



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

LA INMUNIZACIÓN ACTIVA CON EL INMUNOCONJUGADO
M-TT-6 ATENÚA EL *PLACE PREFERENCE* INDUCIDO POR
HEROÍNA EN EL RATÓN BALB/c.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
MÉDICA VETERINARIA ZOOTECNISTA

PRESENTA :

MARÍA DOLORES ZAMUDIO CERVANTES



ASESOR:

PHD. DR. ALBERTO SALAZAR JUÁREZ

Ciudad Universitaria, Cd. Mx., 2017



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

DEDICATORIA

A mis padres Asunción Cervantes y Rogelio Zamudio, cuya luz ha sido el faro que me ha guiado a lo largo y ancho de mi carrera, pues han sido mi fortaleza, en los momentos de debilidad y por brindarme una vida llena de aprendizaje y experiencias y sobre todo de amor en todas y cada una de las actividades de la vida.

A mi hermana Eugenia Zamudio, pues nunca ha dudado en ayudarme en mis momentos de necesidad.

A mis amigas y amigos, por acompañarme a lo largo de mi formación académica y por su incondicional apoyo moral a lo largo de tantos años.

A todos los que creyeron en mí, por ser una parte importante en la construcción diaria de la vida como son mis tías, mis tíos, mis primas, mis primos y la memoria viva de mis abuelas y abuelos que han sido la herencia de mis padres.

A la pequeña Lara, quien estuvo conmigo durante 14 años y me enseñó lo que es el amor incondicional. Siempre vivirás en mi corazón.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mi asesor el Dr. Alberto Salazar, que se constituyó en un amigo incondicional y me proporcionó las herramientas adecuadas para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Susana Barbosa, por ser una guía indispensable en mi formación como profesional.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, por ser mi casa durante los cinco años de mi formación académica y a todos mis profesores y profesoras que formaron parte de ella.

Agradezco de forma por demás afectuosa al Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”, que me hizo sentir como gente “de casa” y no tuvo ni cortapisas ni cortavientos para que deambulara con paso seguro dentro del mismo y de los laboratorios donde se fraguó la forma y el fondo de mi tesis, interactuando de manera casi familiar con el personal que labora dentro de él, por eso y por muchas otras cosas más es que abrazo de manera filial a todos y cada una de las compañeras y compañeros con los cuales me tocó departir momentos que fueron culminantes en mi formación ulterior.

CONTENIDO

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCIÓN.....	2
2.1	Panorama mundial y nacional en el consumo de drogas	3
2.2	La heroína.....	4
2.3	Sistema cerebral de recompensa	6
2.4	Mecanismos de acción	9
2.5	Efectos farmacológicos	11
2.6	Síndrome de abstinencia.....	13
2.7	Terapias	14
2.8	Inmunización activa.....	16
2.9	Antecedentes	18
2.10	Justificación.....	21
2.11	Hipótesis	21
2.12	Objetivos	22
III.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	22
3.1	Animales	22
3.2	Drogas.....	23
3.3	Inmunización activa de ratones.....	23
3.4	Ensayos de ELISA	24
3.5	Procedimiento de preferencia lugar.....	25
IV.	RESULTADOS.....	31
V.	DISCUSIÓN	37
VI.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	39
6.1	Conclusiones.....	39
6.2	Recomendaciones.....	39
VII.	REFERENCIAS	41

I. RESUMEN

ZAMUDIO CERVANTES MARÍA DOLORES. La inmunización activa con el inmunoconjugado M-TT-6 atenúa el *Place Preference* inducido por heroína en el ratón BALB/c. (bajo la dirección de: PhD. Dr. Alberto Salazar Juárez)

La adicción a la heroína constituye uno de los problemas de salud pública más representativos de nuestra época. Centros de investigación y empresas farmacéuticas han desarrollado medicamentos para desintoxicar y/o prevenir las recaídas del consumo en sujetos adictos a la heroína con pobres resultados. El Instituto Nacional de Psiquiatría "Ramón de la Fuente Muñiz" logró y consolidó el diseño de un conjugado inmunogénico como terapia contra recaídas al consumo adictivo de heroína en el roedor, la cual produce títulos de anticuerpos suficientes para atenuar el restablecimiento de la conducta de búsqueda y consumo a esta. A pesar de estos importantes resultados, a la fecha actual no se ha evaluado la eficiencia del conjugado M-TT-6 para atenuar el valor de reforzamiento de la heroína. El presente ensayo tuvo como objetivo determinar la eficacia de la vacuna M-TT-6 para atenuar el efecto reforzante de la heroína en ratones BALB/c. Para ello se utilizó el paradigma de preferencia de lugar, el cual se usa para determinar el efecto reforzante de drogas de abuso asociado a señales contextuales. Para este fin, los ratones fueron reforzados con heroína y posteriormente recibieron 5 inmunizaciones con la vacuna M-TT-6. Se realizó un ensayo de ELISA indirecto para determinar el título de anticuerpos de los animales vacunados después de cada inmunización. Se llevó a cabo el paradigma de *Conditioned Place Preference*, en donde se observó que hubo una atenuación en la preferencia (tiempo de permanencia) por la cámara pareada con la droga en los animales vacunados.

II. INTRODUCCIÓN

La adicción se define como una enfermedad crónica y recurrente del cerebro que se caracteriza por la búsqueda y el consumo compulsivo de drogas, a pesar de sus consecuencias nocivas. Se considera una enfermedad del cerebro, dado que las drogas modifican la estructura y funcionamiento del cerebro de forma permanente y pueden conducir a comportamientos peligrosos que son característicos de las personas que abusan del consumo de drogas. ¹

La adicción a drogas, constituye uno de los problemas de salud pública más representativos de nuestra época; que se presenta tanto a nivel nacional como internacional. Este fenómeno de salud afecta sin distinción de género, edad, estrato social o ubicación geográfica, incidiendo principalmente en niños y adolescentes. ²

La cifra de adictos a drogas ilícitas va en aumento cada año, lo que causa una gran preocupación en nuestra sociedad, ya que esta enfermedad genera a la sociedad gastos de billones de dólares por año, sin mencionar las complicaciones sociales y familiares que están relacionadas a este problema. ³

A pesar de este difícil panorama y de que cada día los sujetos con este trastorno tienen más acceso y consumen múltiples drogas de abuso fácilmente, el desarrollo de terapias farmacológicas efectivas contra esta enfermedad no ha producido los resultados esperados.³ A lo largo de las tres últimas décadas, diversos centros de investigación y empresas farmacéuticas a nivel mundial han sintetizado y validado una amplia variedad de fármacos encaminados a desintoxicar, a disminuir los síntomas afectivos observados durante la abstinencia, a reducir la apetencia o craving (estado emocional y motivacional de sentimientos subjetivos de deseo o

(3)

necesidad de consumir sustancias psicoactivas) ⁴ y/o a prevenir las recaídas en sujetos adictos a opiáceos y psicoestimulantes. ^{5,6,7}

2.1 Panorama mundial y nacional en el consumo de drogas

Se estima que un total de 246 millones de personas, o 1 de cada 20 personas, entre las edades de 15 y 64 años, consumió algún tipo de droga ilícita en el 2013. Eso representa un incremento de 3 millones respecto al año anterior, sin embargo, a pesar del incremento de la población mundial, el uso de drogas ilícitas ha permanecido estable. Esto supone una pesada carga para los sistemas de salud pública en términos de la prevención, tratamiento y atención del consumo de drogas.³

Además, sólo uno de cada 6 consumidores de drogas en el mundo tiene acceso a tratamiento, ya que muchos países tienen un gran déficit en la prestación de servicios de salud relacionados a esta enfermedad. El número anual de muertes relacionadas con drogas (estimada en 187,100 personas en 2013) se ha mantenido relativamente sin cambios. Pero aún existe un inaceptable número de muertes prematuras ocasionadas por sobredosis, a pesar de que esto se puede prevenir. ³

A pesar de las variaciones nacionales y regionales en las tendencias en el consumo de drogas, los datos disponibles indicaron que el uso de opiáceos (heroína y morfina) ha ido en ascenso, siendo consumida principalmente la heroína seguida por los opioides de prescripción médica. De acuerdo al “World Report on Drugs” en el 2014 se estimó un total de 28-39 millones de adictos a drogas opioides en el mundo de los cuales cerca de 3.5 millones se localizan en USA. ³

En cuanto al panorama nacional, según cifras de la Secretaría de Salud, se estima que en México el porcentaje de posibles adictos a la heroína es de menos del 1% de la población. Sin embargo, la incidencia acumulada en el consumo de esa droga en habitantes de entre 12 y 65 años aumentó 67% entre el 2008 y 2011.⁴

2.2 La heroína

La heroína es conocida comúnmente como "pasta", "H", "polvo blanco", "junk" y "goma", sin embargo, el término técnico que la describe es diacetilmorfina.⁸

El uso de este opiáceo no es nuevo y data de los egipcios desde hace 6,000 años a.C. Originalmente, esta droga fue utilizada por los farmacólogos en el siglo XIX como un analgésico debido a sus propiedades para disminuir el dolor.⁹

La heroína y morfina, y en general todos los opiáceos son drogas que provienen del opio, el cual se extrae de la savia de las plantas de la amapola. La morfina se extrae a partir del látex seco de la adormidera o planta del opio (*Papaver somniferum*).¹⁰ La heroína, cuya fórmula molecular es $C_{21}H_{23}NO_5$ es un éster de morfina semi-sintético, con dos grupos acetilo acoplados a los grupos de 3 y 6-hidroxilo de la morfina.¹¹ Se cree que los ésteres como la heroína cruzan la barrera hematoencefálica más eficientemente que la morfina y por lo tanto su potencia farmacológica es mayor en comparación a la morfina.¹²

En el caso de la heroína, la ruta de administración más común, es a través de una inyección intravenosa¹³, sin embargo, también puede administrarse vía oral^{14, 15}, fumada^{13, 15} o por medio de supositorios anales y óvulos vaginales¹⁵, siendo estos últimos menos potentes.

Una vez administrada, la heroína rápidamente se localiza dentro de los vasos sanguíneos, donde puede seguir dos caminos: pasar por el hígado donde será metabolizada, o llegar al cerebro y causar sus efectos farmacológicos reforzantes.¹³

Gracias a las enzimas esterasas, la heroína se hidroliza rápidamente en el hígado, formando tres productos: 6-monoacetilmorfina (6-MAM), 3-monoacetilmorfina (3-MAM) y morfina. Esta última se transforma en dos glucoronidos, la morfina 3-glucoronido (M3G) y la morfina 6-glucoronido (M6G) (ver figura 1) los cuales tienen una vida media de eliminación más prolongada que la morfina y poseen una acción analgésica mayor que la morfina.¹³

Cuando viaja directamente al cerebro, la heroína atraviesa la barrera hematoencefálica rápidamente debido a sus grupos acetilo, los cuales la hacen más liposoluble que la morfina. Una vez ahí, también será desacetilada y se formarán sus metabolitos.¹³

La vida media de la heroína es de 1.3 a 7.8 minutos, esto debido a que una gran parte de la droga se metaboliza rápidamente en el torrente sanguíneo, gracias a la acción de las esterasas séricas¹⁶. En cambio, los niveles máximos del primer metabolito de la heroína, 6-MAM, se alcanzan a los 0.7 a 2.7 minutos después de la administración¹⁶. Este metabolito es muy lipofílico y tiene una gran afinidad hacia los receptores opioides, causando gran parte de los efectos agudos de esta droga. La vida media de 6-MAM es de 5.4 a 52 minutos y es excretada vía renal.¹⁶

Los niveles de morfina se incrementan aproximadamente a los 3.6 a 8 minutos después de la administración de la heroína, alcanzando sus niveles máximos a los 30 minutos después de la administración. Su vida media es de aproximadamente entre 100 y 280 minutos¹⁶. La vida media de los metabolitos M3G y M6G va de un

rango de 2 hasta 6.4 horas. La morfina y los glucorónidos son excretados vía biliar y renal.¹⁶

Todas estas características químicas hacen que la heroína sea 100 veces más potente que la morfina, dotándola de la rapidez suficiente para tener efectos sostenidos y reforzantes en el cerebro.¹⁷

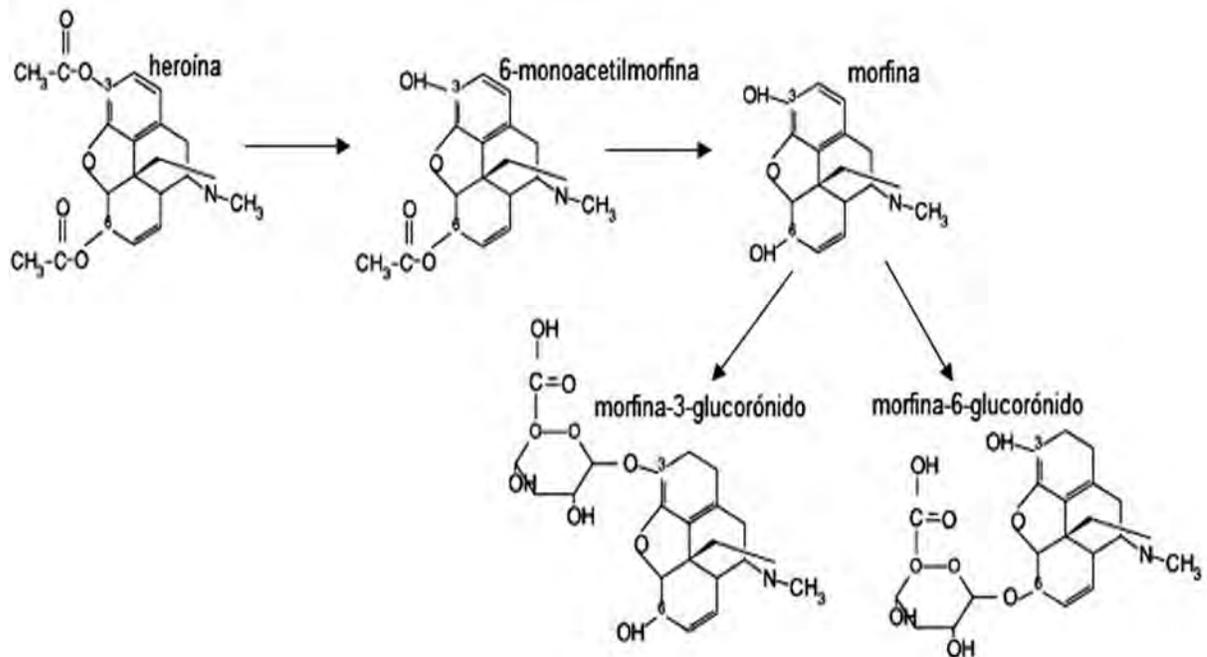


Figura 1. Metabolismo de la heroína. Las enzimas esterasas hidrolizan a la heroína, formando tres productos: 6-monoacetilmorfina (6-MAM), 3-monoacetilmorfina (3-MAM) y morfina. Esta última se transforma en dos glucorónidos, la morfina 3-glucoronido (M3G) y la morfina 6-glucoronido (M6G).

2.3 Sistema cerebral de recompensa

Como se mencionó anteriormente, una vez que la heroína se localiza en los vasos sanguíneos, rápidamente alcanza sus sitios blancos dentro del cerebro, alterando el funcionamiento de algunas neuronas localizadas principalmente en el sistema de recompensa.¹⁸

El sistema de recompensa es un circuito neuronal encargado del procesamiento de información asociada a estímulos gratificantes o reforzadores, tanto naturales (comida, sexo) como externos (drogas de abuso)^{19, 20}. Este circuito neuronal está compuesto por diversos núcleos anatómicos interconectados entre sí, responsables de la traducción, integración y transmisión de la información ²⁰ (ver figura 2).

Las áreas que conforman a este sistema son las siguientes:

- Área tegmental ventral (ATV)
- Núcleo accumbens (NAcc)
- Corteza prefrontal (CP)
- Amígdala

El área tegmental ventral está conformada por neuronas dopaminérgicas de proyección larga e interneuronas GABAérgicas.¹⁹⁻²² El primer sitio afectado por un estímulo reforzante es el ATV, ya que las neuronas localizadas en esta región se localizan los elementos celulares y moleculares necesarios para que la droga lleve a cabo su efecto reforzador (traducción), ya sea mediante la unión a receptores o sistemas de recaptura; los cuales al ser estimulados inducen un aumento en la liberación de dopamina en el Núcleo Accumbens. ¹⁹⁻²²

El NAcc recibe una densa proyección dopaminérgica proveniente del ATV.²³ El núcleo accumbens es un grupo de neuronas que están ubicadas en el lugar donde el núcleo caudado y la porción anterior del putamen confluyen lateralmente dispuestos con respecto al septum pellucidum ²⁴. Es en esta área donde se lleva a cabo la integración de la información relacionada a la droga, ya que funciona como interface entre el sistema límbico y el motor ²⁰. Dependiendo de la intensidad del estímulo (dado por la cantidad de dopamina liberada en el NAcc) las neuronas en esta región asignan un valor al estímulo obtenido por la droga (Saliencia),

aumentando o disminuyendo la motivación por la búsqueda y consumo de una sustancia.²⁵

En este núcleo se distinguen dos estructuras importantes: el área Shell (zona central) la cual tiene conexiones aferentes y eferentes con el sistema límbico, desempeñando un papel decisivo en funciones emocionales y motivacionales y el área core (corteza) la cual establece conexiones, principalmente, con sistemas motores en los ganglios basales y participa en la coordinación de movimientos.²⁰

La corteza prefrontal, que se ubica frente a las áreas motora y premotora²⁴, es una región que está implicada en las capacidades ejecutivas esenciales en la vida, de ellas depende la capacidad de valorar riesgos, posibilidades y de reflexionar antes de actuar, inhibiendo conductas que puedan dañarnos.²⁶ Además, la corteza prefrontal regula los procesos de memoria en los que esté involucrado un componente afectivo a través de conexiones inhibitoras GABAérgicas sobre el núcleo lateral de la amígdala.²⁷ Las neuronas glutamatérgicas de esta área reciben proyecciones dopaminérgicas provenientes de las neuronas del ATV.²⁰

En principio, la proyección dopaminérgica del ATV activa neuronas de proyección glutamatérgica, localizadas en las capas profundas de la CPF, liberando glutamato sobre neuronas dopaminérgicas e interneuronas GABAérgicas localizadas en el NAcc, al activarse las interneuronas liberan Ácido Gamma Amino Butírico (GABA) sobre las neuronas dopaminérgicas inhibiendo su actividad, pero al ser estimuladas de forma constante sufren alteraciones neurofuncionales que generan el desarrollo de la conducta compulsiva.²⁰

La amígdala es la encargada de regular la producción de respuestas emocionales tanto innatas como aprendidas. La amígdala es particularmente importante para las formas de aprendizaje acondicionado, ya que ayuda a un individuo a establecer

asociaciones entre las señales ambientales y establece si esa experiencia en particular fue o no gratificante o aversiva. ^{27, 28}

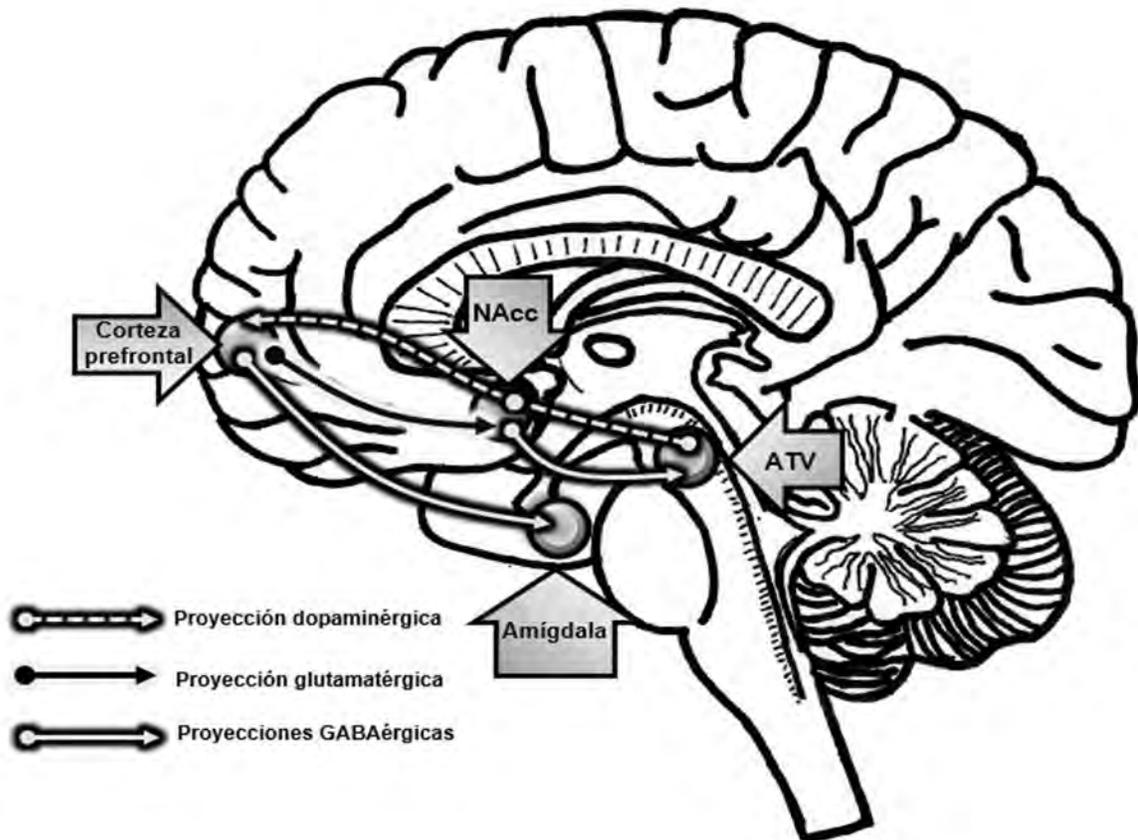


Figura 2. Sistema de recompensa cerebral. Las proyecciones dopaminérgicas de las neuronas del área tegmental ventral (ATV) tienen conexiones aferentes con el núcleo accumbens (NAcc) y con la corteza prefrontal. El NAcc recibe proyecciones eferentes glutamatergicas de la corteza prefrontal, enviando a su vez proyecciones eferentes GABAérgicas al ATV. La corteza prefrontal envía proyecciones aferentes GABAérgicas a la amígdala.

2.4 Mecanismos de acción

La heroína, así como otros opiáceos es una droga altamente adictiva que posee mecanismos de reforzamiento dependientes de dopamina. La heroína junto con sus metabolitos bioactivos, 6-MAM, morfina y M6G, media sus acciones reforzantes mediante su unión a una familia de receptores acopladas a proteína G, los cuales

se clasifican en tres subtipos: mu (μ , op3, mor), delta (δ , op1, dor) y kappa (κ , op2, kor).¹⁰

Aunque los receptores opioides se encuentran distribuidos en un gran número de estructuras cerebrales, los efectos directos de reforzamiento de la heroína parecen ser limitados a áreas selectas del cerebro, entre ellas el ATV, la cual como ya se mencionó antes alberga neuronas dopaminérgicas que proyectan hacia el NAcc, mismas que son cruciales para establecer reforzamiento inducido por drogas.²⁰

Los mecanismos reforzadores de la heroína están conformados de dos potentes efectos que ocurren simultáneamente.

Los receptores tipo delta se encuentran localizados en las neuronas dopaminérgicas. Cuando la heroína cruza la barrera hematoencefálica se une a estos receptores, induciendo la liberación de dopamina en el NAcc.²⁹

Mientras esto ocurre, otra parte de la heroína circulante en cerebro se une a los receptores mu localizados en las interneuronas GABAérgicas, las cuales son las encargadas de regular el funcionamiento de las neuronas dopaminérgicas, inhibiendo la liberación de GABA, resultando en la liberación de las neuronas dopaminérgicas de su inhibición tónica, lo que permite la transmisión de una señal reforzadora dependiente de dopamina.²⁹ (figura 3).

Por otra parte, y de manera simultánea, las proyecciones de las neuronas GABAérgicas del NAcc que llegan hasta el ATV, a su vez se ven impedidas de liberar el GABA que inhibirá a las neuronas dopaminérgicas de esta área, provocando que se eleve más los niveles de dopamina dirigidas hacia el NAcc.²⁹

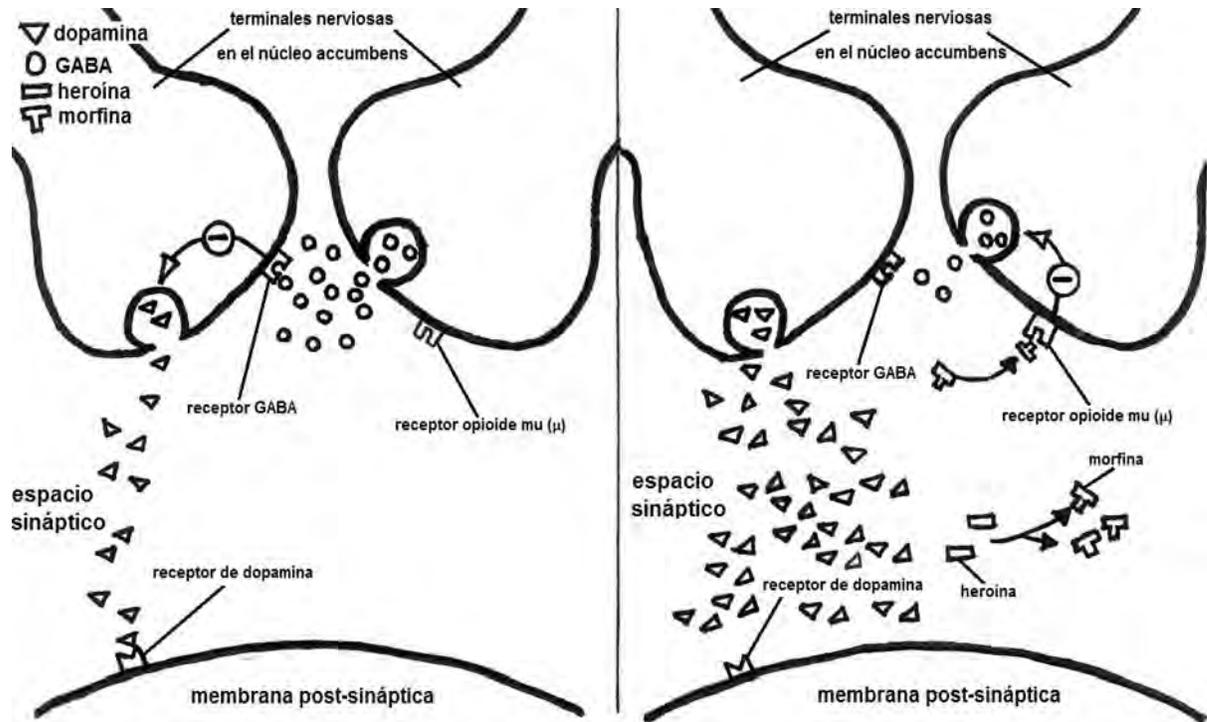


Figura 3. Mecanismo de acción de la heroína en los receptores mu. A la izquierda se muestra el proceso normal de regulación de liberación de la dopamina mediante la liberación de GABA. A la derecha se muestra el mecanismo mediante el cual la heroína ejerce su acción sobre los receptores mu, inhibiendo la liberación de GABA y aumentando los niveles de dopamina.

2.5 Efectos farmacológicos

La acción farmacológica de la heroína sobre el SNC es el resultante de sus acciones depresoras y excitatorias. El efecto final dependerá de la especie animal, la dosis y la situación somestésica del individuo. Así, en la especie humana, una dosis de 10 mg suprime el dolor, reduce las sensaciones desagradables y produce sedación con sensación de bienestar y euforia; si se aumenta la dosis suele producir disforia, náuseas, vómitos y astenia.^{30, 31, 32}

En algunas especies animales (gato, caballo, ratón) aparecen signos de excitación, agitación y convulsiones después de la administración de opiáceos como morfina o heroína.^{30, 31 32}

Así mismo, debido a que el mecanismo de acción de esta droga es interactuando con diversos receptores que se encuentran distribuidos no solo en el sistema nervioso central, sino en varias regiones del organismo, varios de los efectos periféricos de la heroína son la constipación, hipotensión, enrojecimiento facial e inmunosupresión. En la figura 4 se resumen los efectos de esta droga.¹⁰

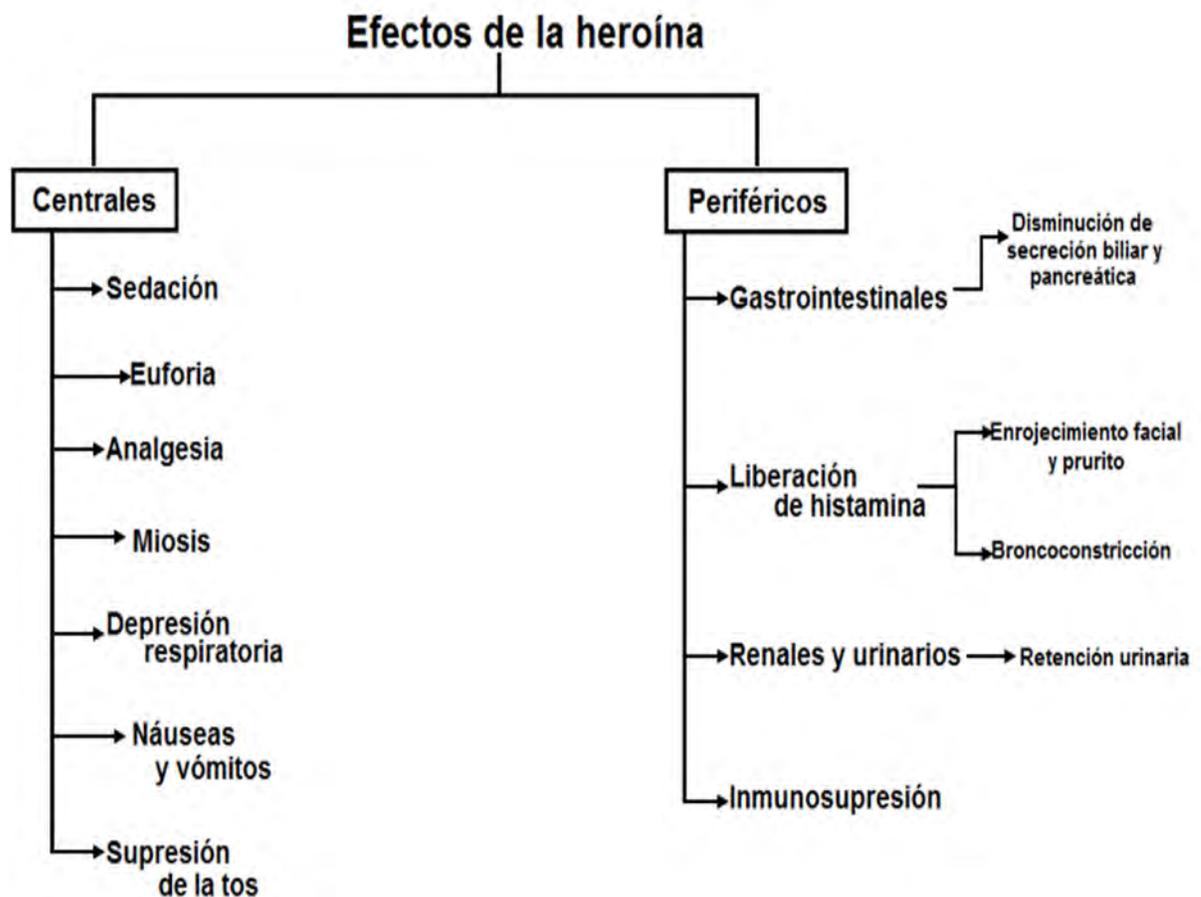


Figura 4. Efectos farmacológicos de la heroína. Los efectos pueden dividirse en centrales y periféricos, debido a que el mecanismo de acción de esta droga es interactuando con diversos receptores los cuales se encuentran distribuidos no solo en el SNC, sino en varias regiones del organismo. Algunos de ellos disminuyen tras la administración repetida (tolerancia).

2.6 Síndrome de abstinencia

La abstinencia de opiáceos se caracteriza por un patrón de signos y síntomas subjetivos y consisten en ansiedad, inquietud y sensación de dolor que con frecuencia se localiza en la espalda y las piernas, acompañados de una necesidad irresistible de obtener opiáceos (craving) y un comportamiento de búsqueda de droga, además de irritabilidad y mayor sensibilidad al dolor.³³ Debe haber tres o más de los siguientes síntomas para establecer el diagnóstico de abstinencia de opiáceos: humor disfórico, náuseas o vómitos, dolores musculares, lagrimeo o rinorrea, midriasis, piloerección o aumento de la sudoración, diarrea, bostezos, fiebre, insomnio, escalofríos, hipertensión arterial, taquicardia, palidez, taquipnea, conducta agitada, estrabismo, hiperglucemia, erección y eyaculación espontáneas, hipermenorrea, salivación, temblores, rigidez, parestias y convulsiones clónicas episódicas.^{33,34} No siempre aparecen todos los síntomas, pero sí una parte de ellos. La piloerección y la fiebre se asocian a la abstinencia grave, y no se observan con frecuencia en la práctica clínica, dado que los pacientes con dependencia de opiáceos suelen obtener las sustancias antes de que la abstinencia esté tan avanzada. Estos síntomas de abstinencia de opiáceos deben provocar un malestar clínicamente significativo o un deterioro social, laboral o de otras áreas importantes de la actividad del individuo. Los síntomas no se deben a enfermedad médica ni se explican mejor por la presencia de otro trastorno mental. En la mayoría de los sujetos que son dependientes de drogas de acción corta como la heroína, los síntomas de abstinencia aparecen entre las 6 y las 24 horas después de la última dosis.^{33,34} En el caso de drogas de acción más prolongada como la metadona, los síntomas pueden tardar 2-4 días en aparecer. Los síntomas agudos de la

abstinencia de opiáceos de acción corta como la heroína habitualmente alcanzan un máximo entre 1 y 3 días, remitiendo gradualmente en un período de 5-7 días.^{33,34} Los síntomas de abstinencia menos aguda pueden prolongarse durante semanas o meses. Estos síntomas más crónicos incluyen ansiedad, disforia, anhedonía, insomnio y anhelo de droga.^{33,34}

2.7 Terapias

Actualmente, los tratamientos para la adicción a drogas opioides están basados principalmente en el uso de terapias de sustitución con metadona, buprenorfina y naloxona. Según la Organización Mundial de la Salud (WHO, 2008) solo el 10% de los adictos a opioides en el mundo tienen acceso a un tratamiento, debido particularmente a su alto costo.³⁵

A lo largo de las tres últimas décadas, centros de investigación y empresas farmacéuticas a nivel mundial han sintetizado, aplicado y en sus casos validado, el uso clínico de medicamentos para desintoxicar, reducir el *craving*³⁶ y/o prevenir las recaídas del consumo adictivo en sujetos adictos a opiáceos, en estudios clínicos controlados doble-ciego/aleatorizados.⁵

Sin embargo, actualmente no existen evidencias de resultados eficaces a largo plazo sobre los procedimientos de mantención de abstinencia en sujetos en fase inicial de desintoxicación, ya que los tratamientos para reducir los síntomas de abstinencia durante la adicción crónica a drogas opioides como la heroína, requiere de periodos de tratamiento a largo plazo (p. ej. de meses a años), debido a la imposibilidad de revertir los cambios plásticos de neuroadaptación generados sobre

los diferentes sistemas de neurotransmisión y vías de reforzamiento placentero, inducidos por el consumo crónico de drogas de abuso.³⁷

Es por lo anterior que desde hace más de una década diversos investigadores han desarrollado nuevas estrategias terapéuticas contra la adicción a drogas ilegales.^{38,39}

Estas nuevas estrategias experimentales están basadas en el diseño, síntesis y validación de diversas formulaciones estructurales de vacunas terapéuticas contra la adicción a las drogas de alta potencia y prevalencia adictiva, las cuales al ser dosificadas en esquemas de inmunización activa en modelos animales como el roedor o inclusive en el humano, inducen la producción de anticuerpos séricos específicos que reconocen y unen a estas sustancias en el espacio intravascular sistémico.⁴⁰ Estos anticuerpos anti-droga poseen la capacidad de secuestrar a la droga en el torrente sanguíneo una vez que es consumida por el sujeto, ya que los anticuerpos son macromoléculas (≈ 150 kD), las cuales normalmente no atraviesan la barrera hematoencefálica, formando así complejos moleculares anticuerpo-droga de alto peso molecular, que “secuestran” e impiden la permeabilidad de la cocaína a través de la barrera hematoencefálica.⁴⁰ En esta condición de alteración inmunológica farmacocinética de drogas adictivas, existe una disminución muy significativa de la fracción de “droga libre” plasmática que difunde al espacio extracelular del tejido nervioso cerebral y que estaría disponible para la unión a sus sitios moleculares de acción y evitar la liberación de dopamina. Al no aumentar la concentración sináptica de este neurotransmisor por el consumo de la droga, ya no existe el desarrollo del reforzamiento placentero de re-consumo con patrón adictivo de esta sustancia en el sujeto vacunado activamente e inmune a la misma sustancia.^{40, 41}

Esta estrategia farmacológica experimental de naturaleza "inmunoprotectora", ha demostrado ser un tratamiento con eficacia terapéutica para atenuar significativamente y/o inhibir, las conductas de búsqueda y consumo adictivo a la cocaína, tanto a nivel pre-clínico en el modelo del roedor, así como en el humano. Además, no produce efectos secundarios tóxicos colaterales detectados con las farmacopeas clásicas anti-adictivas ⁴⁰

2.8 Inmunización activa

En la actualidad, las inmunoterapias que han sido diseñadas para su evaluación clínica y pre-clínica se dividen en procesos de "inmunización activa" (los de mayor índice de estudios reportados) y, con menor frecuencia de aplicación y uso la "inmunización pasiva". ⁴²

La inmunización activa, implica la administración de un antígeno (moléculas grandes con un peso molecular superior a los 300 daltones como las bacterias y virus) de manera que este sea reconocido por el sistema inmune y desarrolle una respuesta inmune (generación de anticuerpos capaces de reconocer a la molécula-antígeno).⁴² La re-inmunización ocasionará una segunda respuesta inmune y una inmunidad mucho mayor (una mayor generación de anticuerpos). La desventaja de este método, es que la protección no se adquiere inmediatamente, sin embargo, una vez establecida, los niveles de anticuerpos duran más tiempo y esta inmunidad puede ser estimulada de nuevo. ⁴²

Sin embargo, moléculas pequeñas, como las drogas de abuso, con un peso molecular inferior a 300 daltones ^{40, 41}, son demasiado pequeñas para procesarse adecuadamente y ser presentada a las células del sistema inmune, por lo que no

logran generar una respuesta inmune considerable. A este tipo de moléculas se les denomina haptenos.⁴²

De tal forma, para que el sistema inmune logre captar y procesar una molécula-hapteno (como la heroína) se tiene que combinar con una molécula proteica grande (denominada "molécula acarreadora") y muy inmunogénica, para que se logren formar epítopes completamente nuevos en la superficie de la molécula grande (conjugado-droga-proteína acarreadora=vacuna). Resultando, entonces, en la generación de anticuerpos específicos en contra del hapteno en cuestión, la droga.³⁷

Una de las ventajas de la inmunización activa por medio de la dosificación de una vacuna o preparación inmunogénica es que la vida media de los anticuerpos generados es de larga duración (usualmente entre 30 y 90 días), permitiendo que el efecto inmunoprotector mediado por los anticuerpos específicos circulantes se extienda también por largos periodos de tiempo (usualmente entre 2 y 6 meses).³⁷

Otra ventaja, es que las propiedades farmacocinéticas de la droga (como su metabolismo y depuración plasmática) no se alteran por los procedimientos de la inmunización activa contra la misma droga.³⁷

Cabe mencionar que, en materia de vacunación contra drogas adictivas, se han reportado numerosos trabajos científicos que, han demostrado que la vacunación activa es un procedimiento experimental eficaz, con capacidad de generar concentraciones elevadas de anticuerpos séricos específicos contra drogas adictivas.

Ahora se sabe que el éxito de esta estrategia inmunoterapéutica se basa principalmente en tres parámetros: la magnitud de la concentración de anticuerpos, denominada título; la afinidad y especificidad de los anticuerpos hacia una cierta

estructura molecular (hapteno) y la capacidad de generar anticuerpos específicos a la droga de manera constitutiva (sostenimiento del título a largo plazo).³⁷ Es importante mencionar que la presencia de estos tres parámetros depende exclusivamente de los elementos que conforman al modelo estructural del inmunoconjugado.⁴³⁻⁴⁶

La afinidad y especificidad de los anticuerpos a un hapteno están directamente relacionadas a una presentación inmunogénica exitosa, la cual es el resultado de un buen diseño molecular del conjugado inmunogénico.³⁷

2.9 Antecedentes

En numerosos ensayos científicos se han descrito varias inmunoterapias contra la adicción a drogas ilegales, sin embargo, son escasos los reportes que describen el desarrollo de nuevos modelos de vacunas contra drogas opioides.³⁷ Los estudios indican que la mayoría de estos ensayos usan diferentes modelos estructurales, empleando distintos tipos de haptenos y posiciones para acoplar al hapteno a la molécula acarreadora. Si bien la mayoría usan básicamente a la morfina para la generación del hapteno, éste es acoplado covalentemente a diferentes proteínas acarreadoras inmunogénicas lo cual, en conjunto, dificulta el análisis de los efectos de los mismos.⁴⁸⁻⁵³

Las primeras inmunoterapias experimentales creadas contra la adicción a opioides fueron enfocadas hacia la morfina, y estaban orientadas principalmente a la generación de anticuerpos policlonales. Estos estudios sirvieron de sustento para justificar el desarrollo de nuevos modelos de inmunoconjugados encaminados a

atenuar el efecto de la morfina, la heroína y sus metabolitos en diversos modelos farmacológicos in vivo.⁴⁷

En un primer intento por lograr un modelo de vacuna capaz de generar una potente y duradera respuesta inmune contra la heroína y la morfina., en el año 1999, Akbarzadeh y cols, diseñaron un inmunoconjugado denominado morfina-6-succinil-BSA (M-6-S-BSA). La inmunización de ratas durante 7 semanas con esta vacuna (2 mg de M-6-S-BSA) generó títulos de anticuerpos capaces de disminuir significativamente la actividad locomotora inducida por la administración de 2 mg/Kg de morfina. ⁴⁸

Posteriormente, en el 2013, Kosten y colaboradores desarrollaron un inmunoconjugado utilizando como hapteno la 6-succinilmorfina y como proteína acarreadora la hemocianina de lapa californiana (KLH), obteniendo de esta manera la vacuna llamada KLH-6-SM. Las ratas inmunizadas con este conjugado (100 µg de KLH-6-SM) durante 16 semanas mostraron una producción de anticuerpos anti-morfina capaces de reducir los efectos antinociceptivos producidos por 2 mg/kg de morfina evaluados en las pruebas de hot plate y tail flick.⁴⁹

Otros estudios mostraron el desarrollo del inmunoconjugado 6-glutailmorfina-KLH, que usó como proteína acarreadora al KLH y como hapteno la 6-glutailmorfina. La administración de este conjugado durante 7 semanas (100 µg de 6-glutailmorfina KLH) logró generar suficientes títulos de anticuerpos contra morfina/heroína, los cuales fueron capaces de disminuir significativamente la actividad locomotora y prevenir el restablecimiento de auto-administración inducidas por la administración de 10mg/kg de heroína. ⁵⁰

En el 2011, Stowe y colaboradores sintetizaron la denominada vacuna dinámica, la cual consistió en generar dos haptenos, uno estructuralmente parecido a heroína y

otro a la morfina los cuales conjugó con KLH. Después de 6 inmunizaciones, las ratas de este estudio obtuvieron los títulos de anticuerpos específicos contra heroína/morfina. Estos anticuerpos fueron capaces, en el caso de la vacuna formulada con el hapteno parecido a la heroína, de prevenir el restablecimiento de auto-administración inducida por la administración de 0.5 mg/kg de heroína y en el caso de la vacuna formulada con el hapteno parecido a la morfina disminuyeron la actividad locomotora inducida por 10 mg/kg de morfina.⁵¹

Ese mismo año, Raleigh y colaboradores sintetizaron otro modelo de vacuna; la vacuna M-KLH, la cual, después de un esquema de vacunación de 7 semanas, logró generar los anticuerpos necesarios para prevenir el restablecimiento de auto-administración inducida por la administración de 0.6 mg/kg de heroína.⁵²

En el Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz” el grupo de trabajo del doctor Benito Antón diseñó y sintetizó un nuevo modelo de vacuna contra la heroína y morfina, la denominada “Vacuna bivalente contra la adición de morfina y heroína (M-TT-6). El hapteno usado en esta vacuna fue la morfina-6-henisuccinato. El esquema de vacunación en este caso fue de 16 semanas, generando títulos específicos contra heroína/morfina máximos de 1:250000, mismos que fueron capaces de bloquear el restablecimiento de la conducta de búsqueda y consumo de heroína y morfina en un modelo de auto-administración en la rata y para atenuar, durante 60 minutos, el efecto anti-nociceptivo de la morfina en el modelo farmacológico de evaluación de analgesia de tail-flick tras la administración de 0.06 mg/kg de heroína.⁵³

2.10 Justificación

Se ha reportado previamente que, en los seres humanos, la exposición a contextos ambientales previamente asociados con el consumo de drogas a menudo provoca recaídas en el consumo de estas.⁵⁴

En ello radica la importancia de realizar un estudio controlado en donde se evalúe la eficiencia del proceso de inmunización activa con el conjugado M-TT-6 para atenuar o bloquear el valor de reforzamiento de la heroína asociado a un ambiente determinado. El paradigma farmacológico de preferencia de lugar condicionado (*conditioned place preference*) es un modelo conductual preclínico usado comúnmente para evaluar los efectos reforzantes inducidos por diversas drogas, en asociación con señales asociadas a su consumo. La capacidad de un estímulo como la droga para producir una preferencia por un medio ambiente, se considera un proceso regido por un condicionamiento clásico, derivado de la asociación entre estímulos ambientales y estímulos recompensantes ó aversivos.^{55, 56}

Por lo que es importante evaluar si los anticuerpos generados por la inmunización con el conjugado M-TT-6 son suficientes para atenuar el valor de reforzamiento de la heroína evaluado mediante el uso del paradigma de preferencia de lugar

2.11 Hipótesis

La inmunización activa con el conjugado M-TT-6 producirá anticuerpos capaces de atenuar el valor de reforzamiento de la heroína y disminuirá la preferencia por la cámara asociada a la heroína (3 mg/kg) en ratones BALB/c

2.12 Objetivos

2.12.1 General

Determinar la capacidad de la vacuna M-TT-6 para atenuar el efecto reforzante de la heroína en ratones sometidos al paradigma de preferencia de lugar.

2.12.2 Específicos

- Caracterizar la respuesta inmunogénica de ratones BALB/c sometidos a la inmunización activa con el inmunoconjugado M-TT-6
- Evaluar el restablecimiento de la preferencia de lugar inducida por heroína en ratones BALB/c inmunizados con el conjugado M-TT-6

III. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 Animales

Se utilizaron 24 ratones hembra BALB/c de 8-10 semanas de edad (20-25 g). Se alojaron cinco ratones por jaula de roedores estándar de polisulfonato (57 cm X 35 cm X 20 cm) en una habitación del Bioterio Institucional, la cual se encuentra a temperatura de 21°C (\pm 2°C) y humedad de 40 a 50% controlada bajo un ciclo luz/oscuridad 12h/12h (las luces se encienden a las 7:00 AM). Los animales tuvieron acceso continuo al alimento (Rodent Chow) y agua, excepto durante las sesiones experimentales. Todos los experimentos se llevaron a cabo durante la fase de luz del ciclo luz/oscuridad (09 a.m.-3:00 p.m). Los procedimientos experimentales

fueron aprobados por el Comité de Cuidado de Animales y Bioética institucional en estricta conformidad con los Institutos Nacionales de Salud para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio.

3.2 Drogas

La heroína fue proporcionada por la PGR bajo estrictos permisos regulatorios y de vigilancia oficial de medicamento regulados por COFEPRIS (133300501X0075). La heroína fue disuelta en solución salina estéril (0,9% NaCl), pH 7,4, antes de su uso y se administró por vía intraperitoneal (IP) un volumen de 100 µl. a una dosis de 3 mg/kg. La solución de heroína se mantuvo a -20°C antes de su uso y se preparó antes de la administración en animales. La solución salina (0,9% NaCl) fue utilizada como el vehículo en todos los experimentos.

3.3 Inmunización activa de ratones

Los ratones fueron inmunizados con el inmunoconjugado M-TT-6, adsorbido con adyuvante de gel de hidróxido de aluminio (alum, Imject-R-Alum, Pierce, Rockford, IL, EE.UU.) de acuerdo con el protocolo del fabricante (Pierce, Rockford, IL, EE.UU.). Se realizaron inoculaciones vía subcutánea (SC) en el dorso de los ratones, con una dosis total de vacuna M-TT-6/adyuvante de 100µg/1.0mg de hidróxido de aluminio aforados con SSF para llegar a un volumen total de 100 µl. Posteriormente, 5 inmunizaciones fueron administradas usando la misma unidad de dosis y coadyuvante. Estas inmunizaciones se les aplicaron durante un período de 14-16 semanas (una vez cada 14 días). Catorce días después de cada

inmunización, se tomaron muestras de suero, las cuales se obtuvieron introduciendo a los ratones en restrictores, realizando una pequeña incisión en la cola para obtener la sangre vía vena coccígea (200 µl aproximadamente), se separó el coagulo del suero y este se centrifugó a 8,000 rpm por 5 minutos. A continuación, se separó el suero, mismo que se congeló a -20° C hasta su uso.

3.4 Ensayos de ELISA

Se realizó un ensayo de ELISA indirecto para determinar el título de anticuerpos de los animales vacunados después de cada inmunización. El procedimiento se describe a continuación:

Se solicitó al área de síntesis orgánica, la fase solida (conjugado heroína-BSA) la cual se guardó en congelación a -20°C

Se colocó la fase sólida en placas para ensayo de ELISA de 96 pozos a razón de 1µg/100µl/pozo, en solución de bicarbonato de sodio 0.1M a pH= 8 - 8.5, incubándola por 12 horas a 4°C.

Posteriormente se descartó la solución y se lavó 3 veces con PBS + tween 0.1% pH=7.2-7.4. (Buffer de Lavado) y se colocó PBS + tween 0.1%+ gelatina 0.1% PH=7.2-7.4 (Buffer de Bloqueo). Se Incubó en agitador orbital durante 1 hora a temperatura ambiente.

Se descartó esta solución y se agregó 100µl/pozo de la muestra del suero problema (diluciones 1:100 a 1:1,000 000) en PBS pH=7.2-7.4 y se incubó por 12 horas a 4°C.

Se descartó esta solución y se lavó 3 veces con PBS + tween 0.1% pH=7.2-7.4. (Buffer de Lavado)

Se agregó solución de anticuerpo secundario anti-ratón marcado con biotina (Jackson Immunoresearch, West Grove, PA, EE.UU.) acoplado a un sistema de detección de orto-fenildiamino (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE.UU.) en una dilución de 1:5000 en PBS + tween 0.1% pH=7.2-7.4 a razón de 100µl/pozo, y se incubó durante 2 horas en movimiento a temperatura ambiente.

Se descartó esta solución y se lavó 3 veces con PBS + tween 0.1% pH=7.2-7.4. esta última solución se descartó y se le agregó solución de orto-fenildiamino (OPD) a razón de 100µl/pozo, incubándolo durante 1 hora y realizando la lectura a 492 nm en lector de placas de ELISA.

Los títulos de anticuerpos se definieron inicialmente como la inversa de la dilución de suero que da 50% de la respuesta máxima.

3.5 Procedimiento de preferencia lugar.

3.5.1 Aparato.

Se utilizaron cuatro cajas idénticas de preferencia de lugar (OMNIALVA, Instrumentos, México) para los experimentos. Cada una de ellas fue colocada en una caja ventilada que atenúa el sonido. Cada caja de preferencia de lugar consiste de dos cámaras de condicionamiento de igual tamaño (60 cm x 60 cm x 60 cm) separados por una zona central neutral (20 cm x 60 cm x 60 cm). Ambas cámaras de condicionamiento están conectadas a través de una abertura que puede ser cerrada con una puerta de guillotina. Las paredes de una de las cámaras de condicionamiento son negras, tiene el piso liso y suave, y esta débilmente iluminada, mientras que la otra cámara sus paredes son blancas, tiene un piso rugoso y duro, y está fuertemente iluminada a fin de equilibrar la preferencia por la cámara. La

cámara neutra es gris y tiene el suelo liso. La preferencia de lugar (CPP) se expresa como el tiempo de permanencia en cada una de las cámaras mientras el animal se mueve libremente (ver figura 5).

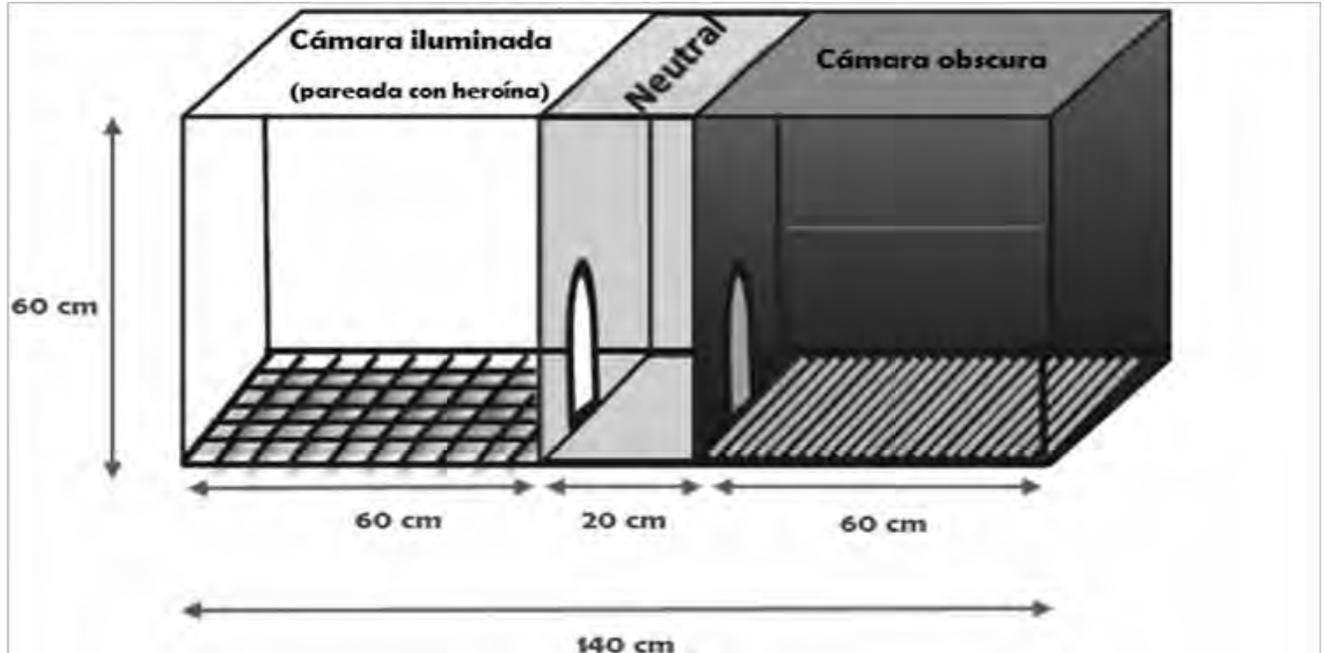


Figura 5. Esquema ilustrativo de la caja de preferencia de lugar. Consiste de 3 cámaras, dos de las cuales miden 60 X 60 X 60 cm (cámaras iluminada y oscura) mientras que la restante mide 20 X 60 X 60 (cámara neutra). Dos puertas se conectan entre la cámara neutra y la iluminada y oscura.

3.5.2 Procedimiento.

El paradigma de *place preference* se llevó a cabo en 14 días consecutivos usando un procedimiento sesgado; en donde para todos los grupos experimentales, el lado pareado con la droga fue siempre el lado con piso rugoso y fuertemente iluminado. Los ratones fueron asignados aleatoriamente a los diferentes grupos experimentales. El procedimiento de preferencia de lugar consistió de seis diferentes fases: fase de pre-condicionamiento (la preferencia de lugar basal),

condicionamiento (entrenamiento), prueba post-condicionamiento, fase de extinción, prueba post-extinción y prueba de preferencia de lugar (prueba *CPP*).

Con el fin de habituar a los ratones a las inyecciones y al manejo, tres días antes de iniciar el experimento, todos los ratones fueron inyectados con solución salina fisiológica por vía IP e inmediatamente se colocaron en sus jaulas.

El procedimiento de *place preference* comenzó con la fase de pre-condicionamiento o habituación (día 0), en donde todos los animales, fueron inyectados con solución salina por vía intraperitoneal (IP), sujetando a los animales de la base de las orejas y colocando su cola entre los dedos anular y meñique del manejador para inmovilizarlo, e inclinándolo caudalmente para después trazar una línea imaginaria que cruce su abdomen transversalmente justo sobre sus rodillas e insertar la aguja sobre esta línea, en el lado derecho del animal, inoculando la sustancia; inmediatamente después, se colocaron en el compartimiento central con las puertas abiertas a cada una de las cámaras de condicionamiento. Durante esta sesión los ratones pudieron explorar libremente las tres cámaras durante 30 minutos; luego se retiraron y se regresaron a sus jaulas.

El tiempo que permanece cada animal en cada uno de los compartimentos fue registrado. Los ratones que permanezcan más del 60% de su tiempo en una de las dos cámaras durante esta etapa fueron excluidos del estudio.

Los animales que cumplieron el criterio de inclusión se dividieron en tres grupos experimentales (n=8). Cada grupo experimental recibió un tratamiento distinto.

La fase de habituación fue seguida por una fase de condicionamiento (día 1-12) que consistió de 12 sesiones/día consecutivas. En todas estas sesiones la puerta entre los compartimentos estuvo cerrada.

El grupo SAL recibió en todas las fases del experimento solución salina. Los animales de los grupos HER y M-TT-6 recibieron la administración de 3 mg/kg de heroína vía IP e inmediatamente se colocaron en la cámara pareada con la droga (cámara iluminada) durante 60 minutos; después de la inyección los animales regresaron a sus jaulas. Este procedimiento se repitió una vez cada dos días para un total de 6 sesiones de condicionamiento a la droga. En días alternos, los ratones fueron inyectados con solución salina. El orden del condicionamiento heroína-salina fue contrabalanceado en cada animal (figura 6).

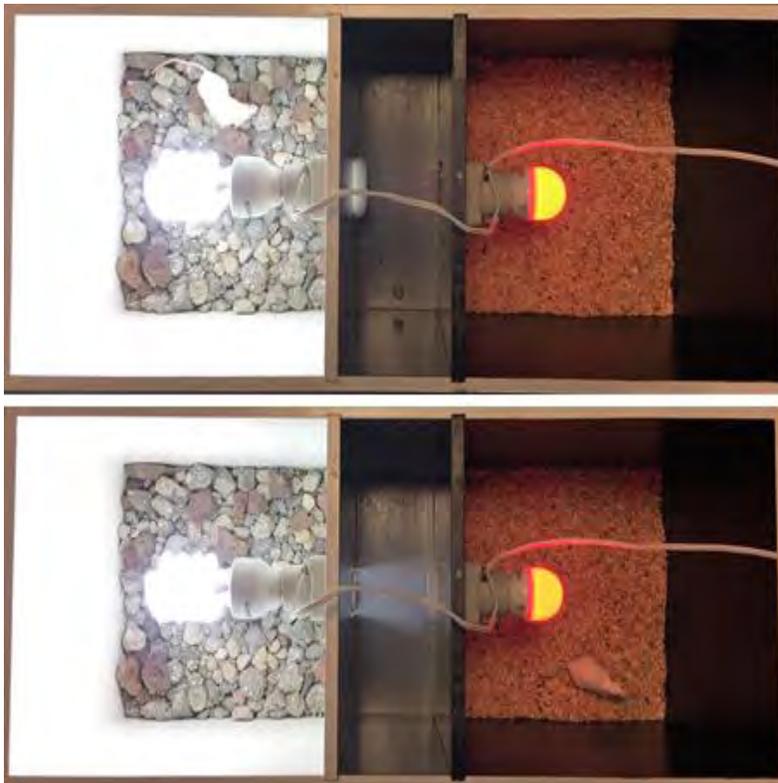


Figura 6. Procedimiento de la fase de condicionamiento; en la parte superior se muestra un ratón administrado con heroína confinado a la cámara iluminada, mientras que en la parte inferior se muestra un ratón administrado con SSF en días alternos, confinándolo a la cámara oscura.

La prueba de post-condicionamiento (día 13) se realizó 24 horas después del último día del procedimiento de condicionamiento y se llevó a cabo sin la administración de droga. Para la prueba, los animales se colocaron en el compartimiento central con libre acceso a todos los compartimentos durante 60 min., exactamente como

en la fase de pre-condicionamiento (figura 7). El tiempo que permanecieron en cada compartimento fue registrado.



Figura 7. Procedimiento de la fase de post-condicionamiento; sin ser administrado con droga o SSF, el ratón fue colocado en el compartimento central con libre acceso a todos los compartimentos.

Durante la fase de extinción, la cual duró 120 días, todos los animales tuvieron libre acceso a las tres cámaras durante 30 minutos, cada día sin ningún tipo de inyección. El momento en que los ratones permanecen la misma cantidad de tiempo en la cámara pareada con la droga y en la cámara no pareada con droga, es el indicativo de que la fase de extinción ha sido establecida. Los ratones que no cumplieron con este criterio fueron excluidos del estudio. Durante esta fase los animales del grupo M-TT-6 fueron sometidos al procedimiento de inmunización activa con la vacuna M-TT-6.

Después de la última prueba de extinción, se inició la fase de prueba de preferencia de lugar (fase de expresión), donde los animales de los grupos HER y M-TT-6

recibieron una inyección de heroína (3 mg/kg, IP) y se colocaron en la cámara pareada con la droga durante 30 min. Al día siguiente, los ratones de ambos grupos, fueron inyectados con solución salina y se colocaron en la cámara no pareada con la droga durante 30 min. El orden del condicionamiento heroína-salina fue contrabalanceado. 24 horas después se llevó a cabo la prueba de preferencia de lugar como se describió para la prueba de post-condicionamiento. El tiempo de permanencia en cada compartimento fue registrado. La cronología de las fases del procedimiento de *place preference* se muestran en la figura 8.

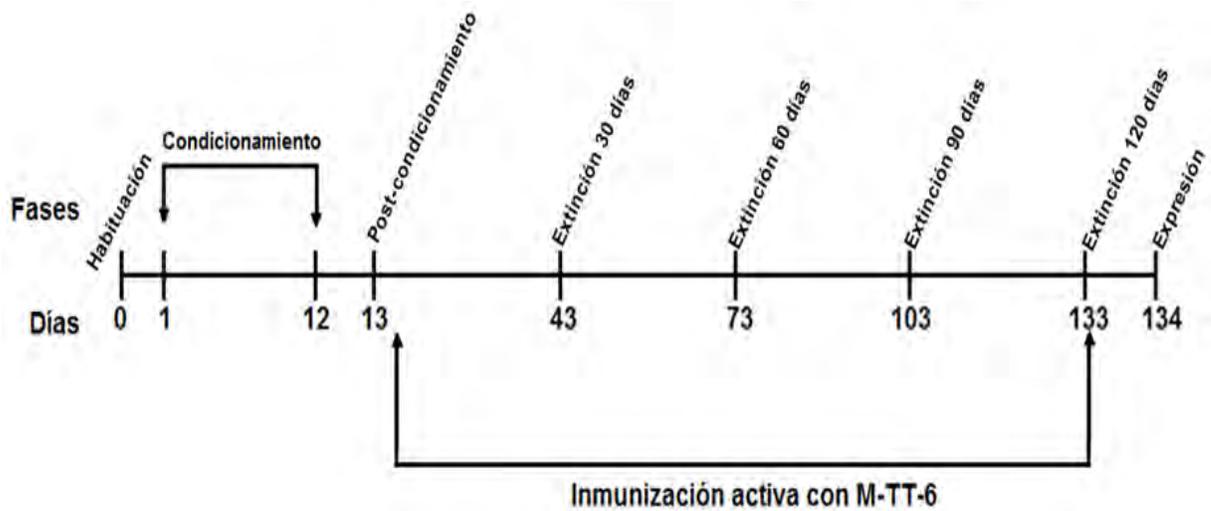


Figura 8. Línea de tiempo del procedimiento del *place preference*. La habituación comienza en el día 0. Entre el día 1 y 12 comienza la fase de condicionamiento con heroína. En el día 13 se lleva a cabo la prueba de post-condicionamiento. Del día 14 al día 133 se lleva a cabo la inmunización con M-TT-6, en este mismo periodo se llevan a cabo las pruebas de extinción cada 30 días. En el día 134 se lleva a cabo la fase de expresión.

IV. RESULTADOS

Como se muestra en la figura 9, los animales inmunizados con la vacuna M-TT-6 mostraron un progresivo incremento en los títulos de anticuerpos específicos anti-heroína analizados por el método de ELISA. El título máximo de anticuerpos fue alcanzado después de la cuarta re-inmunización.

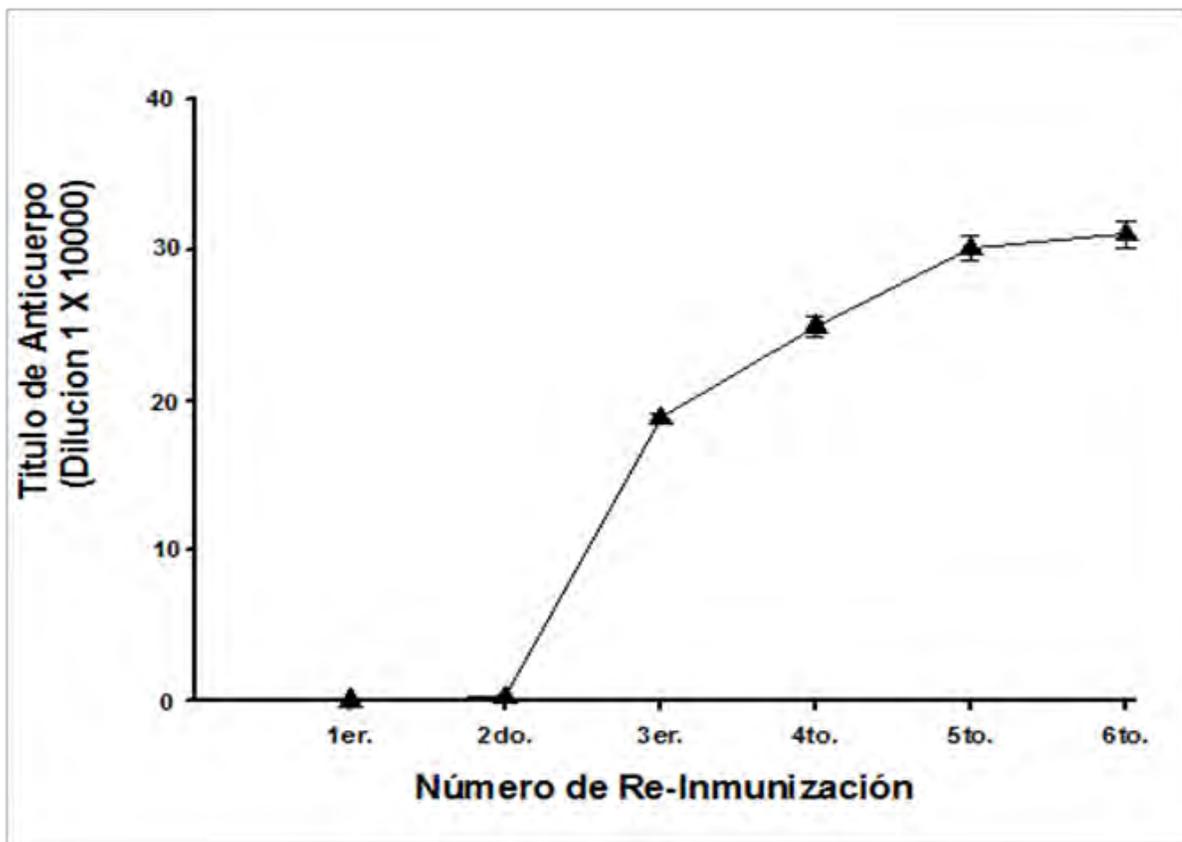


Figura 9. Caracterización de la respuesta humoral inmune a la vacuna M-TT-6 en ratones vacunados. Se muestra incremento progresivo en los títulos de anticuerpos específicos anti-heroína analizados por el método de ELISA. El título máximo de anticuerpos fue alcanzado después de la cuarta re-inmunización.

Los ratones no mostraron diferencias significativas (ANOVA de una vía ($F = (2,30) 67,49$, $p < 0,0001$) en el tiempo de permanencia en cada compartimento durante la fase de habituación. (figura 10)

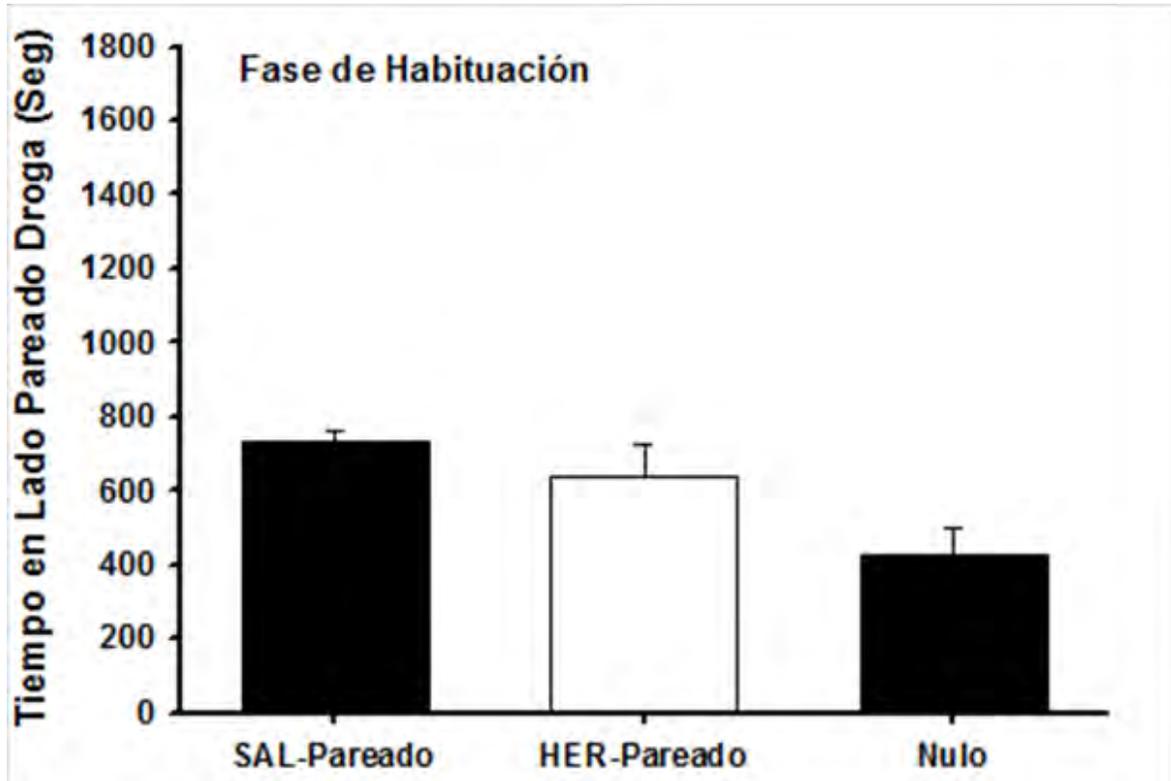


Figura 10. Fase de habituación. Los ratones no mostraron diferencias significativas en el tiempo de permanencia en cada compartimento durante la fase de habituación

Durante la fase de post-condicionamiento (figura 11), la prueba de preferencia de lugar mostró en los grupos HER y M-TT-6 un tiempo de permanencia similar ($F = (2,27) 239,23$, $p < 0,0006$) en la cámara pareada a la heroína (Prueba de Tukey $p = 0.80$).

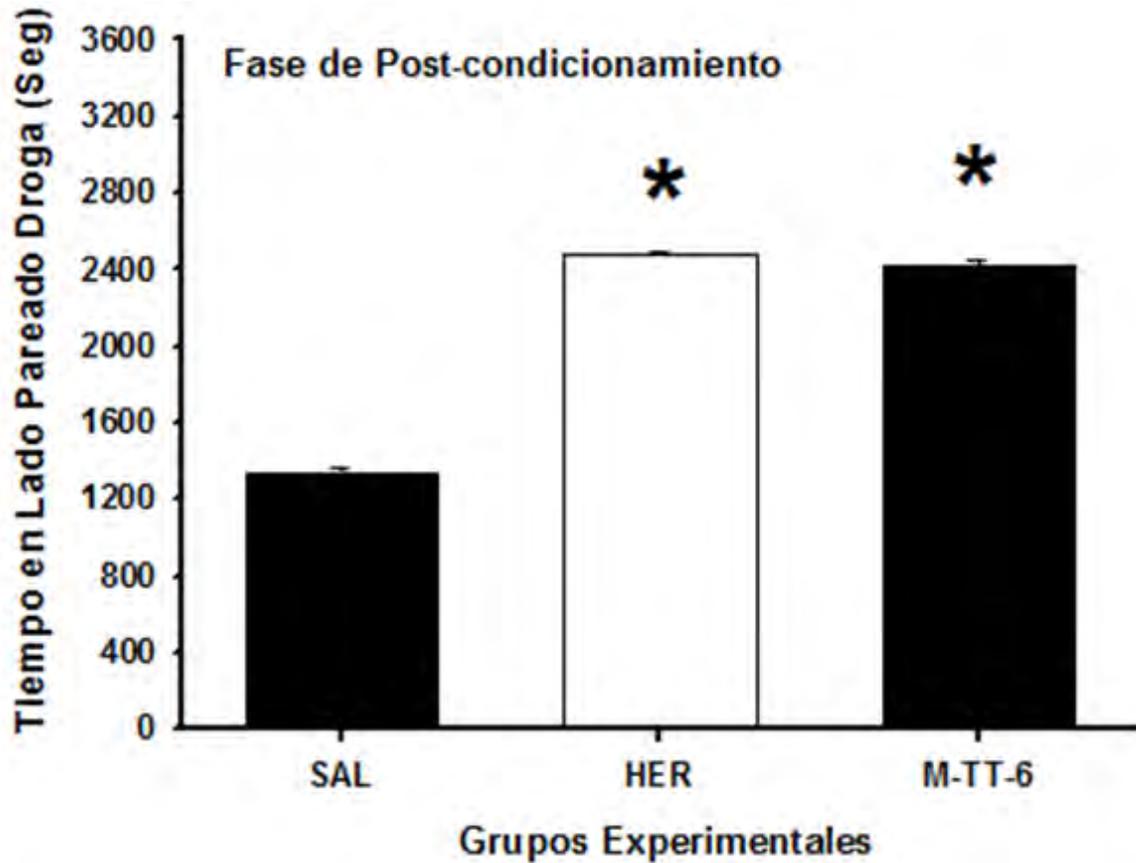


Figura 11. Fase de post-condicionamiento. La prueba de post-condicionamiento de preferencia de lugar mostró un tiempo de permanencia similar en los grupos HER y M-TT-en la cámara pareada a la heroína.

Quando los animales fueron sometidos a la fase de extinción, a los 30 ($F = (2,27) 27.25, p < 0,0003$) (figura 12), 60 ($F = (2,27) 60.63, p < 0,0001$) (figura 13) y 90 ($F = (2,27) 67.83, p < 0,0002$) (figura 14) días de extinción, los ratones del grupo HER permanecieron más tiempo en la cámara pareada con heroína. Para los animales del grupo HER, la prueba post hoc encontró diferencias significativas en el tiempo de permanencia entre las cámaras pareadas con droga y con salina en los tres

tiempos de análisis (30 días-Prueba de Tukey $p < 0.0001$; 60 días-Prueba de Tukey $p < 0.0001$; 90 días-Prueba de Tukey $p < 0.0001$). En cambio, a partir de los 120 días ($F = (2,27) 71.48$, $p < 0,0001$), la prueba de Tukey, ya no encontró diferencias en el tiempo de permanencia entre las dos cámaras (Prueba de Tukey $p = 0.89$) (figura 15).

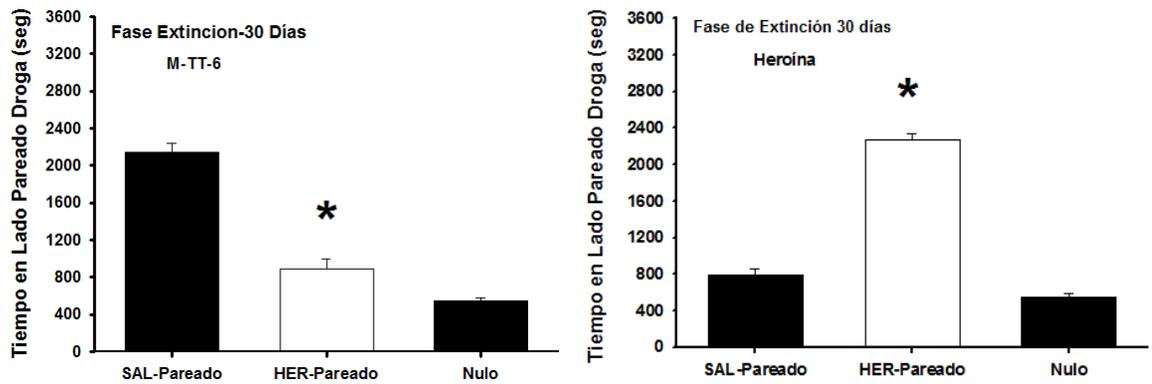


Figura 12. Fase de extinción 30 días. Los ratones permanecieron más tiempo en la cámara pareada con heroína.

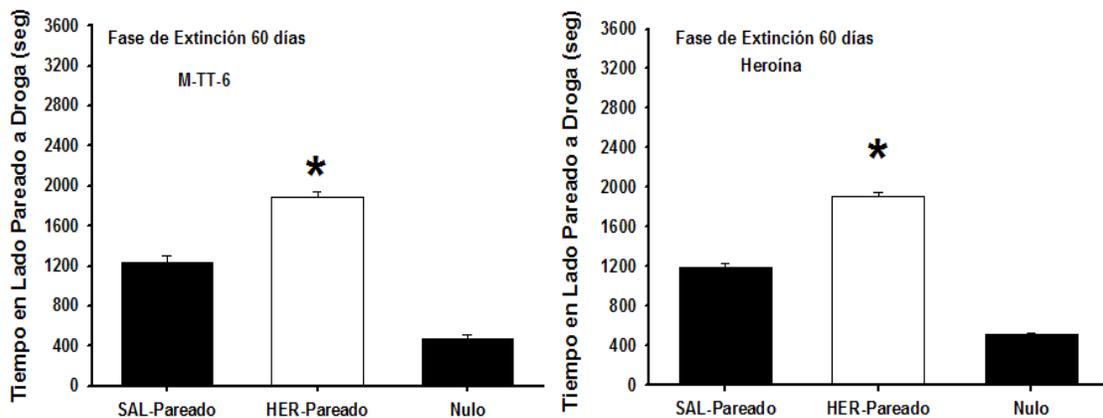


Figura 13. Fase de extinción 60 días. Los ratones permanecieron más tiempo en la cámara pareada con heroína.

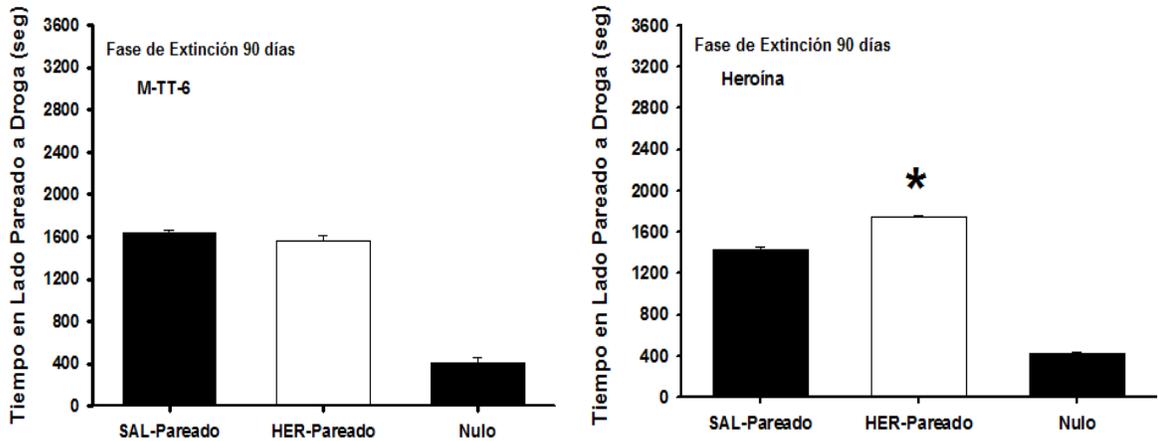


Figura 14. Fase de extinción 90 días. Los ratones ya no mostraron diferencias significativas en el tiempo de permanencia en cada compartimento.

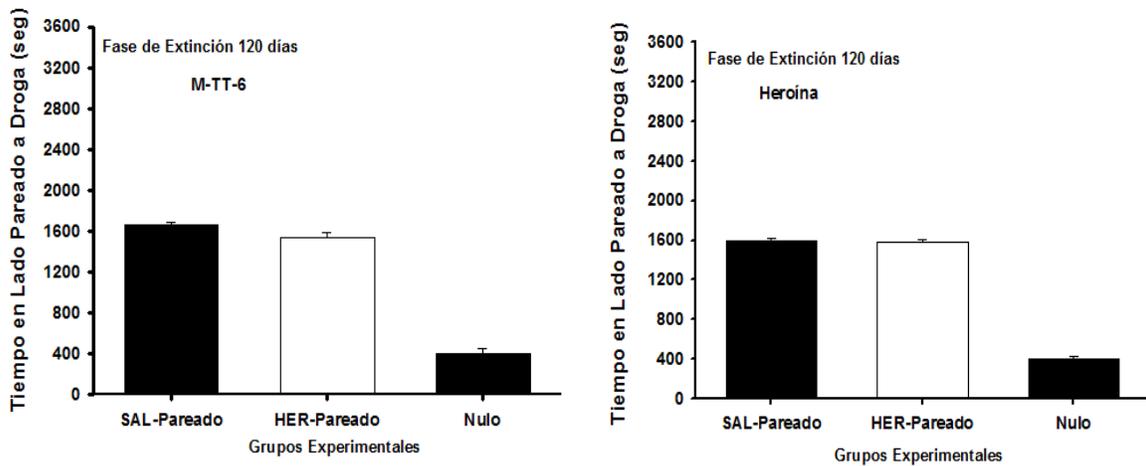


Figura 15. Fase de extinción 120 días. Los ratones no mostraron diferencias significativas en el tiempo de permanencia en cada compartimento.

Los animales del grupo M-TT-6, a los 30 ($F = (2,27) 56.06, p < 0,0002$) y 60 ($F = (2,27) 45.25, p < 0,0002$) días de extinción permanecieron más tiempo en la cámara pareada con heroína. La prueba post hoc encontró diferencias en el tiempo de permanencia entre las cámaras pareadas con droga y con salina en ambos tiempos de análisis (30 días-Prueba de Tukey $p < 0.0001$; 60 días-Prueba de Tukey p

<0.0005). Sin embargo, a los 90 ($F = (2,27) 52.02$, $p < 0,0005$) y 120 ($F = (2,27) 47.03$, $p < 0,0001$) días, la prueba de Tukey ya no encontró diferencias en el tiempo de permanencia entre las dos cámaras (90 días-Prueba de Tukey $p = 0.10$; 120 días-Prueba de Tukey $p = 0.90$).

Durante la fase de expresión, La ANOVA de una vía reveló diferencias significativas entre los grupos ($F = (2,26) 130.17$, $p < 0,0002$) (figura 16). La prueba post hoc encontró que el grupo que recibió la administración de heroína permaneció más tiempo en la cámara pareada con la droga (Prueba de Tukey $p < 0.0001$). En cambio, los animales que fueron inmunizados con la vacuna M-TT-6 durante la fase de extinción mostraron una mayor permanencia en el lado pareado con salina, disminuyendo significativamente la permanencia en el lado pareado con heroína (Prueba de Tukey $p < 0.0001$).

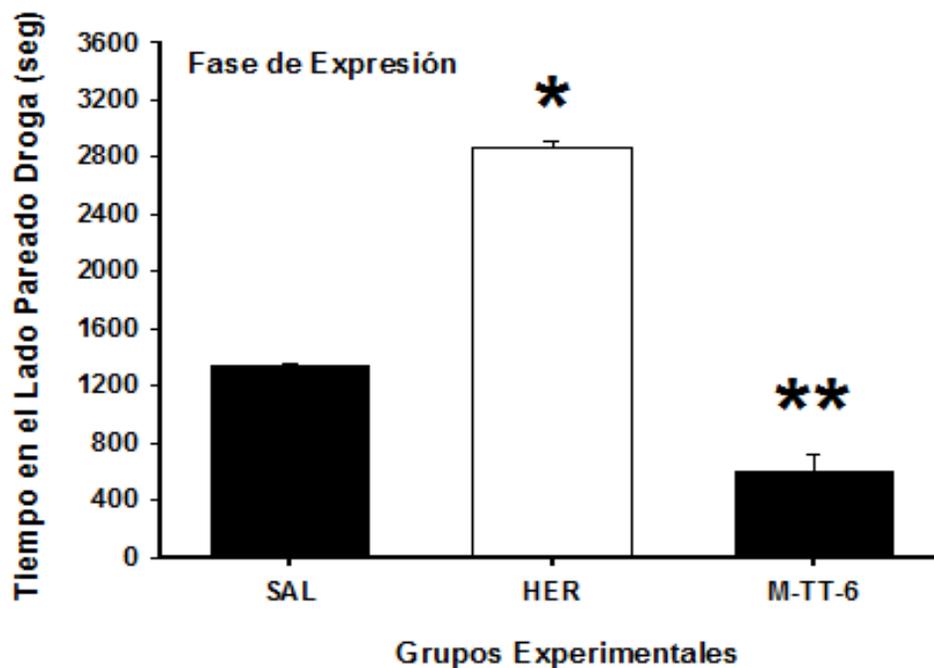


Figura 16. Fase de expresión. El grupo que recibió la administración de heroína permaneció más tiempo en la cámara pareada con la droga. Los animales que fueron inmunizados con la vacuna M-TT-6 disminuyeron significativamente la permanencia en el lado pareado con heroína.

V. DISCUSIÓN

En este estudio se encontró que los ratones inmunizados con la vacuna M-TT-6 generaron anticuerpos específicos contra heroína, los cuales fueron capaces de disminuir el valor de reforzamiento evaluado mediante la prueba de *place preference*.

La inmunización con esta vacuna generó títulos de anticuerpos que fueron en ascenso gradualmente, hasta alcanzar su valor máximo en la 4ta semana de inmunización, llegando a 1:300,000. Estos títulos fueron semejantes a los reportados por Antón y col, para la misma vacuna en estudios previos, los cuales fueron de 1:100,000⁵³ y a los reportados para la vacuna 6-glutailmorfina KLH, la cual generó títulos de anticuerpos específicos contra la heroína de 1:100,000.⁵⁰

No obstante, estos títulos son diferentes a los reportados por otros autores tales como Akbarzadeh y cols., cuya vacuna generó títulos de solo 1:24,000 para la vacuna M-6-S-BSA⁴⁸; Kosten y colaboradores, por su parte, obtuvieron niveles de anticuerpos de 200 µg/ml inmunizando con su conjugado KLH-6-SM⁴⁹. Por su parte, Stowe y cols., obtuvieron tras la inmunización de ratas con su vacuna títulos máximos de 1:22,000⁵¹. Por último, Raleigh reportó en su estudio que la inmunización de ratas con M-KLH produce una concentración de anticuerpos específicos contra heroína morfina de 470±220 µl/ml.⁵²

Con respecto a las evaluaciones de inmunoprotección, en este estudio encontramos que, durante la prueba de preferencia de lugar, los animales sometidos previamente a la administración de heroína a una dosis de 3 mg/kg, permanecieron más tiempo en el compartimiento pareado con la droga.

Estos resultados son consistentes con otros estudios, en donde la administración de heroína incrementó significativamente el tiempo de permanencia en el lado pareado con la droga, ^{57, 58} lo cual indica que la heroína es una droga con un valor reforzante muy alto.

En cambio, la heroína administrada a los animales sometidos a un programa de vacunación con la vacuna M-TT-6 falló en incrementar el tiempo de permanencia en el lado pareado con la droga. Esto es consistente con reportes previos de Kosten y cols., en los que la administración de heroína a animales vacunados con la vacuna KLH-6-SM no mostraron una preferencia por el lado pareado con la droga.⁴⁹ Además es consistente con reportes de Anton y Leff, quienes demostraron que la vacuna M-TT-6 disminuyó significativamente la búsqueda y consumo de la heroína.⁵³

Como se mencionó anteriormente, la vacuna M-TT-6 es capaz de generar altos títulos de anticuerpos, por lo que es probable que la disminución en la preferencia por el lado pareado con la droga sea el resultado de la identificación y captura de los anticuerpos específicos para heroína y sus metabolitos circulantes en el torrente sanguíneo, lo cual le permite impedir que las moléculas de la droga lleguen hasta el cerebro, donde ejercerían sus efectos reforzadores.

Adicionalmente, una diferencia importante que refleja indirectamente la eficiencia de la vacuna M-TT-6, es que esta es capaz de atenuar el efecto de una dosis de 3 mg/Kg de heroína, en cambio Kosten y cols, con la vacuna KLH-6-SM solo logró disminuir el efecto de 1 mg/Kg de heroína, ⁴⁹ lo cual sugiere que la cantidad de anticuerpos generados por la vacuna M-TT-6 son suficientes para disminuir el efecto conductual de dosis altas de heroína.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1 Conclusiones

- Este inmunoc conjugado tiene la capacidad de generar gran cantidad de anticuerpos específicos contra heroína.
- La heroína produce una preferencia de lugar condicionada en ratones después de 6 sesiones de condicionamiento a la droga, probando sus efectos reforzadores.
- Este estudio demuestra que el inmunoc conjugado M-TT-6 tiene la suficiente capacidad inmunogénica para atenuar el *place preference* en ratones sensibilizados con heroína a una dosis de 3 mg/kg
- Este estudio aporta datos que destacan la importancia de la evaluación del inmunoc conjugado M-TT-6 mediante el paradigma de *place preference* y la implicación de esta terapia en los refuerzos positivos generados por la administración de heroína, lo que podría implicar un futuro potencial terapéutico en humanos, como ha sido propuesto en otros estudios.

6.2 Recomendaciones

- La importancia de manejo de animales de laboratorio por personal adecuadamente capacitado exige la integración de equipos multidisciplinarios en donde la trascendencia de personal veterinario es evidente.

- El beneficio potencial de esta investigación para humanos con adicción a la heroína debe de consolidarse con estudios consecutivos que permitan en un futuro la administración de esta vacuna en forma segura para los pacientes.
- El uso de esta vacunación con otro tipo de terapias existentes puede ser útil para tratar la adicción a la heroína. La interacción entre estas debe ser motivo de estudios con mayor profundidad.
- Debido al complejo patrón de consumo de drogas de los usuarios, es probable que una terapia exitosa basada en procedimientos de vacunación, requiera el uso de inmunización activa simultanea contra diferentes drogas como la heroína/morfina/cocaína/anfetaminas, sin embargo, estos modelos están aún en vías de desarrollo (vacunas polivalentes).

VII. REFERENCIAS

1. First, M. B. 1994. Diagnostic and statistical manual of mental disorders. Washington DC; Londres, Inglaterra: American Psychiatric Publishing.
2. Villatoro J. A. 2011. Encuesta Nacional de Adicciones 2011: Reporte de Drogas. México DF, México: INPRFM.
3. United Nations Office on Drugs and Crime. 2014. World Drug Report. Viena, Austria: United Nations publication.
4. Castillo I. I. 2008. Craving: concepto, medición y terapéutica. *Norte de salud mental* 32:9-22.
5. O'Brien CP. 2005. Anticraving medications for relapse prevention: a possible new class of psychoactive medications. *Am J Psychiatry* 162:1423-31.
6. Lawental E. 2000. Ultra rapid opiate detoxification as compared to a 30-day inpatient detoxification program — a retrospective follow-up study. *J Subst Abuse* 11:173-181.
7. Gerra G, Zaimovic A, Giusti F, Di Gennaro C et al. 2001. Lofexidine versus clonidine in rapid opiate detoxification. *J Subst Abuse Treat* 21:11-17.
8. Ruiz A, Díaz M, Gómez B, Romano A, Caynas S, García O. 2010. El cerebro, las drogas y los genes. *Salud Mental* 33:535-542
9. Escohotado A. 1996. *Historia elemental de las drogas*. Barcelona, España: Anagrama S.A.
10. Álvarez Y. 2005. Farmacología de los opioides. *Adicciones* 17:21-40
11. Canfield D, Barrick J, Giessen B.C. 1979. Structure of Diacetylmorphine (Heroin). *Acta Crystallographica* B35:2806-2809.

12. Oldendorf, W. H., S. Hyman, L. Braun & S. Z. Oldendorf: Blood-brain barrier: penetration of morphine, codeine, heroin, and methadone after carotid injection. *Science* 1972, 178, 984–986.
13. Rook EJ. 2006. Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of High Doses of Pharmaceutically Prepared Heroin, by Intravenous or by Inhalation Route in Opioid-Dependent Patients. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology* 98: 86–96.
14. Halbsguth U, Rentsch KM, Eich-Höchli D, Diterich I, Fattinger K. 2008. "Oral diacetylmorphine (heroin) yields greater morphine bioavailability than oral morphine: Bioavailability related to dosage and prior opioid exposure". *British Journal of Clinical Pharmacology*. 66 (6): 781–791.
15. Gyr E, Brenneisen R, Bourquin D, Lehmann T, Vonlanthen D, Hug I. 2000. Pharmacodynamics and pharmacokinetics of intravenously, orally and rectally administered diacetylmorphine in opioid dependents, a two-patient pilot study within a heroin-assisted treatment program. *International Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*. 38(10):486-91.
16. Rook EJ, Huitema AD, van den Brink W, Van Ree JM, Beijnen JH. 2006. Pharmacokinetics and pharmacokinetic variability of heroin and its metabolites: review of the literature. *Curr Clin Pharmacol*. 1:109–118.
17. Kleiman M. A. R., Hawdon J. E. 2011. *Encyclopedia of Drug Policy*. California, Los Angeles: SAGE Publications.
18. Belssaso G. 2002. *Nuevas estrategias farmacológicas en el tratamiento de las adicciones*. México D.F., México: Secretaria de salud.
19. Siegel, G. 1999. *Basic Neurochemistry: molecular, cellular and medical aspects*, 6^a ed. Philadelphia, USA: Lippincott-Raven.

20. Lorenzo P., Ladero J. M., Leza J. C., Lizasoain I. 1998. *Drogodependencias. Farmacología. Patología. Psicología. Legislación.* 3ª ed. Madrid España: Editorial medica panamericana.
21. Watkins, S., Koob, G. y Markou, A. 2000. Neural mechanisms underlying nicotine addiction: acute positive reinforcement and withdrawal. *Nicotine & Tobacco Research* 2:19-37.
22. Charney DS, Buxbaum JD, Sklar P, Nestler EJ. 1999. *Neurobiology of Mental Illness.* 4ª ed. New York, NY: Oxford University Press.
23. Zahm DS. 1999. Functional-anatomical implications of the nucleus accumbens core and shell subterritories. *Acad Sci* 877:113-28.
24. Snell RS 1980. *Neuroanatomía Clínica.* 6ª ed. Madrid España: Editorial medica panamericana.
25. Sesack SR. 2003. Anatomical substrates for glutamate-dopamine interactions. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1003: 36-52.
26. Contreras D, Catena A, Cándido A, Perales JC, Maldonado A. 2008. Funciones de la corteza prefrontal ventromedial en la toma de decisiones emocionales. *International Journal of Clinical and Health Psychology* 8:285-313
27. Castro-Sierra E. 2005. Neurotransmisores del sistema límbico. I. Amígdala. Primera parte. *Salud Mental.* 28: 27-32.
28. LeDoux J. 1999. El cerebro emocional. Barcelona, España: Ariel-Planeta.
29. Preedy VR. 2016. *Neuropathology of Drug Addictions and Substance Misuse Volume. Foundations of Understanding, Tobacco, Alcohol, Cannabinoids and Opioids.* Londres, Reino Unido: Elsevier

30. Hardman JG, Limbird LE, Gilman AG. 2001. *The pharmacological basis of therapeutics*. 10th ed. New York: McGraw-Hill.
31. Flórez J, Armijo JA, Mediavilla A. 2003. *Farmacología humana*. 4ª ed. Barcelona, España: Masson.
32. Rang HP, Dale MM, Ritter JM, Moore PK. 2004. *Farmacología*. 5ª ed. Madrid, España: Elsevier.
33. Sadock B.J., Sadock V.A. 1972. *Kaplan and Sadock's Synopsis of Psychiatry: Behavioral Sciences/Clinical Psychiatry*. 10ª ed. Nueva York Nueva York: Lippincott Williams & Wilki
34. Himmelsbach, C. K. 1941. The morphine abstinence syndrome, its nature and treatment, *Annals of Internal Medicine* 15:829-843.
35. World Health Organization. Dept. of Mental Health, Substance Abuse, World Health Organization, International Narcotics Control Board, United Nations Office on Drugs, & Crime. 2009. *Guidelines for the psychosocially assisted pharmacological treatment of opioid dependence*. Geneva, Switzerland: World Health Organization.
36. Anton, R.F. 1999. "What is craving?". *Alcohol Research & Health* 23:165-173.
37. Salazar-Juárez A, Barbosa Méndez S. 2013. Nuevas Vacunas contra la morfina/heroína. *Salud Mental* 36(3): 219-227.
38. Haney M, Kosten TR. 2004. Therapeutic vaccines for substance dependence. *Expert Rev Vaccines* 3:11-8.
39. Montoya ID, Vocci F. 2008: Novel medications to treat addictive disorders. *Curr Psychiatry Rep.* 10(5):392-8.

40. Antón B, Salazar-Juárez A. 2013. Inmunofarmacoterapia contra los efectos farmacodinámicos de la administración aguda y crónica de drogas de abuso. *Actualidades en Adicciones* 3: 63-107.
41. Carrera MR, Meijler MM, Janda KD. 2004. Cocaine pharmacology and current pharmacotherapies for its abuse. *Bioorg Med Chem* 12(19):5019-30.
42. Tizard I. R. 1977. *Inmunología veterinaria*. 8va edición. Barcelona, España. Elsevier España.
43. Kinsey BM, Kosten TR, Orson FM. 2010. Active immunotherapy for the Treatment of Cocaine Dependence. *Drugs Future* 35:301-306.
44. Orson FM, Kinsey BM, Singh RA, Wu Y et al. 2009 Vaccines for cocaine abuse. *Hum Vaccine* 5(4):194-199.
45. Kinsey BM, Jackson DC, Orson FM. 2009. Anti-drug vaccines to treat substance abuse. *Immunol Cell Biol* 87:309-314.
46. Montoya I. 2008. Immunotherapies for drug addictions. *Adicciones* 20:111-115.
47. Harwood HJ, Myers TG. 2004. *New Treatments for Addiction: Behavioral, Ethical, Legal, and Social Questions*. Washington DC: National Academies Press.
48. Akbarzadeh A. 1999. Design and synthesis of a morphine-6-succinyl-bovine serum albumin hapten for vaccine development. *Biotechnol. Appl. Biochem* 30, 139–145.
49. Kosten T. A. 2013. A morphine conjugate vaccine attenuates the behavioral effects of morphine in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* 45:223–229.

50. Li Q. 2015. A Conjugate Vaccine Attenuates Morphine- and Heroin-Induced Behavior in Rats. *International Journal of Neuropsychopharmacology* 0: 1–11.
51. Stowe G. N. 2011. A Vaccine Strategy that Induces Protective Immunity against Heroin. *Journal of Medicinal Chemistry* 54 (14): 5195–5204.
52. Raleigh, M. 2013. Selective Effects of a Morphine Conjugate Vaccine on Heroin and Metabolite Distribution and Heroin-Induced Behaviors in Rats. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics* 344(2): 397–406.
53. Anton B, Leff P. 2006. A novel bivalent morphine/heroin vaccine that prevents relapse to heroin addiction in rodents. *Vaccine* 24(16):3232-40.
54. Crombag H. S. 2008. Context-induced relapse to drug seeking: a review. *Philosophical Transactions of Royal Society B* 363: 3233–3243.
55. Bardo M.T., Bevins R.A. 2000. Conditioned place preference: what does it add to our preclinical understanding of drug reward? *Psychopharmacology* 153:31–43.
56. Crawley J.N. 2006. *What's Wrong With My Mouse?: Behavioral Phenotyping of Transgenic and Knockout Mice*. 2^a edición. Hoboken, New Jersey: Wiley-interscience
57. Schlussman S.D. 2008. Heroin-induced locomotor activity and conditioned place preference in C57BL/6J and 129P3/J mice. *Neurosci Lett.* 440(3): 284–288.
58. Do Couto B.R. 2003. Reinstatement of Morphine-Induced Conditioned Place Preference in Mice by Priming Injections. *Neural plasticity* 10: 279–290.