una vida media de eliminación de aproximadamente 12 horas (Harris et al., 2003).

#### Efectos y mecanismo de acción

El consumo de metanfetamina produce varios efectos; entre los más comunes se encuentran euforia, sensación de bienestar, incremento de la locomoción, incremento del estado de alerta, reducción el apetito y elevación de la presión arterial y la frecuencia cardiaca. La ansiedad, el insomnio y una pérdida de peso muy significativa son comunes entre los consumidores. El consumo repetido de metanfetamina produce tolerancia y dependencia (Cruickshank &

Dyer, 2009; Mendelson et al., 2006; Perez-Reyes et al., 1991). Entre los efectos adversos asociados al consumo de la metanfetamina, se encuentran el incremento significativo en la temperatura corporal, hipertensión pulmonar, enfermedad periodontal, problemas cardiovasculares y daño renal. Además, incrementa el riesgo de adquirir infecciones como hepatitis y virus de inmunodeficiencia humana (Moratalla et al., 2017; Schep et al., 2010). Su consumo repetido favorece la presentación de la llamada psicosis anfetamínica, caracterizada por alucinaciones visuales y auditivas, delirios de persecución y habla incoherente (McKetin et al., 2006; Zweben et al., 2004). En algunos casos, esa psicosis se puede prolongar convirtiéndose en una psicosis crónica (Wearne & Cornish, 2018).

La metanfetamina es un agonista indirecto de los receptores a noradrenalina, dopamina y serotonina. Ingresa a las terminales nerviosas por medio de los transportadores (DAT, NET, SERT) y revierte su función. Asimismo, ingresa a las vesículas a través del transportador de monoaminas (VMAT) y provoca la salida de los neurotransmisores al citoplasma. De esta forma, provoca la liberación indirecta de los neurotransmisores al espacio sináptico (Reith & Gnegy, 2020; Sulzer et al., 2005) (Fig. 2). La metanfetamina también puede ingresar a la terminal presináptica por difusión pasiva y producir estrés oxidativo. La presencia de la metanfetamina libre en la terminal sináptica y el estrés oxidativo producen neurotoxicidad, es decir, daño en las terminales dopaminérgicas y serotoninérgicas, así como activación de la microglía y astrocitos y apoptosis (Moszczynska & Callan, 2017; Yang et al., 2018).

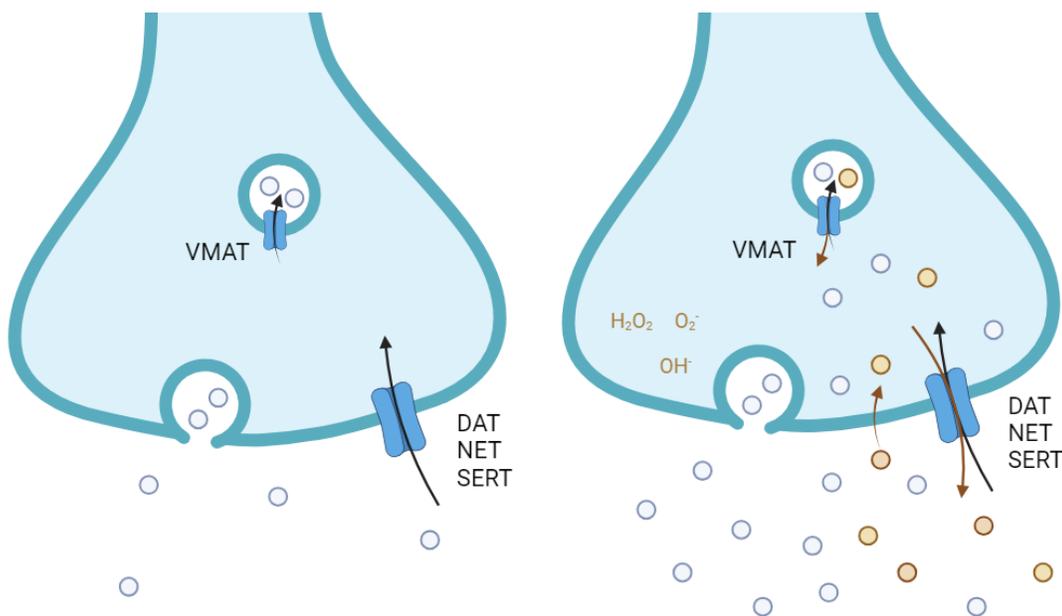


Figura 2. Mecanismo de acción de la metanfetamina. A. Transmisión dopaminérgica en condiciones normales. B. Transmisión dopaminérgica alterada por la presencia de metanfetamina (en amarillo). VMAT: Transportador vesicular de monoaminas. DAT: transportador de dopamina, NET: transportador de noradrenalina y adrenalina, SERT: transportador de serotonina.

### 1.3 Cafeína

La cafeína es el psicoestimulante más consumido a nivel mundial. En Estados Unidos se estima que el 85% de la población consume una bebida con cafeína al día (Mitchell et al., 2014), mientras que en México se estima que el consumo de café per cápita al año es de 1.4 kg (Aceves-Navarro et al., 2018). La cafeína ha sido ampliamente utilizada como adulterante de múltiples drogas de abuso como anfetaminas, cocaína, heroína y metanfetamina (Cole et al., 2011; Onoka et al., 2020; Prieto et al., 2016).

#### Farmacocinética

La cafeína se absorbe rápidamente en el tracto gastrointestinal y sus niveles máximos se alcanzan entre 15 y 45 min después de consumirla (Liguori et al., 1997). Se metaboliza por la enzima CYP1A2. Se convierte principalmente a paraxantina por una N-3-demetilación y tiene una vida media de eliminación

de 4 a 5 h (Thorn et al., 2012). Se elimina principalmente por orina.

#### Efectos y mecanismo de acción

La cafeína induce la liberación de dopamina, mejora la atención y la función cognitiva, disminuye el sueño, puede mejorar el desempeño deportivo y su consumo crónico, y en altas concentraciones, puede ocasionar tolerancia y dependencia (Cappelletti et al., 2014; Sawyer et al., 1982). Además, es ansiógena, puede producir síntomas metabólicos como hiperglicemia y también puede inducir efectos cardiovasculares como arritmias, hipertensión, hipotensión, taquicardia, bradicardia y falla respiratoria (Willson, 2018).

La cafeína actúa como un antagonista competitivo de los receptores a la adenosina ( $A_1$ ,  $A_{2A}$ ,  $A_{2B}$  y  $A_3$ ). Sin embargo, presenta mayor afinidad por los receptores  $A_{2A}$  y  $A_1$  (Fredholm, 2010). Los receptores  $A_{2A}$  están acoplados a proteínas  $G_s$  y  $G_{olf}$  en neuronas (Kull et al., 2000). La activación de estos receptores activa a la adenilato ciclasa (AC), incrementa los niveles de AMPc y se desencadena una cascada de señalización que lleva a la fosforilación de CREB y con ello se promueve la transcripción génica (Ferré, 2008; Preti et al., 2015). La adenosina induce el sueño y es considerada uno de los principales factores involucrados en su regulación (Basheer et al., 2004). La cafeína, al bloquear estos receptores, provoca el efecto contrario; es decir, incrementa el estado de alerta y disminuye el sueño (Scorza et al., 2022).

Adicionalmente, los receptores  $A_{2A}$  forman heterodímeros con receptores de dopamina tipo  $D_2$ . La unión de adenosina bloquea la actividad del receptor  $D_2$ . Cuando la cafeína bloquea a los receptores de adenosina  $A_{2A}$ , desaparece la inhibición de los receptores  $D_2$  y aumenta la señalización dopaminérgica (Fig. 3) (Ferré, 2016; Huang et al., 2005).

A dosis considerablemente más altas, tóxicas o incluso letales, la cafeína también inhibe a las fosfodiesterasas, responsables de la degradación de AMPc. Al aumentar los niveles de AMPc, se estimula la lipólisis y se activa a la proteína cinasa A (Cappelletti et al., 2014; Umemura et al., 2006). Además, la cafeína también induce la liberación del calcio intracelular del retículo sarcoplásmico (Endo, 1977). Otros mecanismos descritos a dosis elevadas de

cafeína incluyen el bloqueo de los canales de potasio y de los receptores de GABA<sub>A</sub> (Cockerill & Mitcheson, 2006; Yu et al., 2009). Sin embargo, las concentraciones de cafeína necesarias para producir estos efectos son cientos de veces más altas que las que se alcanzan con una dieta habitual de productos con cafeína.

### La cafeína como adulterante

Los receptores de adenosina, particularmente los receptores A<sub>2A</sub> cumplen un papel muy importante como moduladores del estado de ánimo, del comportamiento y la cognición (Shen & Chen, 2009), esto, gracias a la modulación que ejercen sobre los receptores de dopamina. Por tanto, el uso de cafeína como adulterante de drogas de abuso, puede afectar esos ámbitos, así como incrementar o potenciar efectos nocivos de las drogas como la locomoción o la sensibilización locomotora.

Estudios previos han demostrado que la cafeína potencia los efectos recompensantes de la cocaína (Muñiz et al., 2017; Prieto et al., 2016) y la toxicidad inducida por MDMA (éxtasis), que es otro psicoestimulante tipo anfetamina (Vanattou-Saïfoudine et al., 2012). Estudios preclínicos demostraron que la combinación de cafeína con metanfetamina disminuye la

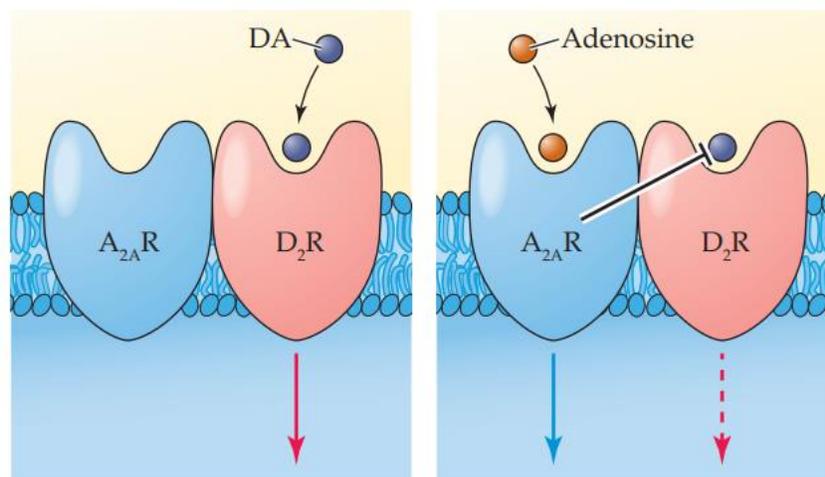


Figura 3. Inhibición alostérica de los receptores D2 por la activación de los receptores A<sub>2A</sub>. Imagen tomada de (J. S. Meyer, 2019).

viabilidad celular y potencia sus efectos tóxicos en ratas (Sinchai et al., 2011). Los estudios sobre la combinación de metanfetamina con cafeína en modelos preclínicos son escasos. Es importante describir los posibles efectos adversos que conlleva la combinación de drogas psicoestimulantes y opioides con adulterantes con la finalidad de desarrollar tratamientos que prevengan los efectos letales.

#### **1.4 Fentanilo**

El fentanilo es un opioide sintético de uso terapéutico, pero con alto potencial adictivo (Armenian et al., 2018). Se sintetizó en 1960 por Paul Janssen (Stanley, 1992) y se utiliza como analgésico y como anestésico en procedimientos quirúrgicos (Comer & Cahill, 2019). En comparación con la morfina, el fentanilo es entre 50 y 100 veces más potente (Mather, 1983).

El fentanilo se usa como adulterante de opioides y estimulantes ((Behrman, 2008; Cole et al., 2011)) y como droga base a la que se añaden adulterantes como la xilacina. Durante los años de 2005-2006 se detectaron en Estados Unidos múltiples casos de muertes por sobredosis ocasionadas por la combinación de fentanilo con heroína (DEA, 2016). Desde entonces el consumo de fentanilo, ya sea solo o en combinación, ha seguido en aumento. Actualmente los opioides sintéticos, principalmente el fentanilo, ocupan el primer lugar de muertes por sobredosis en Estados Unidos y Canadá. Aunque en menor proporción, en algunos países europeos también hay una alta tasa de mortalidad por sobredosis con fentanilo y sus análogos (Pierce et al., 2021). De acuerdo con la ONU, se considera que estamos viviendo una crisis global por uso de opioides (UNODC, 2019).

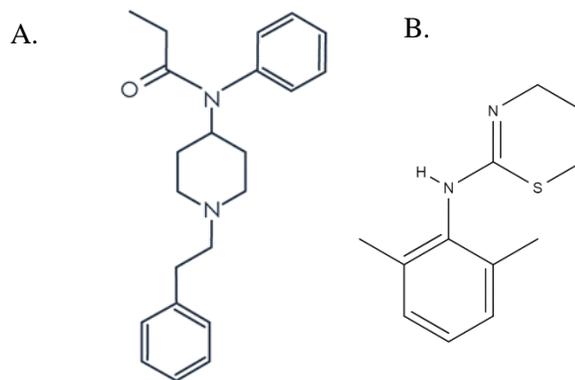


Figura 4. Estructura química de fentanilo (A) y xilacina (B).

### Farmacocinética

El fentanilo es altamente lipofílico, por lo tanto, se absorbe y distribuye en todos los tejidos altamente perfundidos y atraviesa con facilidad la barrera hematoencefálica (Comer & Cahill, 2019). Tiene gran afinidad por el receptor  $\mu$  ( $K_i = 1.35$  nM) y menor afinidad por los receptores  $\delta$  y  $\kappa$  (Volpe et al., 2011), por lo que se considera un agonista específico  $\mu$ . Se metaboliza por las enzimas CYP3A4, CYP3A5 y CYP3A7. La principal vía de degradación es una N-desalquilación a norfentanilo. La principal vía de excreción es por la orina y la vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ) es de 2 a 4 horas (Comer & Cahill, 2019).

### Efectos y mecanismo de acción

Entre los efectos que produce el fentanilo se incluyen: euforia, náuseas, vómito, constipación, analgesia, sedación, miosis y depresión respiratoria (Cruz & Granados-Soto, 2015). La depresión respiratoria puede provocar la muerte. El uso repetido de fentanilo puede conducir al desarrollo de tolerancia y dependencia física (Inturrisi & Jamison, 2002).

El fentanilo es un agonista selectivo de los receptores opioides tipo  $\mu$ , por lo que activa la vía de señalización mediada por la proteína  $G\alpha_{i/o}$  y el dímero  $\beta\gamma$ . Esto lleva a la inhibición de la enzima adenilato ciclasa y a la hiperpolarización de la célula por la activación de los canales rectificadores de potasio (GIRK) y la disminución de la conductancia de los canales de calcio. Además, la unión del fentanilo con el receptor genera cambios conformacionales que llevan al

reclutamiento de  $\beta$ -arrestina2, a la internalización de los receptores y a la señalización de proteína cinasas activadas por mitógeno (MAPK) (Fig. 5). En las últimas décadas se ha acumulado evidencia de que el fentanilo activa al receptor no opioide tipo Toll TLR4 que tiene un papel fundamental en el sistema inmune innato (Siuda et al., 2017; Wang et al., 2012).

La naloxona es un antagonista competitivo de los receptores a opioides. Este fármaco es eficaz como antídoto para prevenir la muerte por sobredosis de fentanilo porque compite por el sitio de unión y desplaza al fentanilo del receptor. En la clínica y en los centros de ayuda, la naloxona se usa eficazmente para evitar la muerte por depresión respiratoria. En estudios preclínicos también se ha demostrado su efectividad (Moss et al., 2020).

Desde principios de la década de los 2000, se ha reportado un incremento de la presencia de fentanilo y xilacina como adulterantes en muestras de heroína y de otras drogas (Macmadu et al., 2017). Su uso se detectó inicialmente en Puerto Rico. Alrededor de 2006 aparecieron los primeros casos en Filadelfia y, en la última década se ha extendido al resto de los Estados Unidos y otros países (Bowles et al., 2021). Es decir, el fentanilo ha pasado de ser una droga utilizada como adulterante, a ser una droga adulterada.

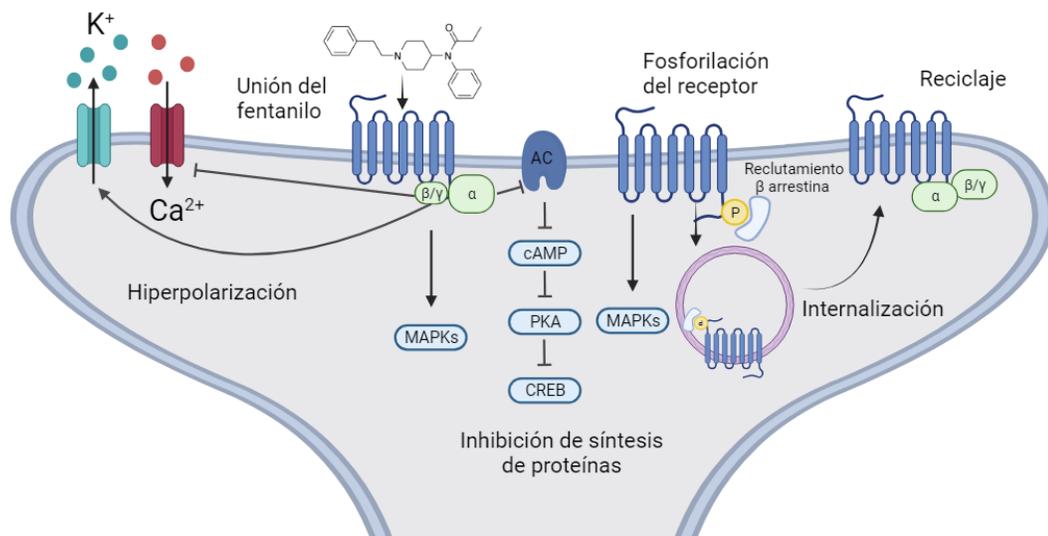


Figura 5. Vía de señalización de los receptores a opioides. Mecanismos moleculares que se desencadenan tras la unión del fentanilo al receptor  $\mu$ . Modificado de (Al-Hasani & Bruchas, 2011).

## 1.5 Xilacina

La xilacina fue sintetizada en 1962 y se propuso como tratamiento antihipertensivo. Sin embargo, debido a sus efectos adversos como la hipotensión, inhibición generalizada del sistema nervioso central (mareo, relajación muscular, sueño) y depresión respiratoria, nunca se aprobó su uso en humanos (Greene & Thurmon, 1988). Actualmente se utiliza en la medicina veterinaria como sedante y relajante muscular (Stillwell, 2003).

### Farmacocinética

La xilacina, al igual que el fentanilo, es una sustancia lipofílica que se absorbe y distribuye rápidamente. Su vida media varía dependiendo de la especie, pero oscila entre los 20 y 60 minutos (GARCIA-VILLAR et al., 1981). La xilacina se metaboliza por las enzimas del citocromo P450 (Veilleux-Lemieux et al., 2013) y su vía de degradación puede ser por N-desalquilación, S-desalquilación y/o hidroxilación, su eliminación es principalmente por la orina (G. M. J. Meyer & Maurer, 2013).

### Efectos y mecanismo de acción

La xilacina es un agonista de los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos que tienen una localización pre- y postsináptica (Fig. 6). A través de estos receptores, produce efectos centrales y periféricos. Al unirse a los receptores presinápticos  $\alpha_2$ , la xilacina disminuye la liberación de noradrenalina y dopamina causando relajación muscular, sedación, depresión del sistema nervioso central e inhibición del sistema cardiovascular (bradicardia, hipotensión, taquicardia). Además, produce hiperglicemia (Hoffmann et al., 2001). Por sus efectos como relajante muscular, se usa frecuentemente en combinación con ketamina para producir anestesia. La xilacina, a dosis altas, es tóxica por sí misma y está relacionada con mayor incidencia de accidentes, muertes por sobredosis y suicidios (Hoffmann et al., 2001; Nunez et al., 2021). En preclínica se utiliza yohimbina, un antagonista de los receptores  $\alpha_2$ , para revertir los efectos de la xilacina (Janssen et al., 2017), pero no hay evidencias de que pueda funcionar como antídoto para una sobredosis producida por la combinación de xilacina con opioides.

### La xilacina como adulterante

La xilacina es de uso común en la medicina veterinaria, por lo que no está controlada por los tratados internacionales de psicotrópicos y estupefacientes, por lo tanto, es relativamente fácil de conseguir. Este fármaco se ha utilizado como droga facilitadora de crímenes por ser un inductor del sueño y relajante muscular (Krongvorakul et al., 2018). Como se mencionó previamente, la xilacina se ha detectado en usuarios que la consumen involuntariamente en drogas de abuso adulteradas (Ruiz-Colón et al., 2014). Los primeros descubrimientos de la xilacina como adulterante se realizaron en Filadelfia (Wong et al., 2008) y Puerto Rico, donde, en un momento determinado, el 36-37% de muestras de heroína analizadas contenían esta sustancia (Rodríguez et al., 2008). Actualmente se ha encontrado como adulterante del fentanilo (Bowles et al., 2021; Korn et al., 2021; Nunez et al., 2021), principalmente en Estados Unidos (Alexander et al., 2022; Johnson et al., 2021; Korn et al., 2021) y Canadá (Bowles et al., 2021) y ha sido responsable de varias muertes por sobredosis (Nunez et al., 2021). Un estudio reciente ha probado que la presencia de xilacina pudiera incrementar la hipoxia cerebral inducida por fentanilo, sin embargo, los estudios al respecto son muy limitados (Choi et al., 2023).

### La xilacina y el fentanilo

La xilacina comparte algunas características con el fentanilo, ya que ambos inhiben al sistema nervioso central. Dentro de los síntomas que ambos fármacos producen se encuentran la hipotensión y la depresión respiratoria, aunque, en el caso del fentanilo, la hipotensión ortostática es moderada. Tanto los receptores  $\alpha_2$  adrenérgicos como los opioides señalizan por la proteína  $G\alpha_{i/o}$ , que inhibe a la enzima adenilato ciclasa y produce la hiperpolarización de la célula (Bylund, 2007; Comer & Cahill, 2019). El consumo simultáneo de xilacina y fentanilo podría crear un efecto aditivo o de potenciación, sin embargo, no hay estudios que lo comprueben (Ehrman-Dupre et al., 2022; Ruiz-Colón et al., 2014).

A la fecha, no hay un tratamiento para pacientes con sobredosis de fentanilo combinado con xilacina. Los reportes clínicos que se han presentado con este tipo de sobredosis han sido tratados administrando líquidos como solución salina, asistiendo la respiración y administrando 2 mg de naloxona; sin embargo, esta última no ha sido efectiva para prevenir la muerte (Ball et al., 2022). Es fundamental estudiar los efectos farmacológicos de la combinación de fentanilo con xilacina para buscar posibles tratamientos que reduzcan los efectos adversos y prevengan la muerte por sobredosis.

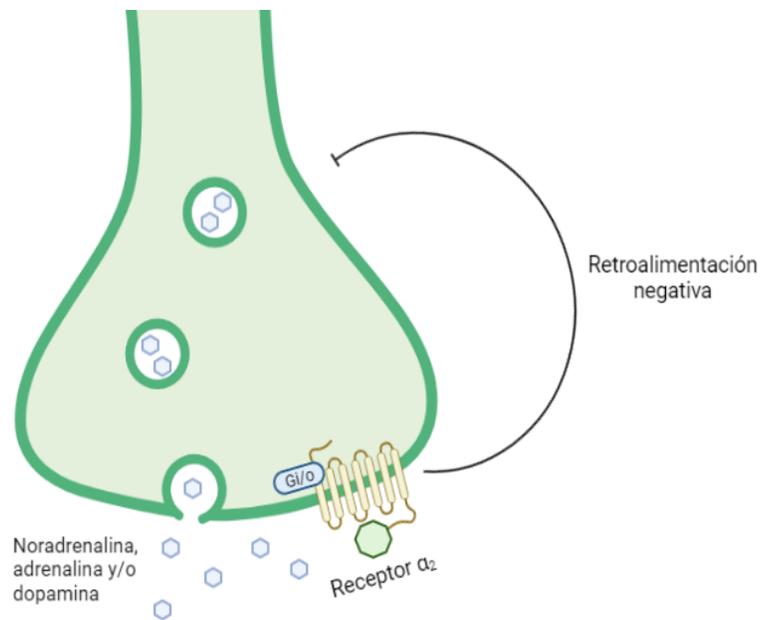


Figura 6. Mecanismo de acción de la xilacina. La xilacina inhibe la liberación de noradrenalina, adrenalina y/o dopamina por retroalimentación negativa. Modificado de (Gertler et al., 2001).

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

- La adulteración de drogas es una práctica común que implica grandes riesgos para los consumidores. La presencia de sustancias farmacológicamente activas en sustancias psicoactivas expone a los usuarios a efectos adversos inesperados, incluyendo la muerte.
- La metanfetamina, al combinarse con cafeína se potencian sus efectos tóxicos. Se ha determinado el efecto de la adulteración de cafeína con otros psicoestimulantes, pero hay pocos estudios que determinen los efectos de la combinación de metanfetamina y cafeína.
- El fentanilo se encuentra frecuentemente adulterado con xilacina. Sin embargo, los efectos preclínicos de la combinación de fentanilo y xilacina no han sido estudiados.
- Es necesario determinar los efectos de estas adulteraciones para conocer los riesgos para la salud de los pacientes y buscar tratamientos que permitan prevenir la muerte por sobredosis.

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Definir los efectos letales y conductuales de la adulteración de metanfetamina con cafeína y de fentanilo con xilacina.

#### **3.1 Objetivos específicos**

Para la combinación de metanfetamina y cafeína:

- Analizar cómo se modifican los efectos letales, de actividad locomotora y de sensibilización locomotora de la metanfetamina combinada con cafeína.
- Evaluar si la adenosina, agonista del receptor  $A_{2A}$ , es eficaz para prevenir la muerte por sobredosis de metanfetamina combinada con cafeína.

Para la combinación de fentanilo y xilacina:

- Determinar cómo se modifican los efectos letales, antinociceptivos, en la coordinación motora y de desarrollo de tolerancia y abstinencia al fentanilo en combinación con xilacina.
- Evaluar si la naloxona o la yohimbina, son eficaces para evitar la muerte por sobredosis del fentanilo combinado con xilacina.

## **4. HIPÓTESIS**

Hipótesis para la combinación de cafeína con metanfetamina:

1. La cafeína: a) aumentará la letalidad, la actividad locomotora y la sensibilización motora de la metanfetamina.
2. La adenosina reducirá la mortalidad de la combinación de cafeína y metanfetamina.

Hipótesis para la combinación de xilacina con fentanilo:

3. La xilacina: a) disminuirá la coordinación motora; b) aumentará la letalidad inducida por fentanilo; c) disminuirá la eficacia de la naloxona para prevenir la sobredosis; y d) modificará el efecto antinociceptivo del fentanilo.
4. Solo la combinación de yohimbina combinada con naloxona prevendrá la muerte por sobredosis del fentanilo adulterado con xilacina

## **5. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **5.1 Animales**

Se utilizaron ratones macho de la cepa Swiss Webster de 5-6 semanas de edad (25-32 gr). Los animales tuvieron acceso a comida y agua *ad libitum* y estuvieron alojados en grupos de 10 ratones por caja en un ciclo de luz/oscuridad de 12/12 horas. El encendido de las luces fue a las 6:00. La temperatura se mantuvo controlada (20-23°C). El manejo de los animales cumplió con las condiciones de la NOM-062-ZOO-1999 y del Comité Interno para el Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio (CICUAL) de acuerdo con el protocolo 012-021.

### **5.2 Fármacos**

Los fármacos que se utilizaron son: clorhidrato de naloxona, clorhidrato de yohimbina, adenosina, clorhidrato de xilacina y cafeína de Sigma-Aldrich. El clorhidrato de metanfetamina fue donado por la Secretaría de Salud y su pureza se confirmó por medio de espectroscopía infrarroja. El citrato de fentanilo fue donado por el laboratorio Psicofarma. Todos los fármacos se disolvieron en solución salina al 0.9% v/v y se administraron por vía intraperitoneal (i.p.). En el caso de las combinaciones, los fármacos se mezclaron en la jeringa justo antes de su administración, teniendo como volumen máximo 0.2 ml.

### **5.3 Pruebas de letalidad**

Con la finalidad de determinar la dosis letal al 10% (DL<sub>10</sub>), se realizaron curvas dosis-respuesta del efecto letal de las combinaciones y del pretratamiento con antagonistas. En todos los grupos (n=10, cada uno) se evaluó la latencia de muerte y el porcentaje de animales que murieron (Fig. 7A).

### **5.4 Evaluación de la actividad locomotora**

Se realizó una prueba de campo abierto para evaluar la actividad locomotora inducida por los fármacos. Se empleó un actímetro electrónico (Panlab, Barcelona, España) que está compuesto por un marco bidimensional (45 x 45 cm) que emite haces infrarrojos que se interrumpen conforme los animales se desplazan dentro del equipo, y el número de cortes se va registrando en una computadora. La prueba consiste en una etapa de habituación al equipo de 30 min, después de los cuales se administra el tratamiento y la actividad locomotora se registra en intervalos de 5 min durante 90 minutos (Fig. 7B).

### **5.5 Evaluación de la antinocicepción**

Se realizó la prueba de retiro de la cola (“tail flick”) que evalúa la sensibilidad al dolor ante un estímulo térmico con una intensidad definida. El aparato consiste en un equipo que emite un haz de luz a partir de una fuente de calor conectada a un temporizador automático. Los animales se habitúan al aparato 2 veces al día durante 2 días. El día de la prueba, se coloca al animal de manera que la base de su cola quede sobre el haz de luz del aparato y se ajusta la fuente de calor hasta obtener una latencia de retiro de la cola promedio de 4-6 s. Esta latencia se seleccionó para que fuera posible ver cambios por arriba y por debajo de ese valor con los diferentes tratamientos. Después se administra el fármaco y se realizan cursos temporales a los 0, 15, 30, 45, 60, 90 y 120 min. En esta prueba, un incremento en la latencia del retiro de la cola indica antinocicepción, mientras que una disminución en la latencia indica un efecto pro-nociceptivo. Para evitar daño al tejido, se estableció un tiempo de corte de 15 s. El grado de antinocicepción, expresado como porcentaje del máximo efecto posible (%MEP) se calcula por medio de la siguiente fórmula:  $\%MEP = [(B-A) / (C-A)] * 100$ . Donde “A” es la latencia basal antes del tratamiento, “B” es la latencia después de administrar el fármaco y “C” es la latencia de corte (15 en este caso) (Fig. 8B).

### **5.6 Evaluación de la coordinación motora**

Se utilizó un equipo de rota-rod para evaluar la coordinación motora de los

animales. El rota-rod consta de carriles cilíndricos que rotan a una velocidad constante de 11 rpm. Los animales se habitúan para aprender a caminar en los carriles giratorios, 2 veces al día, durante 10 min. En la prueba, al tercer día, se realiza el mismo procedimiento y se mide la latencia y el número de caídas en un periodo de 5 min. En esta prueba, una disminución en la latencia de caída o un incremento en el número de caídas indica disminución de la coordinación motora (Fig. 8C).

### **5.7 Evaluación de la abstinencia**

La abstinencia por supresión se evalúa 24 h después de la última administración de fármaco. Para ello, los animales se colocan en cilindros individuales de 10 cm de diámetro x 20.5 cm de alto y se cuentan las veces que presentan los siguientes signos de abstinencia: acicalamiento, levantamientos y brincos, en un periodo de 10 min.

### **5.8 Análisis estadístico**

Para determinar si existen diferencias estadísticas entre grupos en las pruebas de letalidad, se hicieron pruebas de Fisher. Para analizar diferencias entre más de 3 grupos se realizaron análisis de varianzas (ANOVA) de una vía. Como prueba post-hoc se utilizó la prueba de Tukey. Para determinar cambios entre dos grupos independientes se utilizó la prueba t de Student no pareada y para las pruebas de tolerancia se hicieron pruebas t de Student pareadas. Se consideró como nivel de significancia estadística un valor de p menor a 0.05 ( $p < 0.05$ ). Todos los análisis y gráficos se realizan con el software GraphPad Prism 8.

### **Diseño experimental**

*Experimento 1: Efecto de la metanfetamina y la cafeína sobre la letalidad y su posible prevención con administración de adenosina*

Los animales reciben la  $DL_{10}$  de metanfetamina 5.6 mg/kg (Ruíz-Quiñonez, 2020), la  $DL_{10}$  de cafeína (177 mg/kg) y su combinación (n=10, por grupo).

Estas dosis se seleccionaron con base en estudios previos de nuestro laboratorio. En grupos independientes se evalúa si la adenosina (10 o 100 mg/kg), administrada al mismo tiempo que la combinación o una hora después, previene la muerte ocasionada por la combinación de metanfetamina con cafeína

*Experimento 2: Efecto de la metanfetamina y la cafeína sobre la actividad locomotora*

Los efectos motores de la metanfetamina (0.3 mg/kg), la cafeína (17.7 mg/kg) y su combinación se evalúan en la prueba de campo abierto (n=10, por grupo).

*Experimento 3: Efecto de la metanfetamina y la cafeína sobre la sensibilización locomotora*

Los ratones reciben 4 administraciones (una cada día) de metanfetamina (0.5 mg/kg), cafeína (10 mg/kg) o su combinación para evaluar el desarrollo de la sensibilización locomotora. Esos mismos ratones se dejan 2 días en abstinencia y al tercer día se administra un reto que puede ser su mismo tratamiento o bien el tratamiento inverso, es decir, si recibieron repetidamente metanfetamina, ahora se les va a dar cafeína y viceversa, esto con la finalidad de determinar si se desarrolla sensibilidad cruzada.

*Experimento 4: Efecto del fentanilo y la xilacina sobre la letalidad y su posible prevención con la administración de antagonistas*

Los animales se administran con la DL<sub>10</sub> de fentanilo (10 mg/kg), de xilacina o la combinación de ambos fármacos a las mismas dosis (n=10, por grupo). La DL<sub>10</sub> de fentanilo se obtuvo previamente en nuestro laboratorio (Carranza-Aguilar, 2021). La DL<sub>10</sub> de xilacina se calcula a partir de una curva dosis respuesta de letalidad.

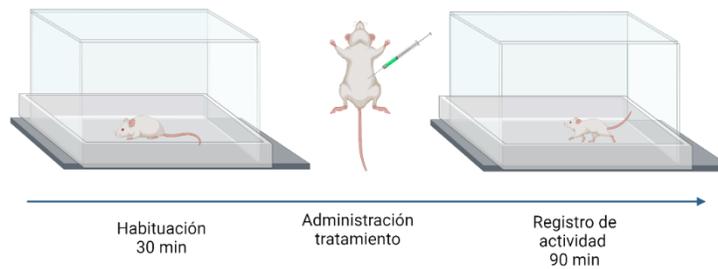
Para evaluar si la naloxona o la yohimbina previenen la muerte ocasionada por la combinación fentanilo con xilacina, las dosis de naloxona 10 y 30 mg/kg (Ruíz-Quiñonez, 2020), o de yohimbina 10 y 30 mg/kg, se administran 20 min

antes del tratamiento combinado. (n=10, por grupo) y los animales se observan durante un periodo de 1 h. Después de 24 h se cuenta el número de individuos que sobrevivieron.

A.



B.



C.

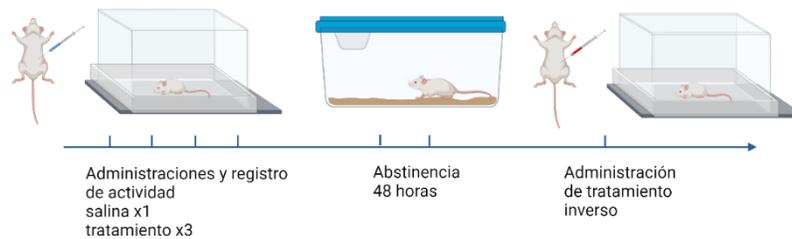


Figura 7. Esquema de los experimentos con la combinación de cafeína y metanfetamina. A. Pruebas de letalidad. B. Evaluación de la actividad locomotora. C. Evaluación de la sensibilización locomotora

*Experimento 5: Efecto del fentanilo y la xilacina sobre la antinocicepción*

Para este experimento, se administra xilacina (5.6 mg/kg), fentanilo (0.3 mg/kg) o la combinación de ambos (n=8 por grupo) y se evalúan en la prueba de tail flick. Para seleccionar las dosis se hicieron curvas dosis-respuesta y se utilizaron dosis efectivas pero que no presentaran el efecto máximo. Al grupo control se le administra el vehículo.

*Experimento 6: Efecto del fentanilo y la xilacina sobre la coordinación motora*

Los animales reciben fentanilo 0.1 o 0.3 mg/kg, xilacina 3.1 mg/kg (que es la dosis subefectiva al efecto sedante) y la combinación de fentanilo y xilacina en las dosis mencionadas; cinco min después se evalúa la coordinación motora en el modelo de rotarod (n=10, por grupo). El grupo control se administra con solución salina.

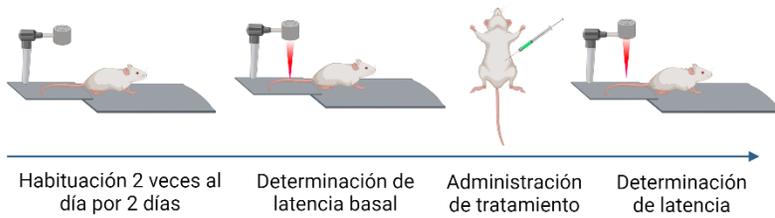
*Experimento 7: Efecto de la xilacina sobre la tolerancia desarrollada por el fentanilo*

Para inducir la dependencia física, los ratones reciben 7 administraciones (3 veces al día, con un intervalo de 6 horas, en un periodo de 2 días y medio) de fentanilo (0.3 mg/kg), xilacina (5.6 mg/kg), o su combinación (n=8, por grupo). Estas dosis y esquema de administración se seleccionaron con base en estudios previos del laboratorio (Sánchez-Rojas, 2019). El grupo control se trata repetidamente con el vehículo (n=8). La tolerancia se determina con la prueba de tail-flick realizada inmediatamente después de la primera y la última administración de los fármacos. La abstinencia por supresión se evalúa 24 h después de la última administración de fármacos.

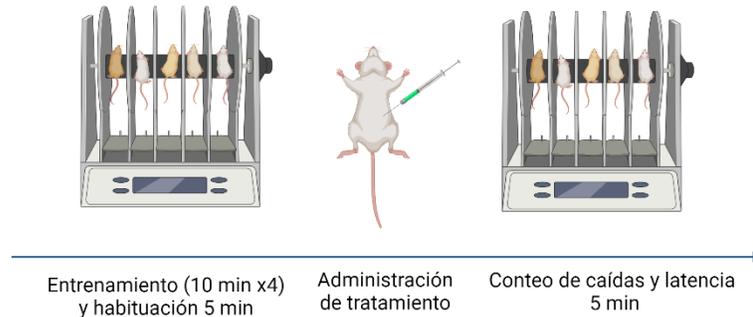
A.



B.



C.



D.



Figura 8. Esquema de los experimentos con la combinación de xilacina y fentanilo. A. Pruebas de letalidad. B. Evaluación de la antinocicepción. C. Evaluación de la coordinación motora. D. Evaluación de la tolerancia y abstinencia.

## **6. RESULTADOS**

### **6.1 La cafeína potencia la letalidad de la metanfetamina**

Las dosis de cafeína que se probaron para determinar la letalidad fueron 100, 177, 316 y 560 mg/kg. La dosis más alta que no produjo la muerte fue la de 177 mg/kg. Esta dosis se combinó con la DL<sub>10</sub> de metanfetamina (5.6 mg/kg) y observamos que la cafeína potenció el efecto de la metanfetamina al incrementar significativamente el porcentaje de animales que murieron (Fig. 9B).

### **6.2 La letalidad inducida por la combinación de cafeína con metanfetamina no se puede prevenir con adenosina**

Se administraron 2 dosis de adenosina, 10 mg/kg y 100 mg/kg, y ninguna previno la letalidad inducida por la adulteración de metanfetamina con cafeína (Fig. 9B).

### **6.3 La cafeína incrementa la hiperlocomoción inducida por la metanfetamina**

Tanto la cafeína como la metanfetamina incrementaron significativamente la actividad locomotriz por sí solas con respecto al grupo control. La cafeína lo hizo a la dosis de 17.1 mg/kg y la metanfetamina a 0.3 mg/kg. Al combinarse los dos fármacos, a las mismas dosis, se observó un incremento significativo de la actividad locomotora principalmente durante la primera mitad de la prueba. La combinación de los fármacos produjo un efecto de tipo aditivo sobre la locomoción (Fig. 10).

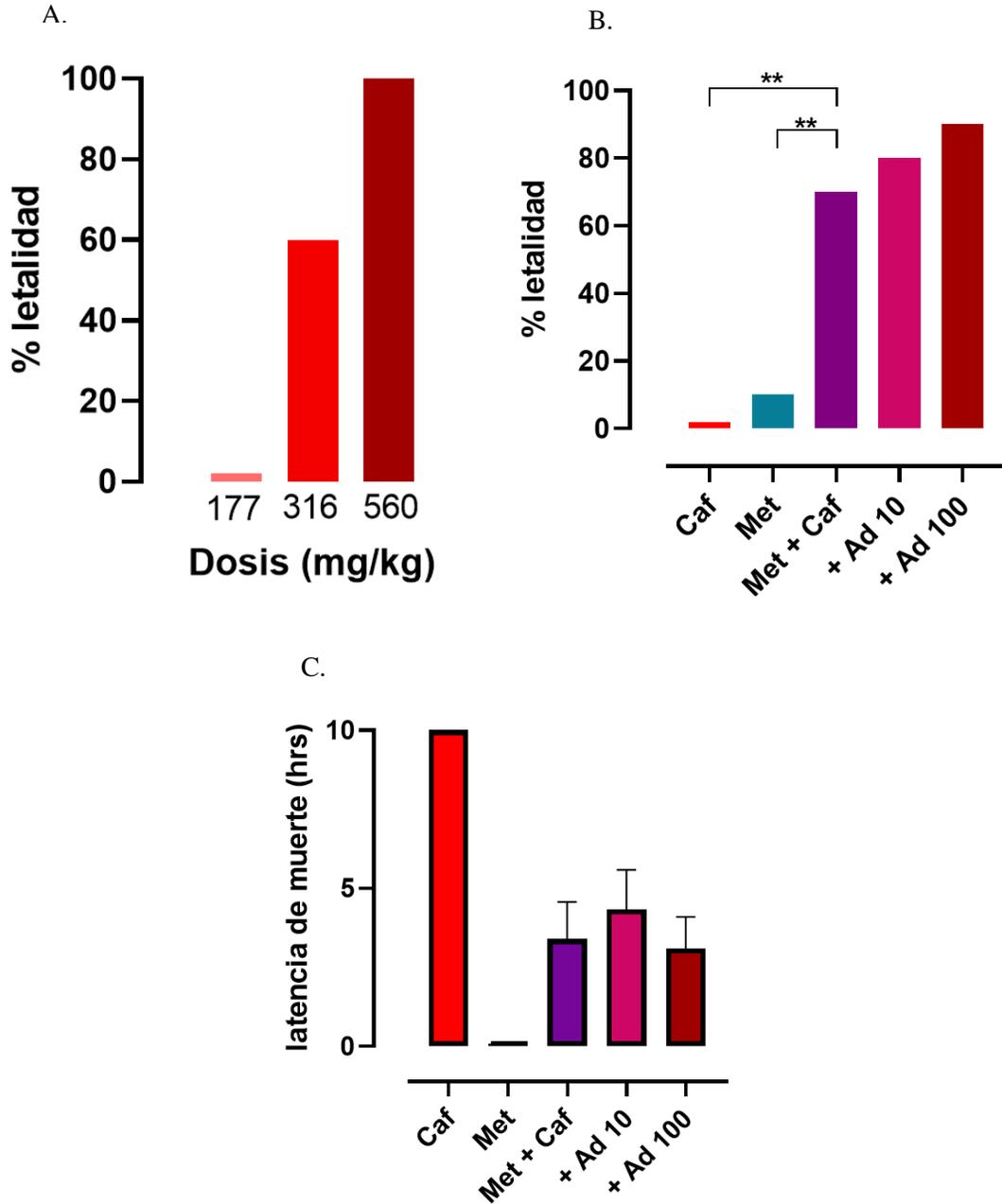
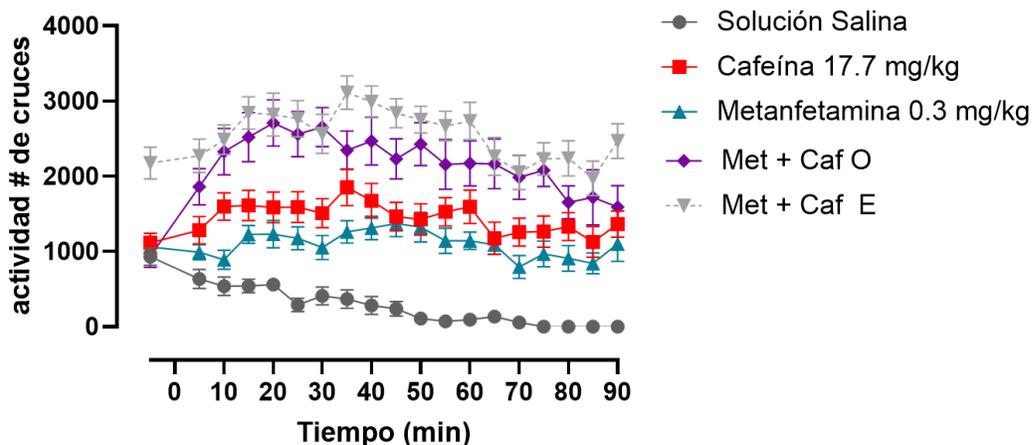


Figura 9. Letalidad inducida por metanfetamina y cafeína. A. Curva dosis respuesta de la letalidad inducida por cafeína (n=10; excepto 560 mg/kg n=5. B. Comparación de la letalidad inducida por de cafeína (Caf) (177 mg/kg), metanfetamina (Met) (5.6 mg/kg) y su combinación y en presencia de adenosina (Ad) (10 y 100 mg/kg). La letalidad se expresa en porcentaje. C. Latencia de muerte en horas para cada tratamiento, Prueba de Fisher, \*\*p<0.01.

A.



B.

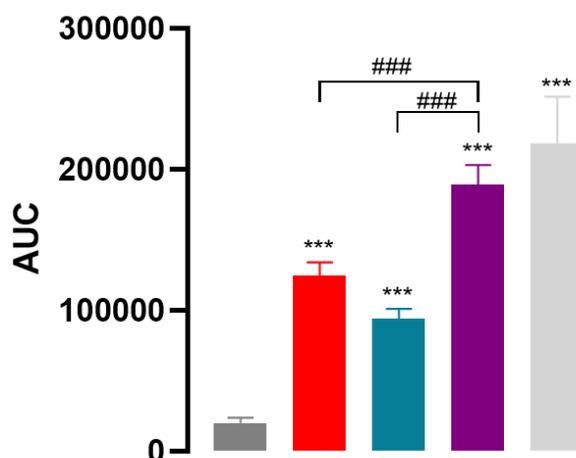


Figura 10. La cafeína incrementa la hiperlocomoción en ratones inducida por la metanfetamina. A. Actividad locomotora de los ratones con diferentes tratamientos. Cada punto representa el promedio del número de movimientos de cada grupo  $\pm$ SEM; n= 10 Met + Caf O: efecto observado de la combinación de cafeína y metanfetamina. Met + Caf E: suma teórica de los promedios. B. Área bajo la curva de los movimientos en el panel A. ANOVA de una vía:  $F_{(3, 36)} = 584.1$ ;  $p < 0.001$ ; prueba post-hoc de Tukey, comparaciones múltiples donde todos los grupos resultaron diferentes comparados con el control \*\*\* $p < 0.001$ .

#### 6.4 La metanfetamina induce sensibilización locomotora pero no la cafeína ni la combinación de cafeína con metanfetamina

La administración repetida de metanfetamina indujo sensibilización motora con cada administración mientras que los ratones tratados repetidamente con cafeína no presentaron una respuesta diferente con cada administración. En el caso del grupo tratado con la combinación, se presenta una mayor

locomoción comparada con los grupos tratados solo con metanfetamina o cafeína, pero no se induje sensibilización (Fig. 11 A-C).

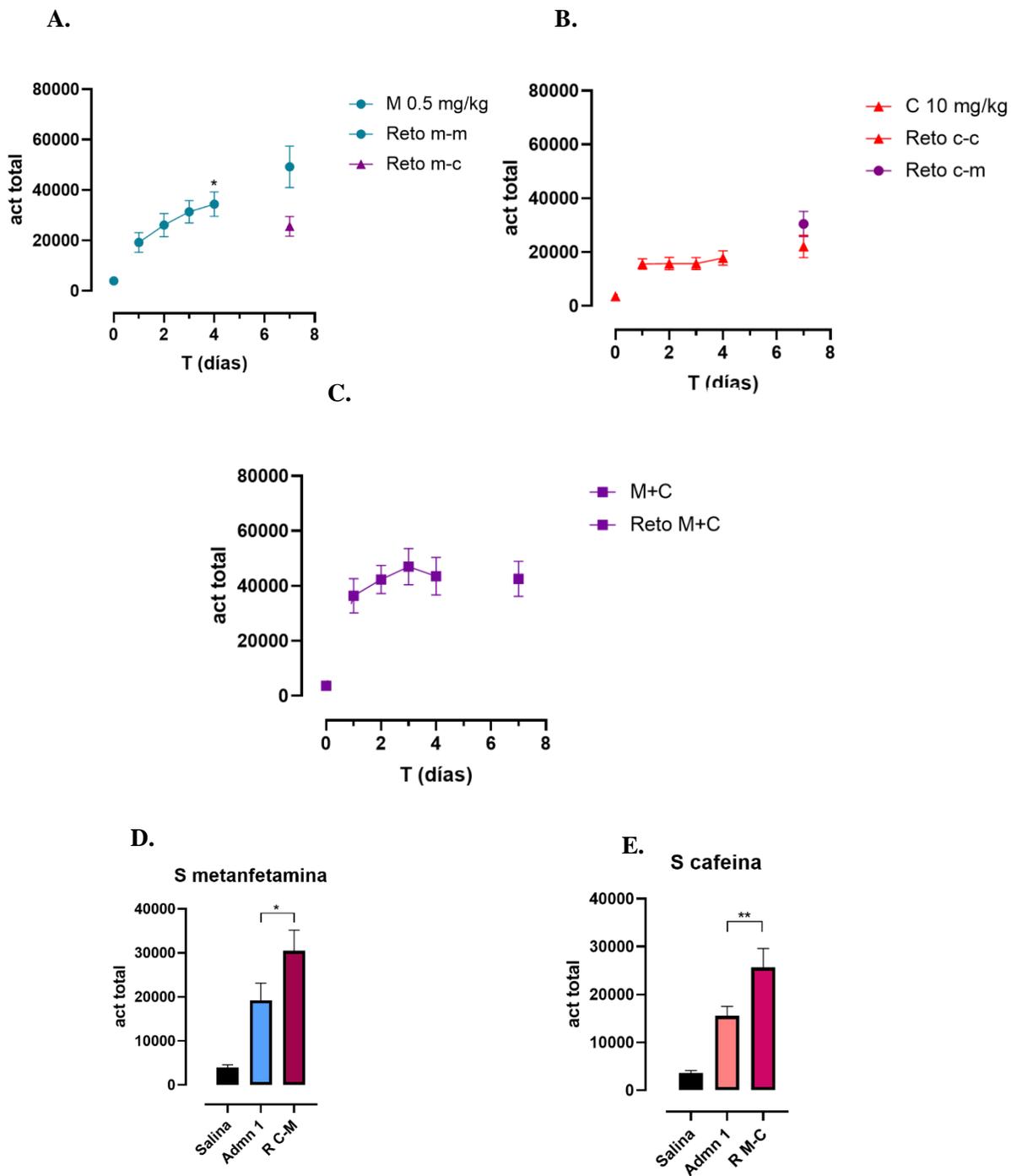


Figura 11. Promedio de actividad locomotora por cada día, por grupos. A-C. Gráfica de barras del promedio de la actividad total por grupo por cada día de administración (M: metanfetamina, C: cafeína, M+C: Metanfetamina + cafeína). D-E Actividad total por cada día de administración de cada grupo. Cada punto de la gráfica representa el promedio de actividad total por cada día de administración  $\pm$ SEM. ANOVA de una vía:  $F_{(10, 30)} = 19$ ;  $p < 0.001$ ; prueba post-hoc de Tukey.

### **6.5 La cafeína y la metanfetamina inducen sensibilización cruzada**

Un grupo de ratones se les dio como reto el tratamiento opuesto al que recibieron repetidamente durante 4 días. En ambos casos la actividad locomotora registrada con el reto fue significativamente mayor comparada con la que produjo el tratamiento agudo de cada fármaco (Fig. 11 D y 11 E).

### **6.6 La xilacina potencia la letalidad del fentanilo y la muerte se previene con una dosis alta de naloxona**

Las dosis de xilacina que se evaluaron para determinar la letalidad fueron 17.7, 31.6, 56.2, 60, 74.2, 100 y 177 mg/kg. La  $DL_{10}$  de xilacina fue 60 mg/kg. Ésta se combinó con la  $DL_{10}$  de fentanilo y observamos que la xilacina potenció la letalidad del fentanilo (Fig. 15 B). La dosis de naloxona de 30 mg/kg, pero no la de 10 mg/kg previno la letalidad inducida por la adulteración de fentanilo con xilacina. La yohimbina no tuvo efecto a las dos dosis probadas. La administración de la combinación de naloxona y yohimbina, a las dosis de 10 mg/kg cada una, redujo el porcentaje de letalidad e incrementó la latencia de muerte (Fig. 12 B y 12 C).

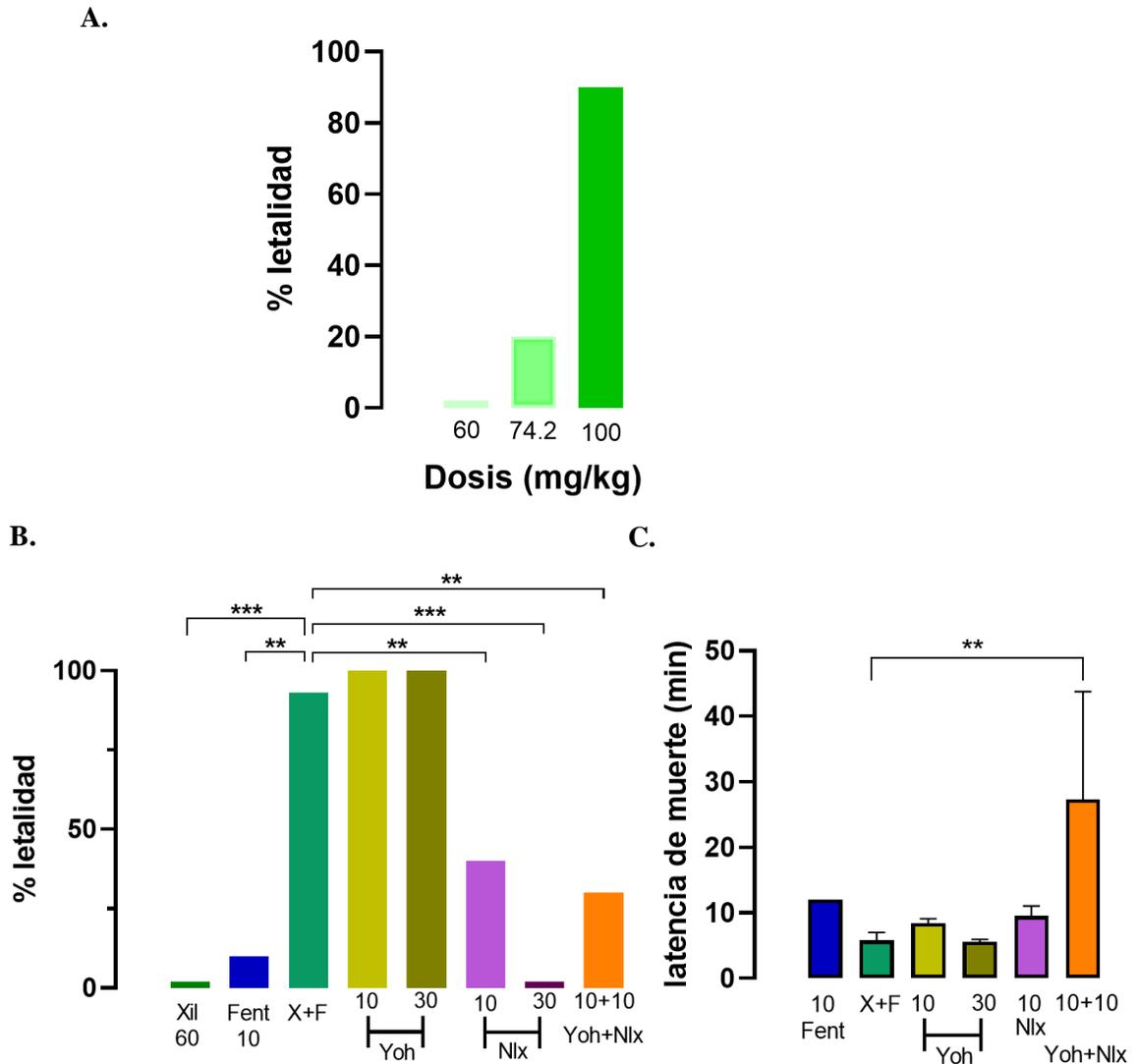


Figura 12. La xilacina potencia la letalidad del fentanilo. A. Porcentaje de letalidad de xilacina a diferentes dosis (para cada grupo n=10; excepto 60 mg/kg n=5). B. Porcentaje de letalidad de xilacina (xil) (DL<sub>10</sub>= 60 mg/kg) combinada con fentanilo (Fent) (DL<sub>10</sub>= 10 mg/kg) y sus respectivos antagonistas a diferentes dosis yohimbina (Yoh) 10 y 30 mg/kg, naloxona (Nlx) 10 y 30 mg/kg, y la combinación de yohimbina y naloxona 10mg/kg). C. Latencia de muerte con los diferentes tratamientos. Prueba de Fisher n=10, \*\*p<0.01; \*\*\*p<0.001.

### 6.7 La xilacina incrementa el efecto antinociceptivo del fentanilo

La dosis de 0.3 mg/kg de fentanilo produjo un efecto antinociceptivo que alcanzó

su máximo en los primeros 15 min después de su administración. La xilacina tuvo un efecto antinociceptivo menor y más lento, alcanzando su valor máximo a los 30 min. Al combinar estas dos dosis, observamos que la xilacina incrementó el efecto antinociceptivo del fentanilo (Fig. 13).

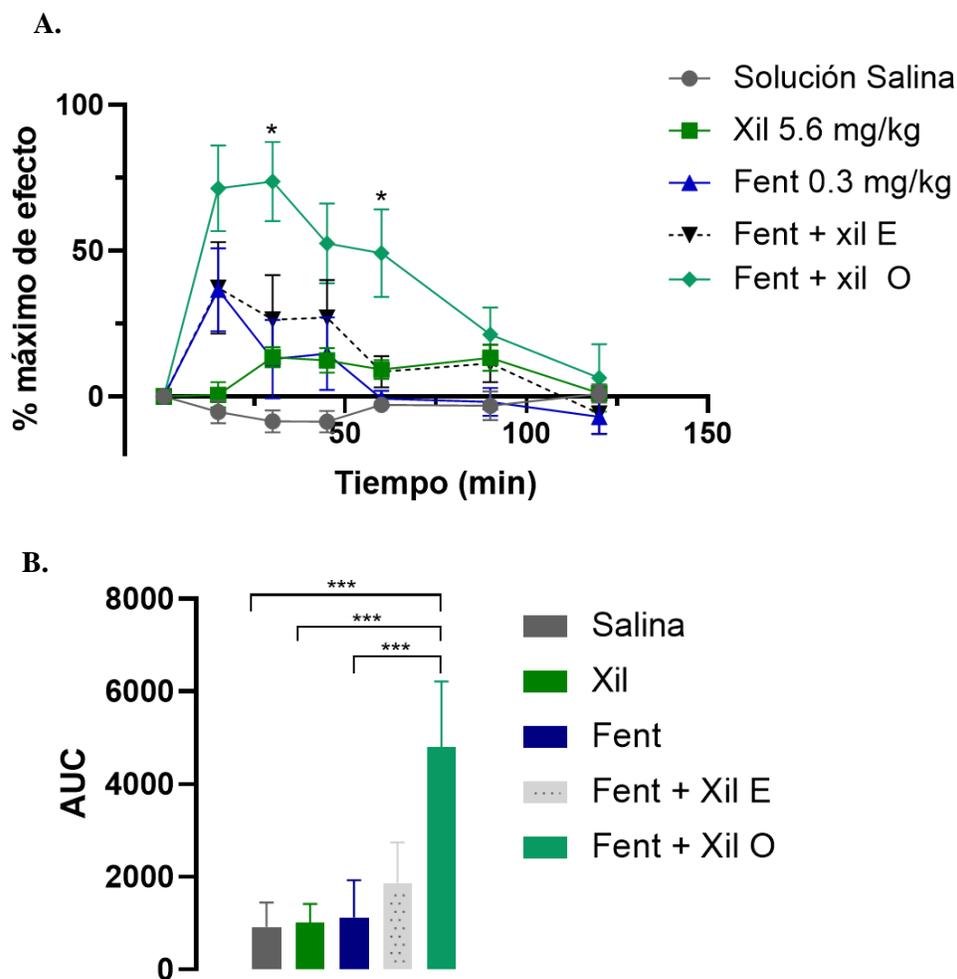


Figura 13. La xilacina incrementa la antinocicepción en ratones inducida por el fentanilo. A. Curso temporal de los ratones con diferentes tratamientos. Cada punto representa el promedio del porcentaje máximo de efecto de cada grupo (Fent + Xil E: efecto esperado, suma teórica de xilacina (xil), y fentanilo (Fent); Fent + Xil O: efecto observado)  $\pm$ SEM; n= 10. B. Área bajo la curva del curso temporal en el panel A. ANOVA de una vía:  $F_{(3, 34)} = 34.54$ ;  $p < 0.0001$ ; prueba post-hoc de Tukey, comparaciones múltiples donde todos los grupos resultaron diferentes al efecto observado  $***p < 0.001$ .

### **6.8 La combinación de xilacina con fentanilo no afecta la coordinación motora**

Los animales no tuvieron cambios significativos en cuanto al número de caídas que presentaron durante la prueba de rotarod ANOVA de una vía  $F_{(5, 42)} = 1.63, p=0.172$  (Tabla 1).

Tabla 1. La coordinación motora no se altera con los diferentes tratamientos. Promedio del número de caídas que presentaron los ratones ante los diferentes tratamientos.

| <b>Tratamiento (mg/kg)</b>              | <b>N° promedio de caídas ± SEM</b> |
|---|------------------------------------|
| <b>Solución salina</b>                  | 0 ± 0                              |
| <b>Xilacina (5.6)</b>                   | 0.62 ± 0.49                        |
| <b>Fentanilo (0.1)</b>                  | 0 ± 0                              |
| <b>Fentanilo (0.3)</b>                  | 0.62 ± 0.26                        |
| <b>Fentanilo (0.1) + xilacina (5.6)</b> | 0.62 ± 0.37                        |
| <b>Fentanilo (0.3) + xilacina (5.6)</b> | 1 ± 0.32                           |

### **6.9 La xilacina no modifica la tolerancia ni abstinencia inducidas por fentanilo**

Después de 7 administraciones repetidas de cada tratamiento observamos que el tratamiento con solución salina y xilacina produjeron el mismo efecto después de la primera administración y la última, es decir no indujeron tolerancia, mientras que el fentanilo desarrolló tolerancia después de 7 administraciones. Esta tolerancia no fue alterada al combinar fentanilo con xilacina (Fig. 14).

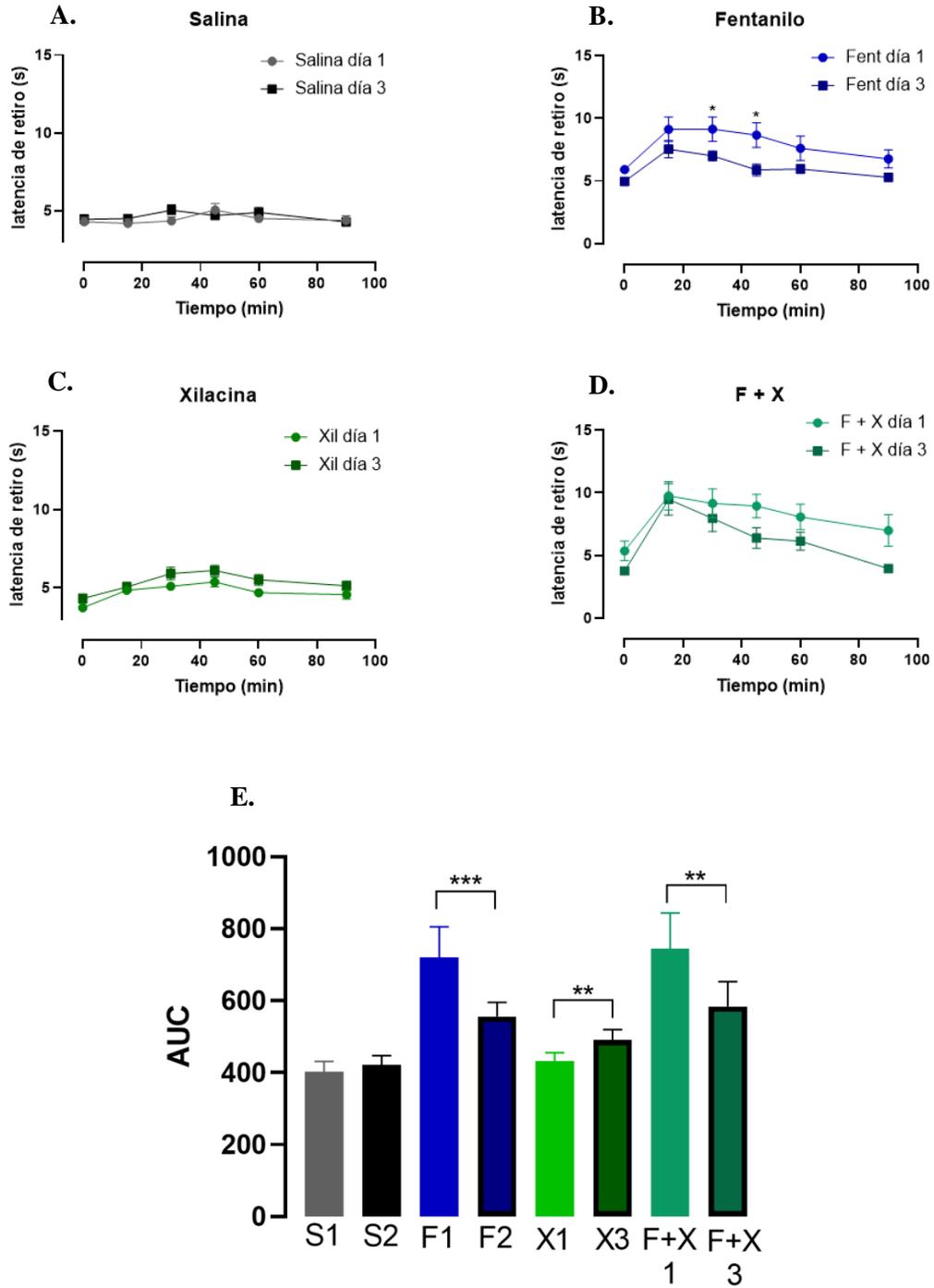


Figura 14. La tolerancia inducida por fentanilo no se altera con la presencia de xilacina. A-D Cursos temporales de los diferentes tratamientos al día 1 y día 3 de tratamiento. E. Área bajo la curva de los cursos temporales. Prueba t de Student pareado \* $p < 0.05$ .

Al evaluar las conductas asociadas a la abstinencia, solo presentaron diferencias el grupo de ratones que fueron expuestos a la combinación de fentanilo y xilacina, y solo en la conducta de acicalamiento, tanto en la frecuencia como en el tiempo en que se presenta cada evento (Fig. 15).

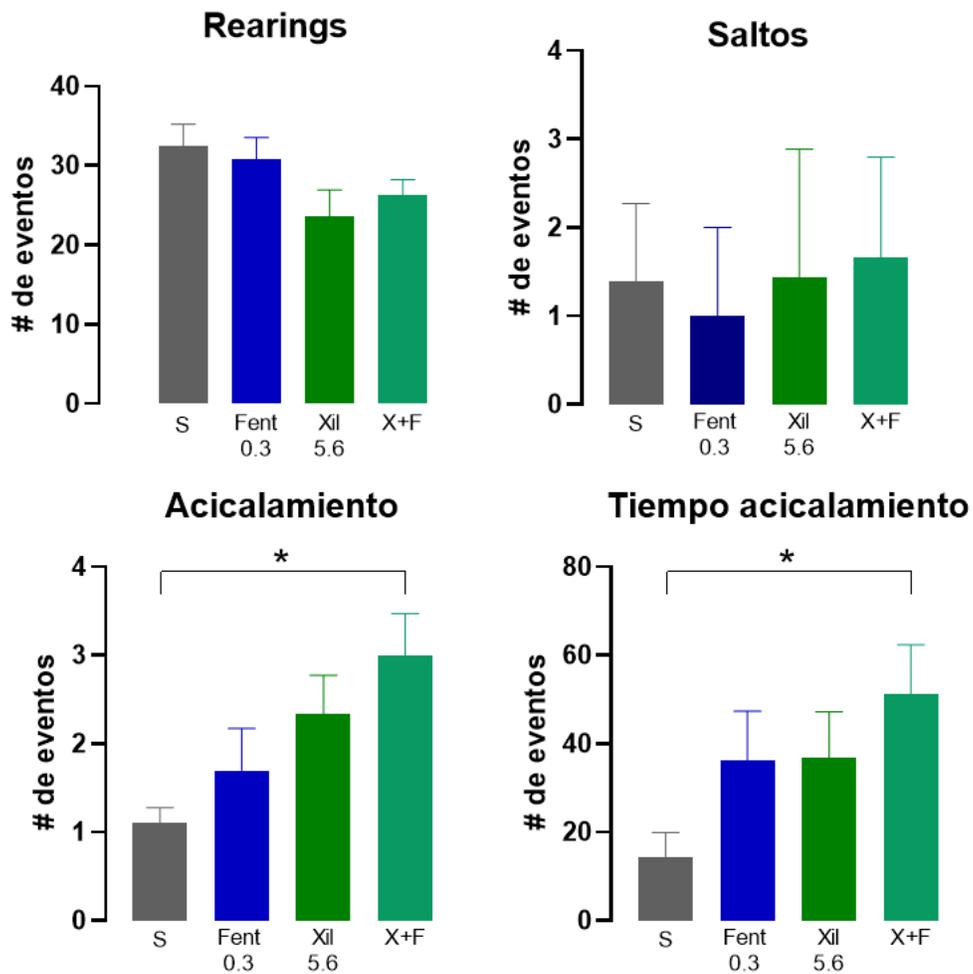


Figura 15. Conductas evaluadas después de 24 horas de abstinencia por supresión a los diferentes tratamientos. Prueba t de Student pareada \*p<0.05.

## 7. DISCUSIÓN

### 7.1. Efectos de combinar metanfetamina y cafeína

Estudios preclínicos previos han demostrado que la cafeína incrementa el efecto estimulante de la cocaína (López-Hill et al., 2011), la preferencia de lugar condicionado (Muñiz et al., 2017), la liberación de dopamina (Scorza et al., 2023), y la sensibilización motora inducida por cocaína en ratas (Prieto et al., 2015). Estos estudios, sugieren que la cafeína, añadida como adulterante, puede exacerbar o potenciar los efectos de otros psicoestimulantes, sin embargo, a la fecha, los estudios de la combinación de metanfetamina y cafeína son limitados.

En este trabajo, nosotros observamos que la cafeína incrementa la letalidad de la metanfetamina. Este resultado coincide con el trabajo de Sinchai y colaboradores en el que observaron que la administración de cafeína y metanfetamina redujo el porcentaje de supervivencia hasta en un 33%, comparado con el grupo de ratas que solo recibió metanfetamina (83%) (Sinchai et al., 2011). La diferencia con respecto a nuestro trabajo es que ellos utilizaron un esquema de administraciones repetidas y que lo hicieron en otra especie, además, usaron una dosis de cafeína más baja que la nuestra (12 mg/kg). Nuestros resultados muestran que la potenciación de efectos letales puede ocurrir con una administración aguda de metanfetamina y cafeína.

El mecanismo de acción a través del cual la cafeína incrementa la letalidad de la metanfetamina no está claramente definido. La metanfetamina, por sí misma, es neurotóxica, es decir, que genera daño en las neuronas dopaminérgicas, serotoninérgicas, e induce neuroinflamación y apoptosis (Cadet & Krasnova, 2009; Moratalla et al., 2017). Además, la metanfetamina, a dosis altas, produce hipertensión pulmonaria, vasoconstricción, arritmias y cardiomiopatía (Kevil et al., 2019). Las dosis altas de cafeína pueden producir temblores, ansiedad, síntomas metabólicos como hiperglicemia e inducir efectos cardiovasculares como arritmias, hipotensión, hipertensión, taquicardia, bradicardia además puede producir hiperventilación pulmonar y falla

respiratoria (Willson, 2018). Todos estos mecanismos trabajando en conjunto, en especial los mecanismos cardiacos y respiratorios pueden actuar de manera sinérgica, y con ello, facilitar la muerte.

En nuestro trabajo observamos que la cafeína incrementó el efecto de hiperlocomoción inducido por metanfetamina, tanto en un esquema de administración agudo como repetido. Este efecto se ha atribuido a la estimulación motora provocada por cafeína que ha sido descrita previamente (Fisone et al., 2004) y que, puede deberse a que los receptores a adenosina, particularmente el A<sub>1</sub> y el A<sub>2A</sub> modulan la actividad de los receptores a dopamina. Los receptores A<sub>2A</sub> co-localizan y forman heterodímeros con los receptores a dopamina tipo D<sub>2</sub> mientras que los receptores A<sub>1</sub> forman heterodímeros con los receptores a dopamina de tipo D<sub>1</sub> (Fuxe et al., 2010). El complejo A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> se encuentra expresado en neuronas GABAérgicas espinosas medias del estriado, donde, la unión de adenosina reduce la afinidad de la dopamina al receptor D<sub>2</sub> (Ferre et al., 1991; Ferré et al., 1994). La cafeína, como antagonista de los receptores A<sub>2A</sub>, inhibe la inhibición que las neuronas GABAérgicas ejercen, resultando en una mayor activación de las neuronas dopaminérgicas (Malave & Broderick, 2014).

Este antagonismo, no solamente sucede a nivel de membrana plasmática, sino que, además, las cascadas de señalización también convergen. Por un lado, la activación del receptor A<sub>2A</sub> está acoplado a la proteína G<sub>oif</sub> que incrementa la actividad de la AC (Fredholm, 1977), mientras que el receptor D<sub>2</sub> está acoplado a la proteína G<sub>i</sub> resultando en una reducción de la AC (Stoof & Keibian, 1981). Esto se refleja en una regulación opuesta de los niveles de AMPc y la actividad de la PKA (Fisone et al., 2004).

Se considera que esta interacción es responsable de los efectos en la actividad locomotora, sensibilización y efectos recompensantes de algunas drogas de abuso como cocaína y anfetaminas (Ballesteros-Yáñez et al., 2018).

A pesar de que el papel principal de los efectos conductuales observados con cafeína se atribuye principalmente al complejo A<sub>2A</sub>-D<sub>2</sub> (Hsu et al., 2009), también se ha demostrado que el complejo A<sub>1</sub>-D<sub>1</sub> participa en la estimulación

locomotora inducida por cafeína (Acevedo et al., 2016).

Además, el hecho de que hayamos observado una sensibilización cruzada sugiere que hay mecanismos similares entre la cafeína y la metanfetamina dentro del desarrollo de la sensibilización, lo cual se ha relacionado con mecanismos propios del desarrollo de dependencia modulados por la dopamina (Steketee & Kalivas, 2011).

También es importante resaltar que los efectos en el comportamiento de la cafeína dependen fundamentalmente de la dosis (Ferré, 2008, 2010). Por ejemplo, dosis bajas de cafeína (15-30 mg/kg) inducen hiperlocomoción, pero a dosis altas (60-120 mg/kg) este efecto se revierte (Marin et al., 2011), además, la cafeína incrementa la preferencia de lugar condicionada a dosis bajas, pero este efecto es opuesto a dosis altas por su efecto ansiogénico (Fredholm et al., 1999).

Por otro lado, los efectos obtenidos en este estudio pueden ser muy diferentes al trasladarlos a nivel clínico. En primer lugar, debido a la diferencia entre especies, y, en segundo lugar, las proporciones de cafeína y metanfetamina de las muestras que se encuentran en el mercado ilegal de drogas son muy variables lo cual nos puede llevar a presentar una variedad de efectos diferentes.

No obstante, este tipo de trabajos son una buena aproximación para estudiar mejor el fenómeno de adulteración de drogas y su estudio debe continuar.

## **7.2. Efectos de combinar xilacina con fentanilo**

Los estudios recientes han reportado un incremento significativo de muestras de opioides adulterados con xilacina, así como un incremento en reportes forenses donde se detectó tanto xilacina como opioides (Alexander et al., 2022; Kacinko et al., 2022). También se ha observado que la combinación de xilacina y fentanilo puede exacerbar algunos de los efectos tóxicos del fentanilo como la hipoxia cerebral en ratas (Choi et al., 2023). Estos datos sugieren que la presencia de xilacina podría representar un mayor riesgo en

la salud para los consumidores de opioides.

En este trabajo observamos que la xilacina incrementa significativamente la letalidad del fentanilo en ratones, lo que podría sugerir que las personas que consumen fentanilo combinado con xilacina, corren mayor riesgo de morir por sobredosis.

Adicionalmente, observamos que la yohimbina por sí sola es ineficaz para prevenir la letalidad y que, combinada con naloxona puede prevenir la muerte en un 70%. Sin embargo, una dosis alta de naloxona previene la muerte en un 100%.

También evaluamos los efectos de la xilacina sobre la antinocicepción, y observamos que la xilacina incrementa la antinocicepción del fentanilo. Mientras que la coordinación motora no se vio alterada.

A pesar de que se ha observado que la combinación de opioides y agonistas adrenérgicos pueden reducir la tolerancia inducida por los opioides (Root-Bernstein, 2022b), en nuestro trabajo observamos que la xilacina no modificó de manera significativa la tolerancia que induce el fentanilo. Esto puede ser un riesgo para los consumidores, debido a que puede conducir al consumo de mayores cantidades de sustancia con el fin de obtener los efectos deseados. Tomando en consideración los resultados de los experimentos de letalidad, se puede alcanzar niveles tóxicos más fácilmente.

De todas las conductas de abstinencia que evaluamos, solo el grupo que recibió el tratamiento combinado presentó diferencias en el acicalamiento, tanto en la frecuencia como en la duración de cada evento. Por otro lado, no se observaron diferencias significativas en las demás conductas, posiblemente debido a que, en la abstinencia por supresión, los signos aparecen gradualmente, lo cual dificulta la observación de algunos signos. Otro factor importante por considerar es que el fentanilo es una molécula ampliamente lipofílica, lo cual facilita su almacenamiento en el tejido, en estudios en humanos se ha detectado fentanilo incluso después de dos y hasta siete días después del consumo (Huhn et al., 2020).

En conjunto, los efectos observados en este trabajo sugieren que existe una

interacción sinérgica entre el sistema adrenérgico y el sistema opioide. Ambos sistemas interactúan de varias maneras: primeramente, ambos receptores están acoplados a la proteína Gi por lo que la señalización de ambos receptores puede converger en algún punto mediante segundos mensajeros. En segundo lugar, los receptores a opioides y adrenérgicos pueden formar heterodímeros y por último los agonistas adrenérgicos pueden unirse alostéricamente y modular la actividad de los receptores opioides, así como los agonistas opioides pueden modular alostéricamente a los receptores adrenérgicos. Este mecanismo ha sido descrito recientemente y sucede gracias a que la unión alostérica de agonistas adrenérgicos como la clonidina, puede evitar la fosforilación de los receptores  $\mu$ , evitando su internalización y prolongando así su señalización (Root-Bernstein, 2022b, 2022a). Aunque a la fecha no se ha determinado si la xilacina puede funcionar como modulador alostérico de los receptores a opioides, se ha descrito que la clonidina (otro agonista  $\alpha_2$ ) sí presenta afinidad (Root-Bernstein, 2022b), por lo que es razonable proponer que la xilacina actúa de manera similar.

## **8. CONCLUSIÓN**

En este trabajo observamos que dos adulterantes comunes aumentan los efectos de sustancias de abuso. Agregar sustancias farmacológicamente activas exacerba e incrementa efectos potencialmente dañinos para las personas que consumen drogas adulteradas, aunque el consumo sea agudo. Los efectos de consumir drogas de abuso adulteradas por periodos prolongados de tiempo aún no han sido ampliamente explorados, por lo que el estudio en este campo debe continuar.

Adicionalmente, elucidar los mecanismos y determinar la forma en la que estas sustancias interactúan es fundamental para entender los efectos preclínicos observados en este trabajo, así como describir el papel que tienen los adulterantes en el desarrollo de la adicción y buscar posibles tratamientos que prevengan los efectos adversos asociados a un consumo crónico.

## 9. PERSPECTIVAS

- Realizar experimentos con hembras para determinar si los efectos de ambas combinaciones descritos en este trabajo varían entre sexos, particularmente en las pruebas de letalidad.
- Determinar si ambas combinaciones resultan más recompensantes mediante una prueba de preferencia de lugar condicionado.
- Evaluar los efectos a largo plazo asociados a un consumo crónico de metanfetamina y cafeína:
  - Cambios en la modulación de la transmisión dopaminérgica por efectos de plasticidad.
  - Cambios en la sensibilización locomotora a largo plazo, modificando el periodo de exposición y el tiempo de abstinencia.
  - Neuroinflamación inducida por el consumo crónico.
- Determinar los mecanismos moleculares y celulares involucrados en la letalidad de cafeína y metanfetamina, definiendo el papel de cada receptor con ratones carentes de los receptores  $A_{2A}$  y  $A_1$ .
- Evaluar si la adenosina pudiera ser eficaz previniendo la letalidad usando una vía de administración diferente como vaporización, o a otra dosis.
- Determinar si la cafeína afecta otras etapas del abuso, como la recaída.
- Evaluar los efectos en la piel por un consumo crónico de fentanilo combinado con xilacina a nivel preclínico.
- Determinar si la xilacina modifica la tolerancia al fentanilo con un esquema de administración más extenso.
- Determinar la participación de los receptores adrenérgicos en la letalidad observada por la combinación de xilacina y fentanilo, mediante aproximaciones farmacológicas con otros antagonistas selectivos, o bien, moleculares con ratones carentes de receptores  $\alpha_2$ .
- Definir si la xilacina puede activar a los receptores a opioides por ensayos de radioligando.

- Evaluar los signos de abstinencia a fentanilo y xilacina por precipitación con naloxona.

## 10. REFERENCIAS

- Acevedo, J., Santana-Almansa, A., Matos-Vergara, N., Marrero-Cordero, L. R., Cabezas-Bou, E., & Díaz-Ríos, M. (2016). Caffeine stimulates locomotor activity in the mammalian spinal cord via adenosine A1 receptor-dopamine D1 receptor interaction and PKA-dependent mechanisms. *Neuropharmacology*, *101*.  
<https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2015.10.020>
- Aceves-Navarro, L. A., Rivera-Hernández, B., López-Castañeda, A., Palma-López, D. J., González-Mancillas, R., & Juárez-López, J. F. (2018). Áreas potenciales y vulnerabilidad del cultivo de café tipo robusta (*Coffea canephora* P.) al cambio climático en el estado de Tabasco, México. *Nova Scientia*, *10*(20).  
<https://doi.org/10.21640/ns.v10i20.1379>
- Alexander, R. S., Canver, B. R., Sue, K. L., & Morford, K. L. (2022). Xylazine and Overdoses: Trends, Concerns, and Recommendations. *American Journal of Public Health*, *112*(8), 1212–1216. <https://doi.org/10.2105/AJPH.2022.306881>
- Al-Hasani, R., & Bruchas, M. R. (2011). Molecular mechanisms of opioid receptor-dependent signaling and behavior. In *Anesthesiology* (Vol. 115, Issue 6).  
<https://doi.org/10.1097/ALN.0b013e318238bba6>
- Anglin, M. D., Burke, C., Perrochet, B., Stamper, E., & Dawud-Noursi, S. (2000). History of the methamphetamine problem. In *Journal of Psychoactive Drugs* (Vol. 32, Issue 2).  
<https://doi.org/10.1080/02791072.2000.10400221>
- Ball, N. S., Knable, B. M., Relich, T. A., Smathers, A. N., Gionfriddo, M. R., Nemecek, B. D., Montepara, C. A., Guarascio, A. J., Covvey, J. R., & Zimmerman, D. E. (2022). Xylazine poisoning: a systematic review. In *Clinical Toxicology* (Vol. 60, Issue 8, pp. 892–901). Taylor and Francis Ltd. <https://doi.org/10.1080/15563650.2022.2063135>
- Ballesteros-Yáñez, I., Castillo, C. A., Merighi, S., & Gessi, S. (2018). The role of adenosine receptors in psychostimulant addiction. In *Frontiers in Pharmacology* (Vol. 8, Issue JAN). <https://doi.org/10.3389/fphar.2017.00985>
- Basheer, R., Strecker, R. E., Thakkar, M. M., & McCarley, R. W. (2004). Adenosine and sleep-wake regulation. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 73, Issue 6).  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2004.06.004>
- Behrman, A. D. (2008). Luck of the Draw: Common Adulterants Found in Illicit Drugs. *Journal of Emergency Nursing*, *34*(1). <https://doi.org/10.1016/j.jen.2007.10.001>
- Bowles, J. M., McDonald, K., Maghsoudi, N., Thompson, H., Stefan, C., Beriault, D. R., Delaney, S., Wong, E., & Werb, D. (2021). Xylazine detected in unregulated opioids and drug administration equipment in Toronto, Canada: clinical and social implications. *Harm Reduction Journal*, *18*(1). <https://doi.org/10.1186/s12954-021-00546-9>
- Brown, J. K., & Malone, M. H. (1976). Status of drug quality in the Street-drug market-an update. *Clinical Toxicology*, *9*(2). <https://doi.org/10.3109/15563657608988120>
- Bylund, D. B. (2007). Alpha-2 Adrenoceptors. *XPharm: The Comprehensive Pharmacology Reference*, 1–9. <https://doi.org/10.1016/B978-008055232-3.60195-3>
- Cadet, J. L., & Krasnova, I. N. (2009). Molecular Bases of Methamphetamine-Induced Neurodegeneration. In *International Review of Neurobiology* (Vol. 88, Issue C).  
[https://doi.org/10.1016/S0074-7742\(09\)88005-7](https://doi.org/10.1016/S0074-7742(09)88005-7)

- Cappelletti, S., Daria, P., Sani, G., & Aromatario, M. (2014). Caffeine: Cognitive and Physical Performance Enhancer or Psychoactive Drug? *Current Neuropharmacology*, 13(1). <https://doi.org/10.2174/1570159x13666141210215655>
- Choi, S., Irwin, M. R., & Kiyatkin, E. A. (2023). Xylazine effects on opioid-induced brain hypoxia. *Psychopharmacology*, 240(7). <https://doi.org/10.1007/s00213-023-06390-y>
- Cockerill, S. L., & Mitcheson, J. S. (2006). Direct block of human ether-a-go-go-related gene potassium channels by caffeine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 316(2). <https://doi.org/10.1124/jpet.105.094755>
- Cole, C., Jones, L., McVeigh, J., Kicman, A., Syed, Q., & Bellis, M. (2011). Adulterants in illicit drugs: A review of empirical evidence. In *Drug Testing and Analysis* (Vol. 3, Issue 2). <https://doi.org/10.1002/dta.220>
- Cole, C., Jones, L., Mcveigh, J., Kicman, A., Syed, Q., & Bellis, M. a. (2010). CUT. A guide to adulterants, bulking agents and other contaminants found in illicit drugs. In *Center for Public Heath, Faculty of Health and Applied Sciences, Liverpool*.
- Comer, S. D., & Cahill, C. M. (2019). Fentanyl: Receptor pharmacology, abuse potential, and implications for treatment. In *Neuroscience and Biobehavioral Reviews* (Vol. 106). <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2018.12.005>
- Cruickshank, C. C., & Dyer, K. R. (2009). A review of the clinical pharmacology of methamphetamine. In *Addiction* (Vol. 104, Issue 7). <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2009.02564.x>
- Cruz, S. L., & Granados-Soto, V. (2015). Opioids and Opiates: Pharmacology, Abuse, and Addiction. In *Neuroscience in the 21st Century* (pp. 1–33). Springer New York. [https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6434-1\\_156-1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6434-1_156-1)
- Dea. (n.d.). *Fentanyl: A Briefing Guide for First Responders*.
- Dea. (2016). *DEA Intelligence BRIEF Counterfeit Prescription Pills Containing Fentanyls: A Global Threat*.
- di Trana, A., & Montanari, E. (2022). Adulterants in drugs of abuse: a recent focus of a changing phenomenon. *Clinica Terapeutica*, 173(1). <https://doi.org/10.7417/CT.2022.2392>
- Diversion Control Division, D. (2021). *Xylazine*.
- Ehrman-Dupre, R., Kaigh, C., Salzman, M., Haroz, R., Peterson, L.-K., & Schmidt, R. (2022). *Management of Xylazine Withdrawal in a Hospitalized Patient: A Case Report*. <https://doi.org/10.1097/ADM.0000000000000955>
- Endo, M. (1977). Calcium release from the sarcoplasmic reticulum. *Physiological Reviews*, 57(1). <https://doi.org/10.1152/physrev.1977.57.1.71>
- Ferré, S. (2008). An update on the mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine. In *Journal of Neurochemistry* (Vol. 105, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2007.05196.x>
- Ferré, S. (2010). Role of the central ascending neurotransmitter systems in the psychostimulant effects of caffeine. *Journal of Alzheimer's Disease*, 20(SUPPL.1). <https://doi.org/10.3233/JAD-2010-1400>
- Ferré, S. (2016). Mechanisms of the psychostimulant effects of caffeine: implications for substance use disorders. In *Psychopharmacology* (Vol. 233, Issue 10). <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4212-2>
- Ferré, S., O'Connor, W. T., Snaprud, P., Ungerstedt, U., & Fuxe, K. (1994). Antagonistic interaction between adenosine A2A receptors and dopamine D2 receptors in the ventral striopallidal system. Implications for the treatment of schizophrenia. *Neuroscience*, 63(3). [https://doi.org/10.1016/0306-4522\(94\)90521-5](https://doi.org/10.1016/0306-4522(94)90521-5)
- Ferre, S., Von Euler, G., Johansson, B., Fredholm, B. B., & Fuxe, K. (1991). Stimulation of high-affinity adenosine A2 receptors decreases the affinity of dopamine D2 receptors in rat striatal membranes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United*

- States of America*, 88(16). <https://doi.org/10.1073/pnas.88.16.7238>
- Fisone, G., Borgkvist, A., & Usiello, A. (2004). Caffeine as a psychomotor stimulant: Mechanism of action. In *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 61, Issues 7–8). <https://doi.org/10.1007/s00018-003-3269-3>
- Fredholm, B. B. (1977). Activation of adenylate cyclase from rat striatum and tuberculum olfactorium by adenosine. *Medical Biology*, 55(5).
- Fredholm, B. B. (2010). Adenosine receptors as drug targets. In *Experimental Cell Research* (Vol. 316, Issue 8). <https://doi.org/10.1016/j.yexcr.2010.02.004>
- Fredholm, B. B., Bättig, K., Holmén, J., Nehlig, A., & Zvartau, E. E. (1999). Actions of caffeine in the brain with special reference to factors that contribute to its widespread use. In *Pharmacological Reviews* (Vol. 51, Issue 1).
- Fuxe, K., Marcellino, D., Borroto-Escuela, D. O., Guescini, M., Fernández-Dueñas, V., Tanganelli, S., Rivera, A., Ciruela, F., & Agnati, L. F. (2010). Adenosine-dopamine interactions in the pathophysiology and treatment of CNS disorders. In *CNS Neuroscience and Therapeutics* (Vol. 16, Issue 3). <https://doi.org/10.1111/j.1755-5949.2009.00126.x>
- GARCIA- VILLAR, R., TOUTAIN, P. L., ALVINERIE, M., & RUCKEBUSCH, Y. (1981). The pharmacokinetics of xylazine hydrochloride: an interspecific study. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 4(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1981.tb00715.x>
- Gertler, R., Brown, H. C., Mitchell, D. H., & Silvius, E. N. (2001). Dexmedetomidine: A Novel Sedative-Analgesic Agent. *Baylor University Medical Center Proceedings*, 14(1). <https://doi.org/10.1080/08998280.2001.11927725>
- GLOBAL OVERVIEW DRUG DEMAND DRUG SUPPLY. (n.d.). [www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html](http://www.unodc.org/unodc/en/data-and-analysis/world-drug-report-2022.html)
- Greene, S. A., & Thurmon, J. C. (1988). Xylazine – a review of its pharmacology and use in veterinary medicine. In *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics* (Vol. 11, Issue 4). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.1988.tb00189.x>
- Harris, D. S., Boxenbaum, H., Everhart, E. T., Sequeira, G., Mendelson, J. E., & Jones, R. T. (2003). The bioavailability of intranasal and smoked methamphetamine. *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 74(5). <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2003.08.002>
- Hoffmann, U., Meister, C. M., Golle, K., & Zschiesche, M. (2001). Severe intoxication with the veterinary tranquilizer xylazine in humans. *Journal of Analytical Toxicology*, 25(4). <https://doi.org/10.1093/jat/25.4.245>
- Hsu, C. W., Chen, C. Y., Wang, C. S., & Chiu, T. H. (2009). Caffeine and a selective adenosine A2A receptor antagonist induce reward and sensitization behavior associated with increased phospho-Thr75-DARPP-32 in mice. *Psychopharmacology*, 204(2). <https://doi.org/10.1007/s00213-009-1461-3>
- Huang, Z. L., Qu, W. M., Eguchi, N., Chen, J. F., Schwarzschild, M. A., Fredholm, B. B., Urade, Y., & Hayaishi, O. (2005). Adenosine A2A, but not A1, receptors mediate the arousal effect of caffeine. *Nature Neuroscience*, 8(7). <https://doi.org/10.1038/nn1491>
- Huhn, A. S., Hobelmann, J. G., Oyler, G. A., & Strain, E. C. (2020). Protracted renal clearance of fentanyl in persons with opioid use disorder. *Drug and Alcohol Dependence*, 214. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2020.108147>
- Inturrisi, C. E., & Jamison, R. N. (2002). Clinical pharmacology of opioids for pain. *Clinical Journal of Pain*, 18(4 SUPPL.). <https://doi.org/10.1097/00002508-200207001-00002>
- Janssen, C. F., Maiello, P., Wright, M. J., Kracinovsky, K. B., & Newsome, J. T. (2017). Comparison of Atipamezole with Yohimbine for Antagonism of Xylazine in mice anesthetized with Ketamine & Xylazine. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 56(2).
- Johnson, J., Pizzicato, L., Johnson, C., & Viner, K. (2021). Increasing presence of xylazine in

- heroin and/or fentanyl deaths, Philadelphia, Pennsylvania, 2010-2019. *Injury Prevention*, 27(4). <https://doi.org/10.1136/injuryprev-2020-043968>
- Kacinko, S. L., Mohr, A. L. A., Logan, B. K., & Barbieri, E. J. (2022). Xylazine: Pharmacology Review and Prevalence and Drug Combinations in Forensic Toxicology Casework. *Journal of Analytical Toxicology*, 46(8). <https://doi.org/10.1093/jat/bkac049>
- Kevil, C. G., Goeders, N. E., Woolard, M. D., Bhuiyan, M. S., Dominic, P., Kolluru, G. K., Arnold, C. L., Traylor, J. G., & Orr, A. W. (2019). Methamphetamine Use and Cardiovascular Disease: in search of answers. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 39(9).
- King, L. A. (1997). Drug content of powders and other illicit preparations in the UK. *Forensic Science International*, 85(2). [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(96\)02089-0](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(96)02089-0)
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2016). Neurobiology of addiction: a neurocircuitry analysis. In *The Lancet Psychiatry* (Vol. 3, Issue 8). [https://doi.org/10.1016/S2215-0366\(16\)00104-8](https://doi.org/10.1016/S2215-0366(16)00104-8)
- Korn, W. R., Stone, M. D., Haviland, K. L., Toohey, J. M., & Stickle, D. F. (2021). High prevalence of xylazine among fentanyl screen-positive urines from hospitalized patients, Philadelphia, 2021. *Clinica Chimica Acta*, 521. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2021.07.010>
- Krongvorakul, J., Auparakkitanon, S., Trakulsrichai, S., Sanguanwit, P., Sueajai, J., Noumjad, N., & Wananukul, W. (2018). Use of Xylazine in Drug-Facilitated Crimes. *Journal of Forensic Sciences*, 63(4). <https://doi.org/10.1111/1556-4029.13684>
- Kull, B., Svenningsson, P., & Fredholm, B. B. (2000). Adenosine A(2A) receptors are colocalized with and activate G(olf) in rat striatum. *Molecular Pharmacology*, 58(4). <https://doi.org/10.1124/mol.58.4.771>
- Lambrechts, M., Tönnesen, F., & Rasmussen, K. E. (1986). Profiling of impurities in illicit amphetamine samples by high-performance liquid chromatography using column switching. *Journal of Chromatography A*, 369(C). [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(00\)90143-2](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(00)90143-2)
- Li, L., Everhart, T., Jacob, P., Jones, R., & Mendelson, J. (2010). Stereoselectivity in the human metabolism of methamphetamine. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 69(2). <https://doi.org/10.1111/j.1365-2125.2009.03576.x>
- Liguori, A., Hughes, J. R., & Grass, J. A. (1997). Absorption and subjective effects of caffeine from coffee, cola and capsules. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 58(3). [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(97\)00003-8](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(97)00003-8)
- López-Hill, X., Prieto, J. P., Meikle, M. N., Urbanavicius, J., Abin-Carriquiry, J. A., Prunell, G., Umpiérrez, E., & Scorza, M. C. (2011). Coca-paste seized samples characterization: Chemical analysis, stimulating effect in rats and relevance of caffeine as a major adulterant. *Behavioural Brain Research*, 221(1). <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2011.03.005>
- Macmadu, A., Carroll, J. J., Hadland, S. E., Green, T. C., & Marshall, B. D. L. (2017). Prevalence and correlates of fentanyl-contaminated heroin exposure among young adults who use prescription opioids non-medically. *Addictive Behaviors*, 68. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2017.01.014>
- Malave, L. B., & Broderick, P. A. (2014). Caffeine's Attenuation of Cocaine-Induced Dopamine Release by Inhibition of Adenosine. *Journal of Caffeine Research*, 4(2). <https://doi.org/10.1089/jcr.2014.0004>
- Marin, M. T., Zancheta, R., Paro, A. H., Possi, A. P. M., Cruz, F. C., & Planeta, C. S. (2011). Comparison of caffeine-induced locomotor activity between adolescent and adult rats. *European Journal of Pharmacology*, 660(2–3). <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.03.052>
- Mather, L. E. (1983). Clinical Pharmacokinetics of Fentanyl and its Newer Derivatives. In

- Clinical Pharmacokinetics* (Vol. 8, Issue 5). <https://doi.org/10.2165/00003088-198308050-00004>
- McKetin, R., McLaren, J., Lubman, D. I., & Hides, L. (2006). The prevalence of psychotic symptoms among methamphetamine users. *Addiction, 101*(10). <https://doi.org/10.1111/j.1360-0443.2006.01496.x>
- Mendelson, J., Uemura, N., Harris, D., Nath, R. P., Fernandez, E., Jacob, P., Everhart, E. T., & Jones, R. T. (2006). Human pharmacology of the methamphetamine stereoisomers. *Clinical Pharmacology and Therapeutics, 80*(4). <https://doi.org/10.1016/j.clpt.2006.06.013>
- Meyer, G. M. J., & Maurer, H. H. (2013). Qualitative metabolism assessment and toxicological detection of xylazine, a veterinary tranquilizer and drug of abuse, in rat and human urine using GC-MS, LC-MS n, and LC-HR-MS n. *Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405*(30). <https://doi.org/10.1007/s00216-013-7419-7>
- Meyer, J. S. (2013). Psychopharmacology: Drugs, the Brain, and Behavior. *Psychopharmacology Second Edition, September*.
- Minutillo, A., Palmi, I., & Mastrobattista, L. (2019). The health threat of drugs of abuse adulteration by new psychoactive substances. *Clinica Terapeutica, 170*(6). <https://doi.org/10.7417/CT.2019.2170>
- Mitchell, D. C., Knight, C. A., Hockenberry, J., Teplansky, R., & Hartman, T. J. (2014). Beverage caffeine intakes in the U.S. *Food and Chemical Toxicology, 63*, 136–142. <https://doi.org/10.1016/J.FCT.2013.10.042>
- Moratalla, R., Khairnar, A., Simola, N., Granado, N., García-Montes, J. R., Porceddu, P. F., Tizabi, Y., Costa, G., & Morelli, M. (2017). Amphetamine-related drugs neurotoxicity in humans and in experimental animals: Main mechanisms. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 155). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2015.09.011>
- Moss, R. B., McCabe Pryor, M., Baillie, R., Kudrycki, K., Friedrich, C., Reed, M., & Carlo, D. J. (2020). Higher naloxone dosing in a quantitative systems pharmacology model that predicts naloxone-fentanyl competition at the opioid mu receptor level. *PLoS ONE, 15*(6). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234683>
- Moszczynska, A., & Callan, S. P. (2017). Molecular, behavioral, and physiological consequences of methamphetamine neurotoxicity: Implications for treatment. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 362*(3). <https://doi.org/10.1124/jpet.116.238501>
- Muñiz, J. A., Prieto, J. P., González, B., Sosa, M. H., Cadet, J. L., Scorza, C., Urbano, F. J., & Bisagno, V. (2017). Cocaine and caffeine effects on the conditioned place preference test: Concomitant changes on early genes within the mouse prefrontal cortex and nucleus accumbens. *Frontiers in Behavioral Neuroscience, 11*. <https://doi.org/10.3389/fnbeh.2017.00200>
- Nunez, J., DeJoseph, M. E., & Gill, J. R. (2021). Xylazine, a Veterinary Tranquilizer, Detected in 42 Accidental Fentanyl Intoxication Deaths. *The American Journal of Forensic Medicine and Pathology, 42*(1). <https://doi.org/10.1097/PAF.0000000000000622>
- Onoka, I., Banyika, A. T., Banerjee, P. N., Makangara, J. J., & Dujourdy, L. (2020). A review of the newly identified impurity profiles in methamphetamine seizures. *Forensic Science International: Synergy, 2*, 194–205. <https://doi.org/10.1016/J.FSISYN.2020.06.004>
- Perez-Reyes, M., White, W. R., McDonald, S. A., Hicks, R. E., Jeffcoat, A. R., Hill, J. M., & Cook, C. E. (1991). Clinical effects of daily methamphetamine administration. *Clinical Neuropharmacology, 14*(4). <https://doi.org/10.1097/00002826-199108000-00007>
- Pierce, M., van Amsterdam, J., Kalkman, G. A., Schellekens, A., & van den Brink, W. (2021). Is Europe facing an opioid crisis like the United States? An analysis of opioid

- use and related adverse effects in 19 European countries between 2010 and 2018. *European Psychiatry*, 64(1). <https://doi.org/10.1192/j.eurpsy.2021.2219>
- Preti, D., Baraldi, P. G., Moorman, A. R., Borea, P. A., & Varani, K. (2015). History and Perspectives of A2A Adenosine Receptor Antagonists as Potential Therapeutic Agents. *Medicinal Research Reviews*, 35(4). <https://doi.org/10.1002/med.21344>
- 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. *American Journal on Addictions*, 24(5). <https://doi.org/10.1111/ajad.12245>
- Prieto, J. P., Scorza, C., Serra, G. pietro, Perra, V., Galvalisi, M., Abin-Carriquiry, J. A., Piras, G., & Valentini, V. (2016). Caffeine, a common active adulterant of cocaine, enhances the reinforcing effect of cocaine and its motivational value. *Psychopharmacology*, 233(15–16). <https://doi.org/10.1007/s00213-016-4320-z>
- Reith, M. E. A., & Gnegy, M. E. (2020). Molecular mechanisms of amphetamines. In *Handbook of Experimental Pharmacology* (Vol. 258, pp. 265–297). Springer. [https://doi.org/10.1007/164\\_2019\\_251](https://doi.org/10.1007/164_2019_251)
- Rodríguez, N., Vargas Vidot, J., Panelli, J., Colón, H., Ritchie, B., & Yamamura, Y. (2008). GC–MS confirmation of xylazine (Rompun), a veterinary sedative, in exchanged needles. *Drug and Alcohol Dependence*, 96(3), 290–293. <https://doi.org/10.1016/J.DRUGALCDEP.2008.03.005>
- Root-Bernstein, R. (2022a). Adrenergic agonists and antagonists enhance opioid receptor activity. In *The Neurobiology, Physiology, and Psychology of Pain*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-820589-1.00008-7>
- Root-Bernstein, R. (2022b). Biased, Bitopic, Opioid–Adrenergic Tethered Compounds May Improve Specificity, Lower Dosage and Enhance Agonist or Antagonist Function with Reduced Risk of Tolerance and Addiction. In *Pharmaceuticals* (Vol. 15, Issue 2). <https://doi.org/10.3390/ph15020214>
- Ruiz-Colón, K., Chavez-Arias, C., Díaz-Alcalá, J. E., & Martínez, M. A. (2014). Xylazine intoxication in humans and its importance as an emerging adulterant in abused drugs: A comprehensive review of the literature. In *Forensic Science International* (Vol. 240). <https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2014.03.015>
- Sawyer, D. A., Julia, H. L., & Turin, A. C. (1982). Caffeine and human behavior: Arousal, anxiety, and performance effects. *Journal of Behavioral Medicine*, 5(4). <https://doi.org/10.1007/BF00845371>
- Schep, L. J., Slaughter, R. J., & Beasley, D. M. G. (2010). The clinical toxicology of metamfetamine. In *Clinical Toxicology* (Vol. 48, Issue 7). <https://doi.org/10.3109/15563650.2010.516752>
- Scorza, C., Prieto, J. P., & Fabius, S. (2022). Caffeine as an Active Adulterant: Implication for Drugs of Abuse Consumption. In *Handbook of Substance Misuse and Addictions*. [https://doi.org/10.1007/978-3-030-67928-6\\_82-1](https://doi.org/10.1007/978-3-030-67928-6_82-1)
- Scorza, C., Prieto, J. P., Fabius, S., & Galvalisi, M. (2023). Pulmonary Inhalation to Assess Effects of Coca Paste on Behavior and Dopamine Neurotransmission. In *Neuromethods* (Vol. 193). [https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2799-0\\_7](https://doi.org/10.1007/978-1-0716-2799-0_7)
- Shen, H.-Y., & Chen, J.-F. (2009). Adenosine A2A Receptors in Psychopharmacology: Modulators of Behavior, Mood and Cognition. *Current Neuropharmacology*, 7(3). <https://doi.org/10.2174/157015909789152191>
- Sinchai, T., Plasen, S., Sanvarinda, Y., Jaisin, Y., Govitrapong, P., Morales, N. P., Ratanachamnong, P., & Plasen, D. (2011). Caffeine potentiates methamphetamine-induced toxicity both in vitro and in vivo. *Neuroscience Letters*, 502(1). <https://doi.org/10.1016/j.neulet.2011.07.026>
- Siuda, E. R., Carr, R., Rominger, D. H., & Violin, J. D. (2017). Biased mu-opioid receptor

- ligands: a promising new generation of pain therapeutics. In *Current Opinion in Pharmacology* (Vol. 32). <https://doi.org/10.1016/j.coph.2016.11.007>
- Stanley, T. H. (1992). The history and development of the fentanyl series. *Journal of Pain and Symptom Management*, 7(3), S3–S7. [https://doi.org/10.1016/0885-3924\(92\)90047-L](https://doi.org/10.1016/0885-3924(92)90047-L)
- Steketee, J. D., & Kalivas, P. W. (2011). Drug wanting: Behavioral sensitization and relapse to drug-seeking behavior. *Pharmacological Reviews*, 63(2). <https://doi.org/10.1124/pr.109.001933>
- Stillwell, M. E. (2003). A reported case involving impaired driving following self-administration of xylazine. *Forensic Science International*, 134(1), 25–28. [https://doi.org/10.1016/S0379-0738\(03\)00083-5](https://doi.org/10.1016/S0379-0738(03)00083-5)
- Stoof, J. C., & Keabian, J. W. (1981). Opposing roles for D-1 and D-2 dopamine receptors in efflux of cyclic AMP from rat neostriatum. *Nature*, 294(5839). <https://doi.org/10.1038/294366a0>
- Sulzer, D., Sonders, M. S., Poulsen, N. W., & Galli, A. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines: A review. In *Progress in Neurobiology* (Vol. 75, Issue 6). <https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2005.04.003>
- Thorn, C. F., Aklillu, E., McDonagh, E. M., Klein, T. E., & Altman, R. B. (2012). PharmGKB summary: Caffeine pathway. *Pharmacogenetics and Genomics*, 22(5). <https://doi.org/10.1097/FPC.0b013e3283505d5e>
- Umemura, T., Ueda, K., Nishioka, K., Hidaka, T., Takemoto, H., Nakamura, S., Jitsuiki, D., Soga, J., Goto, C., Chayama, K., Yoshizumi, M., & Higashi, Y. (2006). Effects of Acute Administration of Caffeine on Vascular Function. *American Journal of Cardiology*, 98(11). <https://doi.org/10.1016/j.amjcard.2006.06.058>
- UNITED NATIONS: OFFICE ON DRUGS AND CRIME. (2023). *WORLD DRUG REPORT 2023*. UNITED NATIONS.
- Urrutia, F. (n.d.). *Luis Almagro Secretary General Organization of American States OAS Cataloging-in-Publication Data*.
- Vanattou-Saïfoudine, N., McNamara, R., & Harkin, A. (2012). Caffeine provokes adverse interactions with 3,4- methylenedioxymethamphetamine (MDMA, 'ecstasy') and related psychostimulants: Mechanisms and mediators. In *British Journal of Pharmacology* (Vol. 167, Issue 5). <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2012.02065.x>
- Veilleux-Lemieux, D., Castel, A., Carrier, D., Beaudry, F., & Vachon, P. (2013). Pharmacokinetics of ketamine and xylazine in young and old Sprague-Dawley rats. *Journal of the American Association for Laboratory Animal Science*, 52(5).
- Volpe, D. A., Tobin, G. A. M. M., Mellon, R. D., Katki, A. G., Parker, R. J., Colatsky, T., Kropp, T. J., & Verbois, S. L. (2011). Uniform assessment and ranking of opioid Mu receptor binding constants for selected opioid drugs. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 59(3). <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2010.12.007>
- Wang, X., Loram, L. C., Ramos, K., De Jesus, A. J., Thomas, J., Cheng, K., Reddy, A., Somogyi, A. A., Hutchinson, M. R., Watkins, L. R., & Yin, H. (2012). Morphine activates neuroinflammation in a manner parallel to endotoxin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(16). <https://doi.org/10.1073/pnas.1200130109>
- Wearne, T. A., & Cornish, J. L. (2018). A comparison of methamphetamine-induced psychosis and schizophrenia: A review of positive, negative, and cognitive symptomatology. In *Frontiers in Psychiatry* (Vol. 9, Issue OCT). <https://doi.org/10.3389/fpsy.2018.00491>
- Willson, C. (2018). The clinical toxicology of caffeine: A review and case study. In *Toxicology Reports* (Vol. 5). <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.11.002>
- Wong, S. C., Curtis, J. A., & Wingert, W. E. (2008). Concurrent detection of heroin, fentanyl,

- and xylazine in seven drug-related deaths reported from the Philadelphia Medical Examiner's Office. *Journal of Forensic Sciences*, 53(2). <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2007.00648.x>
- Yang, X., Wang, Y., Li, Q., Zhong, Y., Chen, L., Du, Y., He, J., Liao, L., Xiong, K., Yi, C. X., & Yan, J. (2018). The main molecular mechanisms underlying methamphetamine-induced neurotoxicity and implications for pharmacological treatment. In *Frontiers in Molecular Neuroscience* (Vol. 11). <https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00186>
- Yu, L., Coelho, J. E., Zhang, X., Fu, Y., Tillman, A., Karaoz, U., Fredholm, B. B., Weng, Z., & Chen, J. F. (2009). Uncovering multiple molecular targets for caffeine using a drug target validation strategy combining A2A receptor knockout mice with microarray profiling. *Physiological Genomics*, 37(3). <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.90353.2008>
- Zweben, J. E., Cohen, J. B., Christian, D., Galloway, G. P., Salinardi, M., Parent, D., & Iguchi, M. (2004). Psychiatric Symptoms in Methamphetamine Users. *American Journal on Addictions*, 13(2). <https://doi.org/10.1080/10550490490436055>