



FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

TRABAJO FIN DE GRADO:

**INMUNOTERAPIA EN TRASTORNOS
DERIVADOS DEL CONSUMO DE COCAÍNA**

Autor: Inés Báscones García

Fecha: Junio 2019

Tutor: Profa. Dra. Estefanía Hernandez Benito

Índice:

Resumen.....	2
Palabras clave.....	2
Objetivo.....	2
Metodología.....	2
Introducción.....	3
Resultados y discusión.....	4
Cocaína – KLH.....	4
GNC – KLH.....	6
GND – KLH.....	7
SNC – BSA.....	8
TA – CD.....	9
Ensayos preclínicos.....	9
Fase I.....	10
Fase IIa.....	10
Fase IIb.....	12
Fase III.....	14
Vacunas con adenovirus.....	16
dAd5GNC.....	16
dAd5GNE.....	16
Conclusiones.....	17
Bibliografía.....	18

Resumen:

La cocaína es una sustancia actualmente utilizada como droga de abuso, generando adicción y problemas físicos, psicológicos y sociales. Actualmente no hay un tratamiento específico ni efectivo para su adicción, y esto ha motivado la investigación sobre nuevas terapias como es la inmunización activa.

El objetivo de esta revisión bibliográfica es repasar los últimos avances en vacunación frente a la adicción a cocaína. Para ello se ha llevado a cabo una búsqueda bibliográfica de la información disponible hasta el momento sobre este tipo de inmunoterapia.

El desarrollo de vacunas anti-cocaína comenzó en 1992 utilizando la cocaína como hapteno y la proteína KLH como transportador. Tras este primer intento de vacuna, se intentó mejorar el hapteno generando moléculas derivadas de la cocaína. Primero surgió el hapteno GNC, después GND y posteriormente SNC. Se probó este último hapteno conjugándolo a la proteína BSA, y después a un derivado de la toxina colérica (rCTB). La combinación SNC – rCTB se nombró como vacuna TA-CD y llegó a ensayarse sobre humanos en fase III, aunque los resultados no fueron del todo satisfactorios. La última propuesta sobre este tipo de vacunas ha consistido en utilizar como proteína transportadora una fracción de adenovirus, y los primeros experimentos han indicado que los títulos de anticuerpos son superiores a los obtenidos con vacunas anteriores.

Como conclusión, pese a todos los avances conseguidos en las dos últimas décadas en el ámbito de la vacunación frente a drogas de abuso, y en este caso concretamente frente a la cocaína, hace falta seguir investigando para poder, en un futuro, aplicar estos tratamientos en seres humanos.

Palabras clave: Cocaína, droga de abuso, adicción, vacuna, inmunoterapia, TA-CD, hapteno

Objetivo:

El objetivo de este trabajo es realizar una revisión bibliográfica actualizada sobre los avances en inmunoterapia frente a la adicción a la cocaína, concretamente la inmunización activa.

Metodología:

Se ha llevado a cabo una revisión cronológica desde los primeros ensayos con las primeras vacunas hasta los últimos avances en este campo de la investigación, analizando las sucesivas modificaciones que proponían los investigadores con la finalidad de obtener una vacuna efectiva y apta para su aplicación en humanos.

Se ha hecho una búsqueda bibliográfica de diferentes artículos en las principales bases de datos de ámbito científico como PubMed, Google Scholar, ClinicalTrials.gov, así como búsqueda de información en libros disponibles en la biblioteca online de la Universidad Complutense de Madrid. En las búsquedas se utilizaron palabras clave como: “drug abuse immunotherapy”, “cocaine vaccine”, “cocaine immunization”.

Se procedió a la lectura completa de todos los artículos y textos y a la posterior organización y redacción de las ideas más importantes para este trabajo.

Introducción:

La cocaína es un alcaloide presente en las hojas de *Eythroxylum coca*. Originalmente se utilizaba en el ámbito de la medicina como anestésico local y vasoconstrictor, aunque ya no se utiliza con dichos fines y es considerada una droga de abuso. (28)

La cocaína se considera una amina simpaticomimética de acción indirecta. Impide la recaptación presináptica de la serotonina y catecolaminas (fundamentalmente dopamina), produciendo un aumento de estas en el espacio sináptico y generando un aumento de la actividad simpática que tiene repercusiones en el sistema nervioso central y el aparato cardiovascular (**Figura 1**) (28, 31). Se metaboliza rápidamente en el organismo dando lugar principalmente a metabolitos inactivos como la benzoilecgonina, detectable en orina hasta 4 días después del consumo (29).

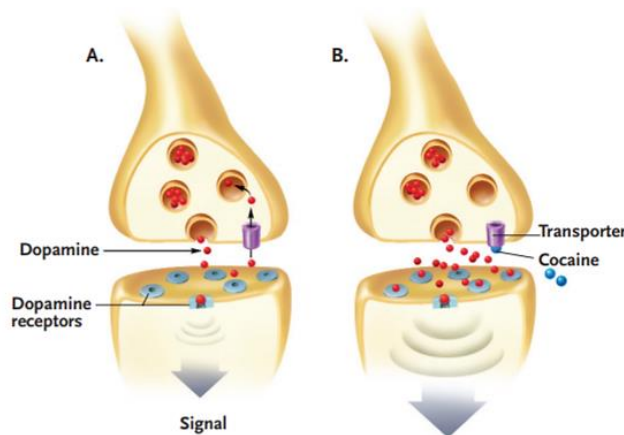


Figura 1: Mecanismo de acción de la cocaína sobre la dopamina. La cocaína bloquea el transportador presináptico de dopamina, impidiendo que ésta desaparezca del espacio sináptico y aumentando su actividad. Disponible en: Fowler, J. S. (2007).

El consumo de cocaína produce un aumento de la energía, del estado de alerta y de la actividad psicomotora, y disminuye el sueño. Pero también produce nerviosismo, euforia, insomnio, temblor, y en ocasiones delirio, pánico e incluso psicosis. Además a nivel periférico puede dar lugar a problemas cardíacos como infarto de miocardio e incluso muerte súbita, derivados de la taquicardia, vasoconstricción e hipertensión que produce. Por otra parte, el consumo de la cocaína por vía parenteral lleva asociado el riesgo de contagio de enfermedades graves como son el VIH, hepatitis B y C. (30)

Las drogas de abuso como la cocaína causan problemas físicos, psicológicos y sociales. El tratamiento actual para conseguir la deshabituación a la cocaína consiste en tratamiento farmacológico combinado con terapias conductuales (27). Sin embargo no existen fármacos específicos para este tratamiento, se utilizan antidepresivos, antiepilépticos, agonistas dopaminérgicos, y la terapia no suele ser efectiva (32).

Esta falta de tratamientos efectivos frente a la adicción a la cocaína es la que ha motivado el desarrollo de nuevas terapias. La inmunoterapia, tanto pasiva como activa, tiene un gran potencial para el tratamiento y prevención del consumo, ya no sólo de cocaína, sino también de otras sustancias como metanfetaminas o nicotina. En lo que a cocaína se refiere, se han investigado diversas opciones basándose en esta idea:

-Vacunas de anticuerpos catalíticos: Puesto que la cocaína se hidroliza a compuestos inactivos mediante reacciones enzimáticas, surgió la idea de generar anticuerpos catalíticos capaces de simular estas acciones. Para ello se sintetizaría un compuesto antigénico capaz de generar *in vivo* anticuerpos que favoreciesen la transformación de la cocaína en sus metabolitos inactivos (16).

-Vacunas anti-cocaína: En este caso lo que buscan los investigadores es generar una molécula antigénica que genere *in vivo* anticuerpos frente a la cocaína, capaces de captarla antes de que atraviese la barrera hematoencefálica e ingrese en el sistema nervioso central. De esta forma, se impide que ejerza sus efectos centrales (27).

-Anticuerpos monoclonales: Al igual que las vacunas anti-cocaína, se basan en impedir su entrada al sistema nervioso central, pero en este caso se administrarían los anticuerpos directamente al paciente, siendo por tanto una inmunización pasiva. Estarían más indicados en el tratamiento inmediato de la sobredosis (33).

-Enzimas metabolizadoras de cocaína: Esta terapia se basa en el uso de enzimas capaces de metabolizar la cocaína antes de que ejerza sus efectos en el sistema nervioso central. Su principal aplicación sería en los casos de sobredosis (35). En este caso no se trata de inmunoterapia, pero el tratamiento con vacunas anti-cocaína podría combinarse con este tipo de enzimas para potenciar los resultados (26).

En este trabajo nos centraremos en el desarrollo de las **vacunas anti-cocaína**, desde su origen hasta la actualidad, ya que es el tipo de inmunoterapia frente a la cocaína en el que más se han centrado las investigaciones y por tanto es el que más se ha desarrollado hasta el momento.

Resultados y discusión:

Cocaína – KLH:

Los primeros experimentos de vacunación frente a la cocaína comenzaron en 1992, y su objetivo era prevenir la adicción.

Antes de pasar a describir los diferentes tipos de vacunas que se han sintetizado con objeto de intentar abordar de forma efectiva la adicción a la cocaína, es importante destacar que ésta presenta una estructura tal que actúa como hapteno, es decir, una molécula que por sí misma no es capaz de estimular la respuesta inmunitaria, a no ser que esté unida covalentemente a una proteína transportadora que le aporte esa capacidad inmunogénica (16). Esto es debido por una parte a su pequeño tamaño, y por otra a que es rápidamente metabolizada por esterases y permanece poco tiempo en sangre, lo que impide su reconocimiento por parte del sistema inmune (1).

Para conseguir estimular la respuesta inmunitaria, en la primera vacuna que se sintetizó, se conjugó la cocaína con la proteína KLH, que es la hemocianina de la lapa californiana (*Keyhole Limpet Hemocyanin*). Las hemocianinas tienen propiedades estimulantes y se han utilizado ampliamente como proteínas transportadoras (2).

El mecanismo de acción (**Figura 2**) de este tipo de vacunas consiste en que generan anticuerpos anti-cocaína, de tal forma que en caso de que el paciente consuma esta sustancia,

los anticuerpos se unirán a ella impidiendo su paso a través de la barrera hematoencefálica. Como consecuencia, no se producirán los efectos centrales buscados por el consumidor y éste dejará de consumir. Además estos anticuerpos tienen otra ventaja, y es que establecen rápidamente un equilibrio de unión y separación con las moléculas de cocaína en circulación. Actúan como *buffers*, amortiguando la entrada en bolo de la droga y evitando las consecuencias de la entrada de una alta dosis repentina de cocaína en el organismo. (27)

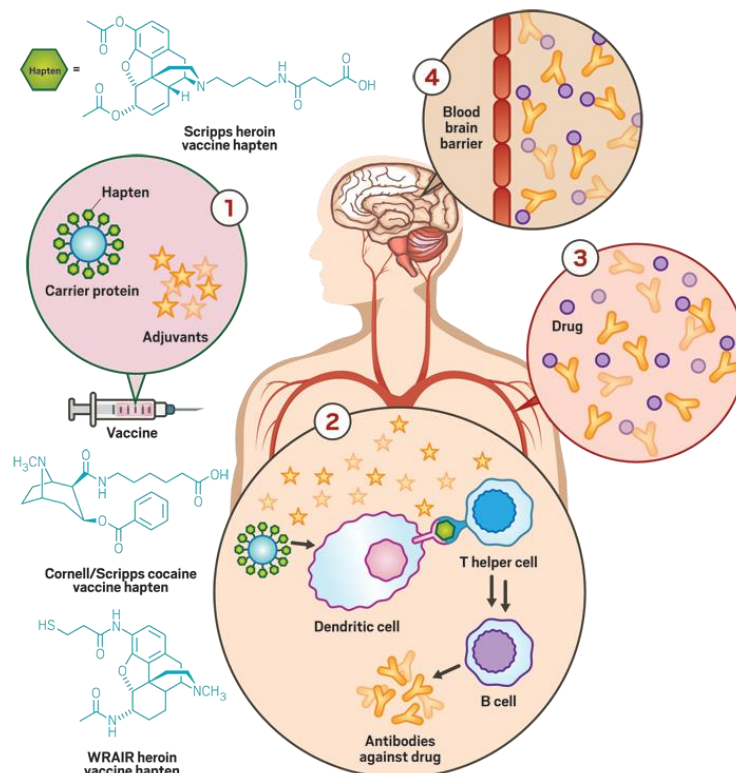


Figura 2: Mecanismo de acción de las vacunas frente a drogas de abuso. **1.** La vacuna se compone del hapteno unido a la proteína transportadora, y de adyuvantes que ayudan a que el sistema inmune responda a la vacuna. **2.** La vacuna estimula la respuesta inmune y se activan linfocitos B que producen anticuerpos específicos frente a la droga. **3.** Al consumir la droga de abuso, los anticuerpos en sangre se unen a ella. **4.** Esta unión impide que la droga atraviese la barrera hematoencefálica (34). Disponible en: Torrice, M. (2018).

El resultado de este estudio (1) indicó que en las ratas inmunizadas con esta vacuna se redujo de forma significativa el efecto que tiene la cocaína sobre la percepción del dolor: el tiempo de reacción a la placa caliente en los animales vacunados era menor que en los animales sin vacunar, lo que indicaba que se había reducido el efecto analgésico de la cocaína. Con estos primeros resultados se deduce que el mecanismo de acción en el que se basa este tipo de terapia sí puede ser útil en el abordaje del tratamiento de la adicción a la cocaína.

En un caso concreto se detectó que el animal presentaba altos niveles de anticuerpos frente a la cocaína, pero a pesar de ello no tenía protección frente a la misma. Las teorías que explican este fenómeno son que probablemente se formasen anticuerpos frente a diferentes epítopos de la molécula y que no todos ellos fuesen igual de eficaces, o que existieran anticuerpos de baja afinidad por la cocaína. Este hecho sugiere que sería conveniente sintetizar una vacuna con una estructura que diese lugar a anticuerpos más específicos, evitando así este fenómeno.

Algo que se planteó en este estudio fue qué repercusión podría tener que se acumulasen los complejos anticuerpo-cocaína en los glomérulos renales. Al estudiarlo no se detectó ninguna acumulación de estos complejos. La explicación que encontraron los investigadores fue que este complejo es muy pequeño y por tanto sería soluble.

A pesar de estos resultados aparentemente prometedores, hubo críticas y polémica alrededor de este ensayo (3, 6, 7) cuestionando la idoneidad de la síntesis del complejo hapteno-proteína transportadora y la especificidad de los anticuerpos generados, además de discrepancias entre investigadores sobre si podrían utilizarse metabolitos derivados de la cocaína, como la benzoilecgonina, como haptenos en el desarrollo de una vacuna o no.

GNC – KLH:

Tras este primer intento de vacuna, se desarrolló una nueva denominada GNC-KLH. Este nombre indica que el hapteno utilizado es la molécula llamada GNC, y la proteína transportadora es la misma que en la vacuna anterior, KLH.

La razón por la que se decidió modificar el hapteno de la vacuna con respecto a la anterior es que la cocaína se degrada rápidamente tanto *in vivo* como *in vitro* dando lugar a un derivado no psicoactivo que es la benzoilecgonina (**Figura 3**), y los conjugados con epítomos similares a este derivado podrían dar lugar a una respuesta inmunitaria con menor afinidad y especificidad hacia la molécula de cocaína. Tanto la benzoilecgonina como la cocaína presentan el anillo fenólico como elemento principal de reconocimiento, lo que podría llevar a pensar que los anticuerpos formados por el reconocimiento de ambas moléculas tendrían afinidad por la cocaína. Sin embargo esto no es así, la molécula de cocaína es neutra mientras que la molécula de benzoilecgonina está cargada negativamente, y esto afectaría a la afinidad y selectividad de los anticuerpos formados. Es por eso que, en esta vacuna, en vez de utilizar la cocaína, se utilizó un hapteno más estable denominado GNC (4). Este nuevo enfoque intenta mejorar el problema que tenía la vacuna anterior, que podía dar lugar a anticuerpos que no reconocían la molécula de cocaína. En este caso, al utilizar un hapteno más estable que la cocaína no se degradaría y se evitarían los problemas de que la respuesta inmunitaria reconociese una estructura derivada de la original dando lugar a esos anticuerpos no protectores.

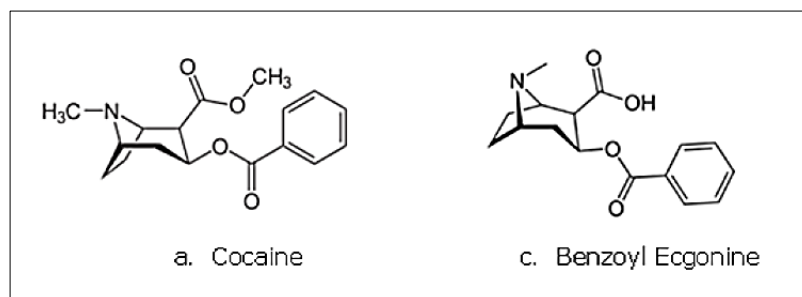


Figura 3: Estructuras de las moléculas de cocaína y benzoilecgonina. Disponible en: Kinsey, B. M. (2010).

El hapteno GNC (**Figura 4**) se sintetizó a partir de la molécula de cocaína añadiéndole una cadena alquílica con un ácido carboxílico, y se conjugó de nuevo con la proteína transportadora KLH. Esta modificación realizada en la estructura de la cocaína no interfería en el reconocimiento de la molécula por parte de las células inmunitarias.

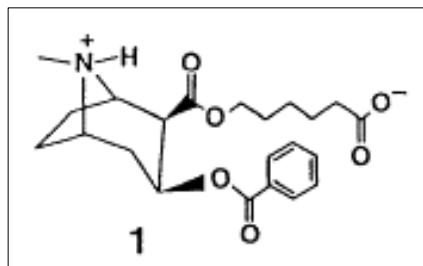


Figura 4: Estructura del hapteno GNC. Disponible en: Carrera, M. R. A. (1995). *Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization*. Nature, 378(6558), 727.

Esta vacuna fue testada en ratas Wistar macho. En el grupo inmunizado se produjo una reducción de los efectos psicoestimulantes de la cocaína, comparándolo con el grupo control. Los títulos de anticuerpos, analizados mediante ELISA, fueron de 1:24.000. Además, en los animales que habían sido inmunizados, la concentración de cocaína en tejido cerebral era aproximadamente un 80% menor que en los animales control. Este hecho concuerda con la disminución de los efectos psicoactivos en ese mismo grupo de ratas.

Una de las polémicas que suscitó la primera vacuna frente a la cocaína (3) es que no se sabía si los anticuerpos encontrados eran específicos frente a la cocaína. Por tanto en el ensayo con la vacuna GNC-KLH (4), para comprobar que la respuesta sí era específica, a un grupo de animales inmunizados y un grupo control se les administró anfetamina. A diferencia de lo ocurrido con la cocaína, en este caso no hubo diferencias significativas entre ambos grupos, la actividad locomotora inducida por la anfetamina fue similar en ambos.

Tras este ensayo, se llevó a cabo otro estudio con esta misma vacuna (8). En este caso los animales eran entrenados para autoadministrarse cocaína. Los resultados de este estudio mantenían la hipótesis de que esta vacuna era capaz de inducir una respuesta inmunitaria adecuada frente a la cocaína, y además se comprobó que era efectiva evitando reincidencias en la autoadministración de la droga en ratas.

Los resultados de ambos ensayos sugieren que la inmunización activa frente a la cocaína podría ser útil en el tratamiento de adicción a la misma al disminuir su autoadministración y efectos psicoactivos.

GND – KLH:

Tras los buenos resultados de los ensayos con la vacuna GNC-KLH, surgió la idea de buscar otros haptenos que pudiesen dar lugar a conjugados con mayor capacidad inmunógena (9).

Basándose en la estructura del hapteno GNC, se sustituyeron los grupos ésteres por grupos amida dando lugar al hapteno de segunda generación GND (**Figura 5**), que se conjugó nuevamente a la proteína KLH. Las razones que llevaron a los investigadores a realizar esta modificación fueron dos (10):

-La afinidad de los anticuerpos por la cocaína puede ser optimizada gracias a que, durante la respuesta inmunitaria, los grupos amida del hapteno GND generan interacciones por puentes de hidrógeno. Esto da lugar a que los anticuerpos generados establezcan uniones favorables adicionales con la molécula de cocaína. Estas fuerzas intermoleculares estabilizan la unión y mejoran la afinidad antígeno-anticuerpo. (9, 10)

-Los conjugados del hapteno GND con las funciones amida serían más estables que los del hapteno GNC, lo que da lugar a una concentración mayor y más sostenida de antígenos estimuladores de la respuesta inmunitaria. (9, 10)

La presencia de antígenos más duraderos y que induzcan una respuesta inmunitaria con mayor especificidad mejoraría la eficacia de la vacunación.

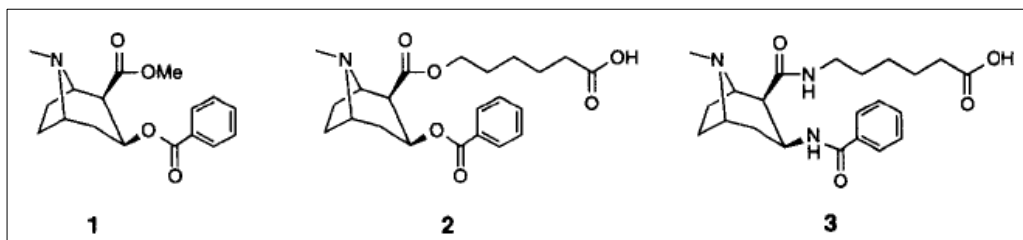


Figura 5: Estructuras de la cocaína (1) y los haptenos GNC (2) y GND (3). Disponible en: Sakurai, M. (1996).

Esta vacuna se probó en ratas y los resultados indicaron que la inmunización con GND-KLH daba lugar a una supresión de los efectos psicomotores de la cocaína, y este efecto se mantenía tras 12 días después de la vacunación (9). Además, se obtuvieron unos niveles de anticuerpos similares a los obtenidos con la vacuna GNC-KLH (alrededor de 1:25.000), lo que podría llevar a pensar que su eficacia es similar. Sin embargo, gracias a la estructura del hapteno GND, los anticuerpos generados con esta vacuna eran más duraderos y específicos que con la GNC-KLH, lo que suponía una mejora en la reducción de los efectos psicomotores de la cocaína.

SNC – BSA:

Para que se produzca una buena respuesta inmunitaria, es importante tanto el hapteno como la proteína transportadora. En esta nueva línea de investigación se conjugó un nuevo hapteno, un derivado de norcocaína denominado SNC (succinil norcocaína) (25) (**Figura 6**), con la proteína transportadora BSA (Bovine Serum Albumin), más inmunogénica que la proteína KLH con la que se habían conjugado los haptenos de las vacunas previas (11).

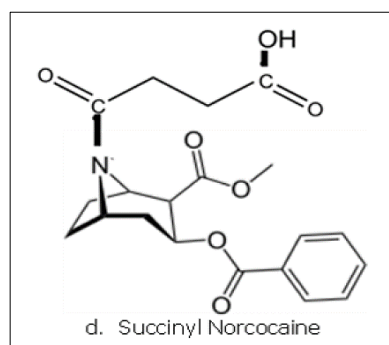


Figura 6: Estructura del hapteno SNC (succinil norcocaína). Disponible en: Kinsey, B. M. (2010).

En el ensayo realizado, se inmunizaron ratones con este conjugado SNC – BSA (12). Se obtuvieron altos niveles de anticuerpos tras la administración de la vacuna y diversos recuerdos, llegando a ser el título de anticuerpos mayor de 1:100.000. Con la administración

periódica de recuerdos de la vacuna, los anticuerpos llegaron a mantenerse durante más de un año. Estos niveles de anticuerpos son cuatro veces mayores que los obtenidos con las vacunas anteriores, con cada nueva estructura hapteno-proteína transportadora se iban consiguiendo resultados más prometedores.

Esos anticuerpos generados prácticamente no reconocían los metabolitos inactivos de la cocaína (metilecgonina y benzoilecgonina), pero sí reconocían los activos como la norcocaína y cocaetileno (este último producido cuando se combina el consumo de cocaína con alcohol), además de reconocer la molécula de cocaína.

TA-CD (SNC – rCTB):

Con el objetivo de intentar aumentar la inmunogenicidad de la vacuna, se sintetizó un nuevo conjugado utilizando otra vez como hapteno la norcocaína (SNC) y cambiando la proteína transportadora por un derivado de la toxina colérica B (rCTB) (13), elegida por ser segura en humanos (17). Inicialmente esta vacuna se denominó IPC-1010, aunque posteriormente se renombró como TA-CD (11).

Ensayos preclínicos:

El primer experimento que se realizó con esta nueva vacuna fue en ratas (14), evaluando el efecto que producía sobre la autoadministración de cocaína. El grupo de animales no inmunizados mantuvo la autoadministración de cocaína durante el estudio. En cambio, dentro del grupo inmunizado, los animales que generaron niveles de anticuerpos mayores de 0.05mg/dl redujeron el consumo de cocaína o lo abandonaron. Todos los animales que habían sido vacunados generaron anticuerpos específicos frente a la cocaína, siendo la media de sus niveles en suero de 0,08mg/dl, pero no todos alcanzaron esa concentración de 0,05mg/dl a la que se detectaron los efectos de la inmunización (14). Una vacuna eficaz no sólo debe ser capaz de estimular la generación de anticuerpos, sino que debe hacerlo en cantidad suficiente para que sus efectos sean notables y el sujeto reduzca su consumo.

Una gran preocupación que se planteó en este estudio era la posibilidad de que un aumento en la dosis de cocaína sea capaz de superar la capacidad de neutralización de los anticuerpos generados. En el rango de dosis evaluado en este estudio aparentemente no se superó esa capacidad, aunque con las dosis que se habían administrado en el estudio se podría esperar que se hubiesen llegado a saturar los anticuerpos. Aun así, las ratas redujeron su consumo de cocaína. Una posible explicación a este fenómeno es que no es necesario bloquear la entrada al cerebro de toda la cocaína administrada para reducir sus estímulos de refuerzo. En presencia de anticuerpos, aunque la dosis de cocaína administrada superase la capacidad de unión, podría haber ocurrido que se ralentizase lo suficiente su entrada al cerebro como para que el estímulo de refuerzo producido fuese débil y no tuviese suficiente efecto en el animal (14).

Otra preocupación surgida en este estudio es si este tipo de vacunas son compatibles o no con fármacos que pueden ser utilizados en el tratamiento de la adicción a cocaína (14). Como ya se ha mencionado, el hapteno SNC da lugar a anticuerpos específicos frente a cocaína y sus metabolitos activos (12). Algunos de los fármacos utilizados en este tratamiento pueden ser estructuralmente parecidos a la cocaína, y por tanto es importante establecer la compatibilidad con la vacuna, ya que sería útil combinar ambos tratamientos para reducir el deseo de consumir durante el periodo de inmunización (14).

En un estudio posterior, también llevado a cabo en ratas, se determinó que el consumo de cocaína durante el periodo de inmunización no afecta a la capacidad de la vacuna de reducir la autoadministración de la droga. Este aspecto es importante porque las recaídas son muy comunes en los adictos que intentan deshacerse (15).

Ensayo fase I:

Tras estos estudios preclínicos, la vacuna TA-CD pasó a ensayarse en fase I (17). Se evaluó en pacientes que habían sido consumidores para ver los posibles efectos adversos. Se dividieron los sujetos en tres grupos y a cada grupo se le asignó una dosis de vacuna diferente.

La vacuna fue bien tolerada. Los efectos adversos locales no eran severos, siendo el más común dolor en la zona de inyección. Respecto a los efectos sistemáticos destacaron aumento de temperatura, hipertensión, taquicardia, faringitis y tics musculares (con la mayor dosis de vacuna). La seguridad de la vacuna es un aspecto muy importante, ya que si no es segura no puede llegar a utilizarse. En este caso, hubo pocos efectos adversos y estos no son severos y desaparecen al poco tiempo.

Todos los sujetos vacunados produjeron anticuerpos IgG específicos frente a la cocaína, siendo detectables a partir de la segunda dosis. Sus niveles medios fueron de 0'003mg/ml, bastante más bajos que los niveles a los que, en estudios anteriores en animales, disminuía el consumo de cocaína (14). Se pensó que en humanos probablemente también se necesitasen niveles más altos para conseguir esa disminución del consumo, y quizás se pudiese conseguir aumentando el número inyecciones o modificando los adyuvantes (17).

Algunos sujetos se evaluaron durante un año, y tras pasado este tiempo los niveles de anticuerpos decrecieron independientemente de la dosis vacunal, lo cual sugiere que son necesarios recuerdos vacunales para mantener los niveles de anticuerpos.

Ensayo fase IIa:

En esta fase se evaluaron, de forma prospectiva, a 22 sujetos con adicción a la cocaína que habían cesado su consumo recientemente (18). Un grupo de sujetos recibió una dosis total de 400µg de vacuna repartida en cuatro administraciones, mientras el otro grupo recibió una dosis total de 2000µg de vacuna repartida en cinco administraciones. Los principales objetivos de esta fase del ensayo eran comprobar que la vacuna era segura y tenía capacidad inmunógena, y también cuál de las dos pautas de administración producía una mejor respuesta.

Respecto a la seguridad, no se observaron efectos adversos serios ni localmente ni de forma sistémica.

Respecto a la inmunogenicidad, a partir de la cuarta semana tras el inicio de la vacunación se empezaron a detectar anticuerpos en sangre. El máximo nivel que se obtuvo fue mayor en el grupo vacunado con 2.000µg. En el sexto mes tras el inicio de la vacunación, los niveles de anticuerpos habían decaído, y los sujetos que habían sido vacunados con una mayor dosis presentaban valores ligeramente superiores (**Figura 7**). A los 12 meses ya no eran detectables. Como se puede observar, el grupo con mayor dosis y número de administraciones generó mayores niveles de anticuerpos, por tanto se puede deducir que estos factores influyeron en que esa respuesta inmunitaria fuese superior. Respecto a los niveles individuales de anticuerpos, hubo variabilidad en ambos grupos de sujetos, así que esa heterogeneidad probablemente derive del propio individuo y no de la vacuna.

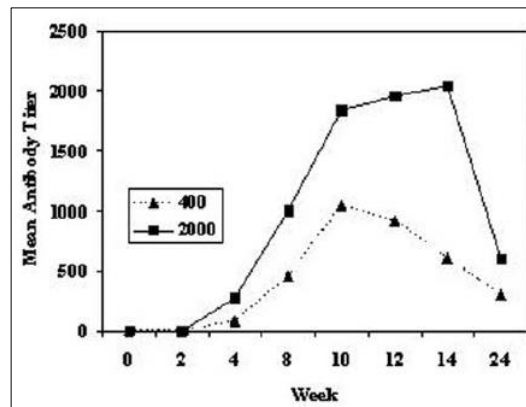


Figura 7: Niveles medios de anticuerpos en ambos grupos durante 24 semanas. Disponible en: Martell, B. A. (2005).

Por otra parte se analizó el consumo de cocaína que realizaron los sujetos durante el transcurso del ensayo. Al principio el consumo era similar en ambos grupos, pero a medida que se administraron las dosis de vacuna, disminuyó. La disminución fue más acusada en el grupo con mayor dosis de vacuna, pero cabe destacar que los sujetos de ambos grupos notificaron que habían notado una disminución de los efectos de la cocaína cuando la consumían. Pasados 3-4 meses tras la última dosis de vacuna, la mayoría (89%) de los sujetos con baja dosis de vacuna había recaído, mientras que en el grupo con alta dosis de vacuna recayeron menos de la mitad de los sujetos (43%). A pesar de esto, los individuos que habían recaído seguían notando una disminución de los efectos euforizantes de la cocaína, así que sus efectos seguían siendo atenuados incluso cuando los niveles de anticuerpos habían bajado. Esto nos indica que la presencia de niveles adecuados de anticuerpos frente a la cocaína ayuda a disminuir su consumo, ya que produce disminución de los efectos centrales que busca el consumidor. También observamos que los resultados son mejores en el grupo con mayor dosis y número de administraciones, así que una pauta de vacunación con estas características es aparentemente más adecuada para conseguir el objetivo de cesar el consumo de cocaína.

Estos resultados fueron muy esperanzadores, pero los investigadores seguían planteando algunas limitaciones de la vacuna frente a la cocaína:

- Esta vacuna protege al paciente sólo de la cocaína, así que podría ocurrir que al anular sus efectos con la vacunación, comenzase a consumir otras drogas de abuso. Además, si el paciente consumiese una dosis suficiente de cocaína, puede saturar los anticuerpos generados y conseguir los efectos deseados. Por estas razones se recomienda que este tipo de vacunas se utilicen en pacientes dispuestos a abandonar el consumo ya que estarán más comprometidos (15, 17).

- No protege frente a la ansiedad o necesidad de consumir cocaína (*craving*).

- La vacunación se realiza a lo largo de semanas y tarda en alcanzarse un nivel suficiente de anticuerpos, así que sería conveniente complementar con otros tratamientos al inicio ya que el sujeto no está protegido esas primeras semanas.

Ensayo fase IIb:

Tras la fase IIa, se pasó a realizar un ensayo en fase IIb para evaluar la eficacia de la vacuna frente a placebo (20) en pacientes en tratamiento con metadona. La idea de estudiar a estos pacientes surgió porque presentaban una mayor adherencia al tratamiento. Además, para incentivar a los sujetos a cumplir el tratamiento se les pagó una pequeña cantidad cada semana.

En este caso se comparó la administración de la vacuna de frente a un grupo tratado con placebo. El 98% de los sujetos vacunados generaron niveles detectables de anticuerpos. De ellos, un 38% adquirió niveles de $43\mu\text{g/ml}$ o superiores, y el otro 62% tuvo niveles inferiores a este valor (incluyendo un caso que no generó anticuerpos), dividiéndose así el grupo en los sujetos con altos y bajos niveles.

Para evaluar la eficacia de la vacuna se llevaron a cabo análisis de orina. Se analizaba la presencia de benzoilecgonina, metabolito cuya presencia en orina no cambia a pesar de tener anticuerpos frente a la cocaína. En el grupo vacunado que había generado altos niveles de anticuerpos ($\geq 43\mu\text{g/ml}$) fue más frecuente encontrar muestras de orina sin metabolito que en el grupo con bajos niveles y el grupo placebo. La presencia de anticuerpos frente a cocaína en sangre se asoció a una reducción del consumo, aunque como se planteaba en el ensayo de fase IIa, sería necesaria la combinación de otro tratamiento en las primeras semanas, hasta alcanzar los niveles de anticuerpos adecuados, y también la administración de recuerdos vacunales para mantener esos niveles.

Lo ideal sería conseguir que un mayor número de sujetos alcanzasen niveles de anticuerpos suficientes, y que estos niveles se mantuviesen durante mucho más tiempo para prolongar la abstinencia.

Poco después se llevó a cabo un estudio con el objetivo de analizar qué relación hay entre el título de anticuerpos y los efectos causados por el consumo de cocaína (21). Se llevó a cabo en voluntarios consumidores de cocaína que no querían dejar de consumirla, y se les administraba la vacuna y también cocaína.

Los sujetos fueron vacunados y un día por semana se les administraba cocaína. Después se les pedía que valorasen subjetivamente los efectos de la cocaína. En el ámbito de seguridad cabe destacar que no hubo ninguna complicación relacionada con la administración concomitante de la vacuna y la cocaína.

Al analizar los niveles de anticuerpos se vio que había gran variabilidad individual. Los sujetos que generaron niveles superiores aseguraban tener una menor percepción de los efectos de la cocaína y consideraban que la calidad de esta era peor que al inicio del estudio, cuando no estaban vacunados. Sin embargo, en los sujetos que habían generado menores niveles de anticuerpos, la percepción en la calidad de la cocaína no cambió con respecto a su valoración al inicio del estudio (**Figura 8**). Por tanto esto demuestra que efectivamente los anticuerpos generados produjeron una disminución de los efectos subjetivos que buscan los sujetos al consumir cocaína, y esta disminución fue mayor en el grupo que había generado altos niveles de anticuerpos.

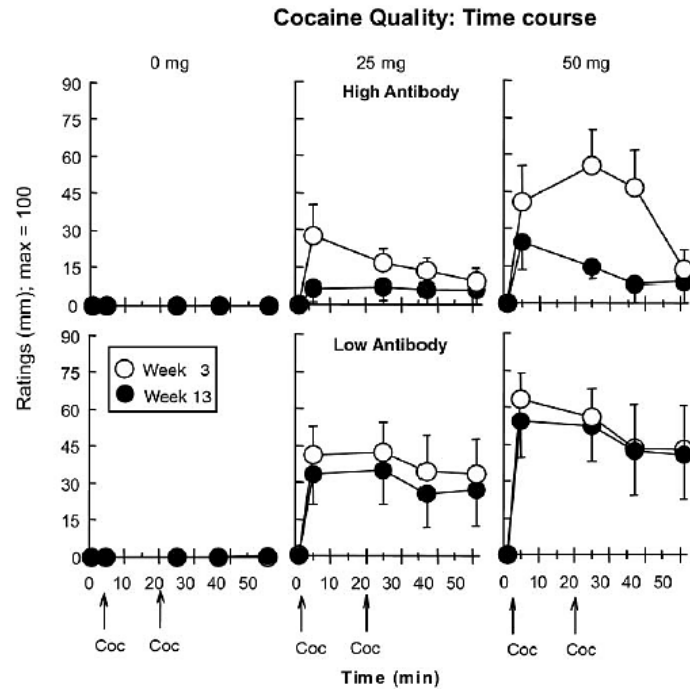


Figura 8: Percepción de la calidad de la cocaína según los sujetos en las semanas 3 y 13 del ensayo en función de la dosis de cocaína. Disponible en: Haney, M. (2010).

Un aspecto importante de este estudio es que los sujetos no querían dejar de consumir cocaína, y aun así quienes generaron altos niveles de anticuerpos disminuyeron su consumo, probablemente para no gastar dinero en algo que ya no les aportaba los efectos que buscaban.

Un hecho que ocurría en este ensayo y también en anteriores es que hay mucha heterogeneidad en los niveles de anticuerpos, algunos sujetos generaban niveles muy altos y otros demasiado bajos como para obtener un beneficio de la vacunación, y se encontró una posible explicación para este fenómeno:

Presencia de IgM:

Como hemos visto, la vacuna TA-CD en algunos sujetos producía niveles adecuados de anticuerpos que captaban las moléculas de cocaína y disminuían así sus efectos. Sin embargo, había una parte de los pacientes que no desarrollaban suficientes niveles de anticuerpos.

Al analizar muestras de sangre previas a la vacunación de los sujetos en fase IIb, se detectó que algunos presentaban anticuerpos IgM frente a la cocaína antes de haber sido inmunizados, lo que significa que el paciente había desarrollado cierta inmunidad frente a la cocaína. Puesto que es un hapteno, incapaz de producir respuesta inmunitaria por sí misma, se pensó en la posibilidad de que al consumir cocaína, ésta se uniese a alguna proteína del organismo y el sistema inmunitario reconociese ese producto como antígeno, generando así esas IgM. Tras este hallazgo, se llevó a cabo un estudio para evaluar las consecuencias de la presencia de esas IgM (23).

Se buscó presencia de IgM e IgG frente a cocaína en las muestras tomadas antes de la administración de la vacuna en los sujetos de la fase IIb. La mayoría de ellos presentaban IgM y entre los que presentaban altos niveles de IgM, ninguno desarrolló tras la vacunación altos niveles de IgG. Los investigadores habían teorizado que, al administrar la vacuna a un paciente

que ya presentaba anticuerpos, ésta podría actuar como recuerdo dando lugar a mayores niveles de anticuerpos. Pero estos resultados indicaban lo contrario: la presencia de IgM antes de la inmunización estaba relacionada con una disminución en los niveles de IgG inducidos por la vacuna. Los investigadores plantearon dos posibles explicaciones para este fenómeno:

1. Respuesta inmunitaria timoindpendiente de tipo 2:

Para explicar este fenómeno hay que tener en cuenta que hay dos tipos de antígenos (24):

-Timodependientes: Necesitan que se produzca cooperación entre los linfocitos T (LT) y linfocitos B (LB) para generar anticuerpos. En primer lugar se generan IgM y posteriormente pueden dar lugar a IgG.

-Timoindpendientes: No hay cooperación entre LT y LB, los antígenos activan directamente los LB. Esta activación es de dos tipos:

·*Tipo 1*: Inducen directamente y de forma inespecífica la proliferación de LB, dando lugar a una respuesta policlonal. Pueden estimular LB inmaduros y maduros.

·*Tipo 2*: Sólo activan LB maduros y producen una respuesta monoclonal.

Una característica de la respuesta inmunitaria timoindpendiente de tipo 2 es que la administración de una dosis de recuerdo no tiene efecto. Se ha demostrado que los anticuerpos generados por esta respuesta de tipo 2 impiden una posterior respuesta timodependiente que genere anticuerpos tipo IgG. A la vista de los resultados de este estudio, se pensó que el consumo de cocaína en estos sujetos podía haber dado lugar a una respuesta inmunitaria timoindpendiente de tipo 2. Se cree que puede haber algún adyuvante capaz de estimular una buena respuesta inmunitaria en estos sujetos, pero no se han probado (23).

2. Supresión de la respuesta inmunitaria:

Otra teoría sobre este fallo en la inmunización es que el uso a largo plazo de la cocaína produce una supresión de la respuesta inmunitaria debido a que disminuye la actividad de células presentadoras de antígenos, linfocitos B y linfocitos T (23).

Por tanto la vacuna TA-CD no será efectiva en todos los pacientes, dado que aquellos que hayan generado una respuesta inmunitaria anterior a la cocaína no responderán bien a la inmunización. Sería conveniente, en caso de que la vacuna llegase a comercializarse, realizar análisis a los pacientes antes de instaurar el tratamiento para determinar si va a ser eficaz o no.

Ensayo fase III:

Tras los estudios de fase II, se pasó a ensayar la vacuna en fase III. Para este ensayo multicéntrico (22) se reclutaron unos 300 sujetos adictos a la cocaína dispuestos a dejar de consumirla. A un grupo se le administró la vacuna y al otro grupo se le administró placebo. El objetivo principal del estudio era analizar si el consumo de cocaína variaba entre el grupo experimental y placebo tras la inmunización. Para medir la eficacia, se analizaban los niveles de IgG frente a la cocaína y también los niveles de metabolitos en orina. Basándose en estudios anteriores (20), los sujetos vacunados se dividieron a su vez en dos grupos, el grupo con altos niveles de anticuerpos ($>42\mu\text{g/ml}$) y el grupo con bajos niveles ($\leq 42\mu\text{g/ml}$).

Respecto al análisis de cocaína en orina, no hubo diferencias significativas entre el grupo vacunado y el placebo, aunque en los pacientes vacunados que presentaban un mayor nivel de anticuerpos IgG, en las últimas semanas de tratamiento se detectaron menos metabolitos en orina que en los pacientes con bajo nivel de anticuerpos IgG, lo que significa que consumieron menos cocaína. Lo que se deduce de estos datos es que, aun habiendo alcanzado buenos niveles de IgG, no se produjo un descenso en el consumo de cocaína, lo cual contrastaba con estudios anteriores (20). No se consiguió el objetivo de que esta vacuna ayudase a reducir o incluso eliminar el consumo de esta droga de abuso por parte de los sujetos. Los investigadores pensaron que estas diferencias entre fase III y fase IIb podrían deberse a algunas diferencias en los diseños de ambos ensayos que tendrían que tenerse en cuenta en futuros ensayos:

- En fase IIb la terapia conductual era obligatoria, mientras que en fase III no.
- La muestra de pacientes en fase IIb era más homogénea que en fase III.
- La compensación económica a los sujetos en fase III era mucho mayor que en fase IIb, y ese dinero podría haber sido utilizado por los sujetos para adquirir más cocaína.

A pesar de que el consumo de cocaína no se redujese de la forma esperada, algunos resultados de este ensayo fueron esperanzadores:

- Hubo menor tasa de abandono de tratamiento en los sujetos con altos niveles de IgG comparado con los sujetos con bajos niveles.
- En las dos últimas semanas de tratamiento, el grupo vacunado y en especial los sujetos con alto nivel de IgG, presentaron menor consumo de cocaína que el grupo placebo.
- Dos tercios de los sujetos generaron altos niveles de IgG (>42mg/dl), lo que indica que la vacuna TA-CD podría ser útil en gran parte de los pacientes.

Seguiría existiendo la posibilidad de que los pacientes consumiesen mayores cantidades de cocaína intentando sobrepasar el bloqueo que producen los anticuerpos. Como ya se ha comentado, esto es más probable que ocurra en pacientes que no tienen voluntad de abandonar el consumo, por eso la vacuna está pensada para administrarse en pacientes que sí quieren dejar de consumir cocaína.

Además, este tipo de vacuna podría beneficiarse de la combinación con colinesterasas, que son las enzimas que metabolizan la cocaína dando lugar a metabolitos inactivos. Por tanto aunque los resultados de este último ensayo no fuesen todo lo buenos que se esperaban, podrían verse mejorados con este tipo de combinación (26).

Aunque los resultados de este último ensayo no demostrasen la eficacia de la vacuna, supuso un gran avance el hecho de haber llegado a probar este tipo de terapia en humanos. Se ha demostrado que con estas terapias se pueden generar anticuerpos frente a la cocaína y que estos son capaces de bloquear su paso al sistema nervioso central. Pero en estos tratamientos influye mucho la determinación que tenga el paciente a superar su adicción. Aunque los anticuerpos generados sean efectivos, es necesaria también la predisposición del paciente para que el tratamiento sea exitoso.

Vacunas con adenovirus:

Paralelamente al desarrollo de los ensayos clínicos con la vacuna TA-CD, se comenzaron a investigar nuevas vacunas anti-cocaína. En este caso los haptenos se conjugaron a proteínas de la cápside de adenovirus no patogénicos. La razón por la que se utilizaron este tipo de proteínas es porque son potentes inmunógenos y se hipotetizó que generarían altos niveles de anticuerpos frente a la cocaína (36).

dAd5GNC:

La primera vacuna de este tipo se denominó dAd5GNC. Se conjugó el hapteno GNC (**Figura 4**) con un vector de transferencia genética del adenovirus serotipo 5 (dAd5) (36). En vez de utilizar como hapteno la molécula de cocaína, se utilizó el derivado GNC porque su estructura es más estable y esto da lugar a que no se formen anticuerpos con baja afinidad o especificidad como podría ocurrir con la cocaína (4).

Al administrar esta vacuna en ratones, se generaron altos títulos de anticuerpos ($1:7'2 \times 10^5$), y los niveles de cocaína detectados en el cerebro tras la administración de esta fueron un 41% menores comparados con el grupo control (36).

dAd5GNE:

Posteriormente se ensayó otra vacuna denominada dAd5GNE (37) que utilizaba como proteína transportadora el mismo vector de transferencia genética del adenovirus serotipo 5. En este caso el hapteno utilizado fue GNE (**Figura 9**) porque presentaba una mayor estabilidad química que otros haptenos de la cocaína y se preveía una mejor respuesta inmunológica.

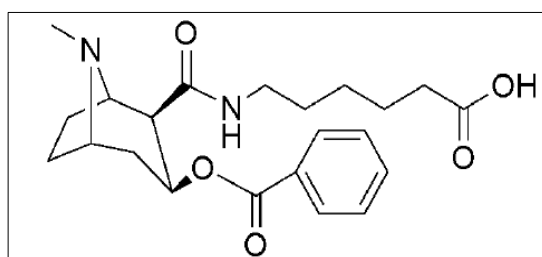


Figura 9: Estructura del hapteno GNE. Disponible en: Koob, G. (2011).

Se compararon los títulos de anticuerpos que producían las vacunas dAd5GNC y dAd5DNE en ratones, y con esta última se conseguían títulos superiores, del orden de $1:10^6$. Además, en ratas se observó que éstas no intentaban administrarse más cantidad de cocaína para intentar sobrepasar el efecto de la vacuna (37).

Los niveles de anticuerpos alcanzados con este tipo de vacunas son muy superiores a los obtenidos con las anteriores. Viendo estos resultados es posible que esta vacuna tenga un gran potencial, pero aún habría que hacer más ensayos preclínicos y ensayos de toxicidad. En caso de que los resultados sean favorables, se pasaría a ensayar en fase clínica.

Conclusiones:

-Existe un problema real en cuanto a tratamientos efectivos contra la adicción a la cocaína.

-El tratamiento de adicciones a las drogas de abuso con inmunoterapia es un campo prometedor que ha avanzado notablemente en las dos últimas décadas.

-El tratamiento con vacunas puede ser una alternativa frente a la terapia descrita hasta ahora.

-Este tipo de vacunas estimulan la producción de anticuerpos anti-cocaína por parte del sistema inmunitario. Cuando el paciente consume cocaína, estos anticuerpos se unen a la molécula impidiendo su paso a través de la barrera hematoencefálica. Así se evitan los efectos perjudiciales a nivel central.

-El problema principal de estas vacunas es que no son eficaces en todos los pacientes, y en los que pueden ser eficaces es necesaria la predisposición del sujeto a cesar su consumo de cocaína para conseguir unos buenos resultados.

-Se han conseguido grandes avances con respecto a las vacunas anti-cocaína, llegando a realizarse ensayos clínicos de fase III, aunque hace falta seguir investigando para poder llegar a aplicarlas en seres humanos, donde hasta el momento no han sido efectivas.

Bibliografía:

1. Bagasral, O., Forman, L. J., Howeedy, A., & Whittle, P. (1992). *A potential vaccine for cocaine abuse prophylaxis*. *Immunopharmacology*, 23(3), 173-179.
2. Del Campo, Miguel, Arancibia, S., Nova, E., Salazar, F., González, A., Moltedo, B., ... & Becker, M. I. (2011). *Hemocianinas, una herramienta inmunológica de la biomedicina actual*. *Revista médica de Chile*, 139(2), 236-246.
3. Gallacher, G. (1994). *A potential vaccine for cocaine abuse prophylaxis?*. *Immunopharmacology*, 27(1), 79-81.
4. Carrera, M. R. A., Ashley, J. A., Parsons, L. H., Wirsching, P., Koob, G. F., & Janda, K. D. (1995). *Suppression of psychoactive effects of cocaine by active immunization*. *Nature*, 378(6558), 727.
5. Salazar-Juárez, A., Barbosa Méndez, S., Jurado, N., Munguía, A., & Antón, B. (2015). *Inmunoprotección activa contra cocaína*. *Salud mental*, 38(6), 441-447.
6. Bagasra, O. (1994). *Reply to Dr. Gallacher*. *Immunopharmacology*, 27(1), 82-83.
7. Gallacher, G. (1994). *Reply to Dr. Bagasra's reply*. *Immunopharmacology*, 27(1), 84.
8. Carrera, M. R. A., Ashley, J. A., Zhou, B., Wirsching, P., Koob, G. F., & Janda, K. D. (2000). *Cocaine vaccines: antibody protection against relapse in a rat model*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(11), 6202-6206.
9. Carrera, M. R. A., Ashley, J. A., Wirsching, P., Koob, G. F., & Janda, K. D. (2001). *A second-generation vaccine protects against the psychoactive effects of cocaine*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(4), 1988-1992.
10. Sakurai, M., Wirsching, P., & Janda, K. D. (1996). *Design and synthesis of a cocaine-diamide hapten for vaccine development*. *Tetrahedron letters*, 37(31), 5479-5482.
11. Kantak, K. M. (2003). *Anti-cocaine vaccines: antibody protection against relapse*. *Expert opinion on pharmacotherapy*, 4(2), 213-218.
12. Fox, B. S., Kantak, K. M., Edwards, M. A., Black, K. M., Bollinger, B. K., Botka, A. J., ... & Geftter, M. L. (1996). *Efficacy of a therapeutic cocaine vaccine in rodent models*. *Nature medicine*, 2(10), 1129.
13. Salazar-Juárez, A., Barbosa Méndez, S., Jurado, N., Munguía, A., & Antón, B. (2015). *Inmunoprotección activa contra cocaína*. *Salud mental*, 38(6), 441-447.
14. Kantak, K. M., Collins, S. L., Lipman, E. G., Bond, J., Giovanoni, K., & Fox, B. S. (2000). *Evaluation of anti-cocaine antibodies and a cocaine vaccine in a rat self-administration model*. *Psychopharmacology*, 148(3), 251-262.

15. Kantak, K. M., Collins, S. L., Bond, J., & Fox, B. S. (2001). *Time course of changes in cocaine self-administration behavior in rats during immunization with the cocaine vaccine IPC-1010*. *Psychopharmacology*, 153(3), 334-340.
16. Kinsey, B. M., Kosten, T. R., & Orson, F. M. (2010). *Anti-cocaine vaccine development*. *Expert review of vaccines*, 9(9), 1109-1114.
17. Kosten, T. R., Rosen, M., Bond, J., Settles, M., Roberts, J. S. C., Shields, J., ... & Fox, B. (2002). *Human therapeutic cocaine vaccine: safety and immunogenicity*. *Vaccine*, 20(7-8), 1196-1204.
18. Martell, B. A., Mitchell, E., Poling, J., Gonsai, K., & Kosten, T. R. (2005). *Vaccine pharmacotherapy for the treatment of cocaine dependence*. *Biological psychiatry*, 58(2), 158-164.
19. Heekin, R. D., Shorter, D., & Kosten, T. R. (2017). *Current status and future prospects for the development of substance abuse vaccines*. *Expert review of vaccines*, 16(11), 1067-1077.
20. Martell, B. A., Orson, F. M., Poling, J., Mitchell, E., Rossen, R. D., Gardner, T., & Kosten, T. R. (2009). *Cocaine vaccine for the treatment of cocaine dependence in methadone-maintained patients: a randomized, double-blind, placebo-controlled efficacy trial*. *Archives of general psychiatry*, 66(10), 1116-1123.
21. Haney, M., Gundersen, E. W., Jiang, H., Collins, E. D., & Foltin, R. W. (2010). *Cocaine-specific antibodies blunt the subjective effects of smoked cocaine in humans*. *Biological psychiatry*, 67(1), 59-65.
22. Kosten, T. R., Domingo, C. B., Shorter, D., Orson, F., Green, C., Somoza, E., ... & Tompkins, D. A. (2014). *Vaccine for cocaine dependence: a randomized double-blind placebo-controlled efficacy trial*. *Drug and alcohol dependence*, 140, 42-47.
23. Orson, F. M., Rossen, R. D., Shen, X., Lopez, A. Y., Wu, Y., & Kosten, T. R. (2013). *Spontaneous development of IgM anti - cocaine antibodies in habitual cocaine users: effect on IgG antibody responses to a cocaine cholera toxin B conjugate vaccine*. *The American journal on addictions*, 22(2), 169-174.
24. Kölliker Frers, Rodolfo (2016). *Inmunología: Inmunopatogenia y fundamentos clínico-terapéuticos*. Ciudad Autónoma de Buenos Aires, Argentina: Corpus Libros Médicos y Científicos.
25. Kinsey, B. M., Kosten, T. R., & Orson, F. M. (2010). *Active immunotherapy for the Treatment of Cocaine Dependence*. *Drugs of the future*, 35(4), 301.
26. Carfora, A., Cassandro, P., Feola, A., La Sala, F., Petrella, R., & Borriello, R. (2018). *Ethical implications in vaccine pharmacotherapy for treatment and prevention of drug of abuse dependence*. *Journal of bioethical inquiry*, 1-11.

27. Shen, X., & R Kosten, T. (2011). *Immunotherapy for drug abuse*. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders), 10(8), 876-879.
28. Morán Chorro, I., Baldirà, J., Marruecos-Sant, L. & Nogué, S. (2011). *Toxicología clínica*. Madrid, España: Difusión Jurídica y Temas de Actualidad S.A.
29. Lizasoain, I., Moro, M. A., & Lorenzo, P. (2002). *Cocaína: aspectos farmacológicos*. Adicciones, 14(1), 57-64.
30. Flórez, J., Armijo, J., & Mediavilla, A. (2014). *Farmacología humana* (6a edición ed.). Amsterdam, Netherlands: Elsevier Masson.
31. Fowler, J. S., Volkow, N. D., Kassed, C. A., & Chang, L. (2007). *Imaging the addicted human brain*. Science & practice perspectives, 3(2), 4.
32. Preti, A. (2007). *New developments in the pharmacotherapy of cocaine abuse*. Addiction biology, 12(2), 133-151.
33. Montoya, I. D. (2008). Inmunoterapias para las adicciones a las drogas. Adicciones, 20(2).
34. Torrice, M. (2018). *Vaccines against addictive drugs push forward despite past failures*. Chemical & Engineering News, 96(8), 18-21.
35. Salazar-Juárez, A., Barbosa Méndez, S., Jurado, N., & Antón, B. (2016). *Las enzimas involucradas en el metabolismo de la cocaína: Una nueva aproximación farmacológica para el tratamiento de la intoxicación por sobredosis de cocaína*. Salud mental, 39(6), 311-320.
36. Hicks, M. J., De Bishnu, P., Rosenberg, J. B., Davidson, J. T., Moreno, A. Y., Janda, K. D., ... & Worgall, S. (2011). *Cocaine analog coupled to disrupted adenovirus: a vaccine strategy to evoke high-titer immunity against addictive drugs*. Molecular Therapy, 19(3), 612-619.
37. Koob, G., J Hicks, M., Wee, S., B Rosenberg, J., P De, B., M Kaminsky, S., ... & G Crystal, R. (2011). *Anti-cocaine vaccine based on coupling a cocaine analog to a disrupted adenovirus*. CNS & Neurological Disorders-Drug Targets (Formerly Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders), 10(8), 899-904.