



Universitat Autònoma de Barcelona

ADVERTIMENT. L'accés als continguts d'aquesta tesi queda condicionat a l'acceptació de les condicions d'ús establertes per la següent llicència Creative Commons:  http://cat.creativecommons.org/?page_id=184

ADVERTENCIA. El acceso a los contenidos de esta tesis queda condicionado a la aceptación de las condiciones de uso establecidas por la siguiente licencia Creative Commons:  <http://es.creativecommons.org/blog/licencias/>

WARNING. The access to the contents of this doctoral thesis it is limited to the acceptance of the use conditions set by the following Creative Commons license:  <https://creativecommons.org/licenses/?lang=en>



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**USO TERAPEUTICO DE ISOFLAVONAS DE LA SOJA EN EL
TRASTORNO POR CONSUMO DE COCAÍNA**

Roser Martínez Riera



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

**USO TERAPEUTICO DE ISOFLAVONAS DE LA SOJA EN EL
TRASTORNO POR CONSUMO DE COCAÍNA**

Roser Martínez Riera

Directores:

Magí Farré Albaladejo

Maria Francina Fonseca Casals

Marta Torrens Melich

Tutor:

Marta Torrens Melich

Tesis doctoral del Programa de Doctorat en Psiquiatria

Departament de psiquiatria i Medicina Legal

Facultat de Medicina

Universitat Autònoma de Barcelona

2019



**Universitat Autònoma
de Barcelona**

Magí Farré Albaladejo, Catedràtic de Farmacologia del Departament de Farmacologia, de Terapèutica i de Toxicologia de la Universitat Autònoma de Barcelona; i Maria Francina Fonseca Casals, Professora Associada del Departament de Psiquiatria i Medicina Legal de la Universitat Autònoma de Barcelona; i Marta Torrens Melich, Professora Titular del Departament de Psiquiatria i Medicina Legal de la Universitat Autònoma de Barcelona.

FAN CONSTAR:

Que la memoria presentada per Roser Martínez Riera amb el títol:” uso terapeutico de isoflavonas de la soja en el trastorno por consumo de cocaína, ha estat realitzada sota la seva direcció i reuneix les condicions per ser presentada per optar al grau de Doctor.

I perquè consti als efectes oportuns signen el present certificat a Barcelona, a 15 de juliol de 2019.

Magí Farré Albaladejo Maria Francina Fonseca Casals Marta Torrens Mélich

Signatura

Signatura

Signatura

...A Javi, Unai y Mireia con todo mi amor

Agradecimientos

A todas y cada una de las personas que me han ayudado en la realización de esta tesis doctoral, quiero dar mi más sincero agradecimiento, porque sin ellas nada de esto hubiera sido posible.

A mis directores de tesis, Magí, Francina y Marta, por darme esta oportunidad y haber confiado en mi. Agradecerles su apoyo, comprensión y motivación a lo largo de estos años. Por haber tenido el privilegio de trabajar con ellos, aprender de ellos, por haberme guiado y ayudado constantemente en todos los momentos, por su paciencia infinita y dedicación hacia mi y por su amistad. A Magí por su confianza, cercanía, por todo lo que me ha enseñado y he podido aprender de él. A Francina por ser amiga y darme los consejos y ayuda cuando los necesitaba. A Marta por haberme enseñado tanto durante estos años y haber sabido guiarme en todo momento con cariño y profesionalidad. Gracias de todo corazón.

A todos los coautores de los artículos, mis gracias infinitas, sin los que nada de esto hubiera sido posible.

A mis compañeros y amigos del Parc de Salut Mar, por ayudarme en todo lo que necesitaba y por todos los años que hemos compartido juntos.

A todos los participantes del estudio, sin los que no se podría haber llevado a cabo esta investigación.

A mis padres, por su amor y por transmitirme desde pequeña la importancia de creer en uno mismo y del esfuerzo para conseguir lo que uno quiere.

A mis suegros por su amor y facilitarme la logística familiar para poder dedicar las horas necesarias para redactar esta tesis.

Al resto de mi familia y a mis amigas por quererme, entenderme y escucharme siempre que lo necesito.

A Javi, mi compañero de vida, por su amor incondicional, por ser marido, amigo y un padre increíble. Gracias por apoyarme a lo largo de estos años, por ser mi fan número uno, por entenderme y por darme los consejos y calma que

necesitaba en cada momento de este largo proceso. A mis dos pequeños, Unai y Mireia, a los que espero transmitir el valor del trabajo bien hecho y por haber entendido que “mami a veces trabaja muchas horas con el ordenador”.

Gracias a todos.

ÍNDICE

RESUMEN	13
ABSTRACT	14
ABREVIATURAS	15
1. INTRODUCCIÓN	17
1.1. Cocaína	17
1.1.1. Epidemiología del consumo de cocaína	17
1.1.2. Formas de Presentación y farmacocinética	21
1.1.3. Farmacología de la cocaína	23
1.1.4. Trastornos relacionado con el consumo de cocaína	27
1.1.4.1. Criterios DSM-5	27
1.1.4.2. Criterios WHO, CIE-11	31
1.1.5. Complicaciones del consumo de cocaína	35
1.1.5.1. Somáticas	35
1.1.5.2. Psiquiátricas	35
1.1.6 Tratamiento del Trastorno por Consumo de Cocaína	36
1.1.6.1 Tratamiento farmacológico	36
1.1.6.2 Tratamiento psicológico	42
1.2 Isoflavonas	43
1.2.1 Características principales y usos	43
1.2.2 Efectos secundarios	44
1.2.3 Metabolización	44
1.2.4 Isoflavonas como Inhibidores selectivos de la aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2)	45
1.2.5 Isoflavonas y su uso en Trastorno por Consumo de Sustancias	46
2.JUSTIFICACIÓN	49
3.HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	51
3.1. Hipótesis	51
3.1.1. Hipótesis generales	51
3.2.2. Hipótesis específicas	51

3.2. Objetivos	52
3.2.1. Objetivo general	52
3.2.2. Objetivos específicos	52
4.MATERIAL Y MÉTODO	53
5.RESULTADOS	57
5.1 Estudio 1	57
5.2 Estudio 2	67
5.3 Estudio 3	77
6.DISCUSIÓN GENERAL	104
7.CONCLUSIONES	109
8.BIBLIOGRAFÍA	111

RESUMEN

El proyecto pretende valorar una nueva terapia en el tratamiento del trastorno por consumo de cocaína. Recientemente se ha descubierto que un inhibidor de la enzima aldehído deshidrogenasa-2 reduce el consumo de cocaína en animales (ALDH2). Se trata de un derivado de la daidzina-daidzeína, una de las isoflavonas que contiene la soja. Los extractos de soja y la daidzina-daidzeína se han utilizado para el tratamiento del alcoholismo en animales y humanos. Se considera de interés conocer si puede ser eficaz en el trastorno por consumo de cocaína y si interfiere en el metabolismo del acetaldehído. Se desarrollaron tres ensayos clínicos en humanos: uno de farmacocinética a dosis única de diferentes preparados de extracto de soja para elegir uno y ser usado en los otros ensayos; otro mecanístico para evaluar la interacción entre el extracto de soja y el alcohol; y un tercero exploratorio para valorar la eficacia de un inhibidor natural de la ALDH2 (daidzina-daidzeína) en pacientes con trastorno por consumo de cocaína. El objetivo del estudio era evaluar la eficacia de un inhibidor selectivo de la ALDH2 de origen natural (daidzina-daidzeína, contenida en extracto de soja) en el tratamiento del Trastorno por Consumo de Cocaína y conocer si interfiere en el metabolismo del acetaldehído. Con la administración concomitante de extracto de soja y alcohol, no se observó alteración de signos vitales ni efectos subjetivos o adversos; por otro lado, ningún voluntario afecto de Trastorno por consumo de cocaína adquirió abstinencia completa, pero se observó una alta retención al tratamiento, una disminución de la severidad del consumo en la escala Severity Dependence Scale (SDS) y mejoría del estado de salud física en distintas áreas del SF-36 Health Survey. Nuestros resultados demuestran la no interferencia de daidzina-daidzeína con el metabolismo del acetaldehído y sugieren una posible función reduciendo la gravedad del consumo de cocaína. Así, la comorbilidad alcohol-cocaína, no sería criterio de exclusión en el posible uso de daidzina-daidzeína como tratamiento del consumo de cocaína.

ABSTRACT

The project aims to evaluate a new therapy in treating cocaine use disorder. Recently it was discovered that an inhibitor of the enzyme aldehyde deshidrogenada-2 (ALDH2) reduces cocaine use in animals. It is a derivative of daidzin-daidzein, one of the isoflavones contained in soy. Daidzin-daidzein and soy extracts have been associated with reductions of alcohol use in animals and humans. It is interesting to know whether it can be effective in cocaine use disorder and if it interacts in the metabolism of acetaldehyde. We carried out three clinical trials in humans: a single dose pharmacokinetics of different soy extract prepared to choose one to use in the other clinical trials; another mechanistic to assess the interaction between soy extract and alcohol; and a third exploratory to evaluate the efficacy of an inhibitor of aldehyde deshidrogenase-2 (daidzin-daidzein) in patients with a cocaine use disorder. The objective of the study was to evaluate the efficacy of an inhibitor of aldehyde deshidrogenase-2 (daidzin-daidzein, contained in soy extract) in the treatment of the cocaine use disorder and to know if interacts with the acetaldehyde metabolism. With the administration of soy extract and alcohol, it was not observed disturbance of the vital sings and subjective or adverse effects; on the other hand, no volunteer with cocaine use disorder reached hole abstinence, but a high retention in treatment, a decrease of the Severity Dependence Scale (SDS) and an improvement in the different areas of the SF-36 Health Survey was observed. Our results demonstrate that daidzin-daidzein did not interfere in the acetaldehyde metabolism and suggest a possible function decreasing the severity of cocaine consumption. Cocaine-alcohol comorbidity, would not be an exclusion criteria in the possible use of daidzin-daidzein like a treatment for cocaine consumption.

ABREVIATURAS

AEMPS: agencia española del medicamento y productos sanitarios

ALDH1: aldehído deshidrogenada-1

ALDH2: aldehído deshidrogenada-2

ASI-lite: Addiction Severity Index Lite

BE: benzoilecgonina

BSCS: Brief Substance Craving Scale

CGI: Clinical Global Impression

CIWA: Clinical Institute Withdrawal Assessment

CSSA: Cocaine Selective Severity Assessment

C-SSRS: Columbia Suicide Severity Rating Scale

DAT: transportador de la Dopamina

DBH: dopamina- β -hidroxilasa

DSM-5: Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders

EDADES: encuesta sobre el alcohol y otras drogas en España

ECG: electrocardiograma

EME: ecgonina metil éster

ESTUDES: encuesta sobre uso de drogas en enseñanzas secundarias en España

HAM-D: Hamilton Rating Scale for Depression

HRBS: HIV Risk-Taking Behavior Scale

NET: transportador de la Noradrenalina

NIDA: National Institute on Drug Abuse

OEDA: Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones

PNSD: Plan Nacional Sobre Drogas

PRISM: Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders

SERT : transportador de la serotonina

SDS: Severity Dependence Scale

SUR: Substance Use Report

TH: tiroxin hidroxilasa

THP: tetrahidropapaverolina

UNODC: Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito

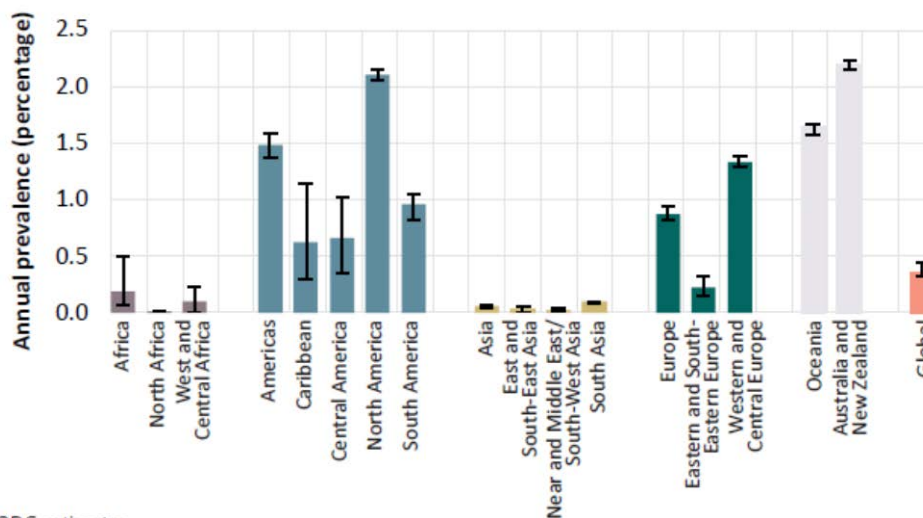
1. INTRODUCCIÓN

1.1. COCAÍNA

1.1.1. Epidemiología del consumo de cocaína

La cocaína es la tercera droga ilegal más consumida en el mundo, después del cannabis y las anfetaminas. La Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), en su último informe de 2019 (UNODC, 2019) indica que en 2017, 18 millones de personas habían utilizado cocaína al menos una ocasión en el último año. Esta cifra representa el 0.4% del total de la población global con una edad comprendida entre 15-64 años. En los últimos años, las regiones a nivel mundial más importantes de consumidores de cocaína han sido Norte América, Oceanía, Europa Occidental y Central. Estas regiones, que a la vez han experimentado crecimiento en los últimos años, en 2017 se les estimaron datos de prevalencia de uso de cocaína de: Oceanía 2.2%, Norte América 2.1%, Europa Occidental y Central 1.3% y Sud América 1% (Figura 1).

Figura 1. Uso de cocaína a nivel mundial por subregiones en 2017 (%).



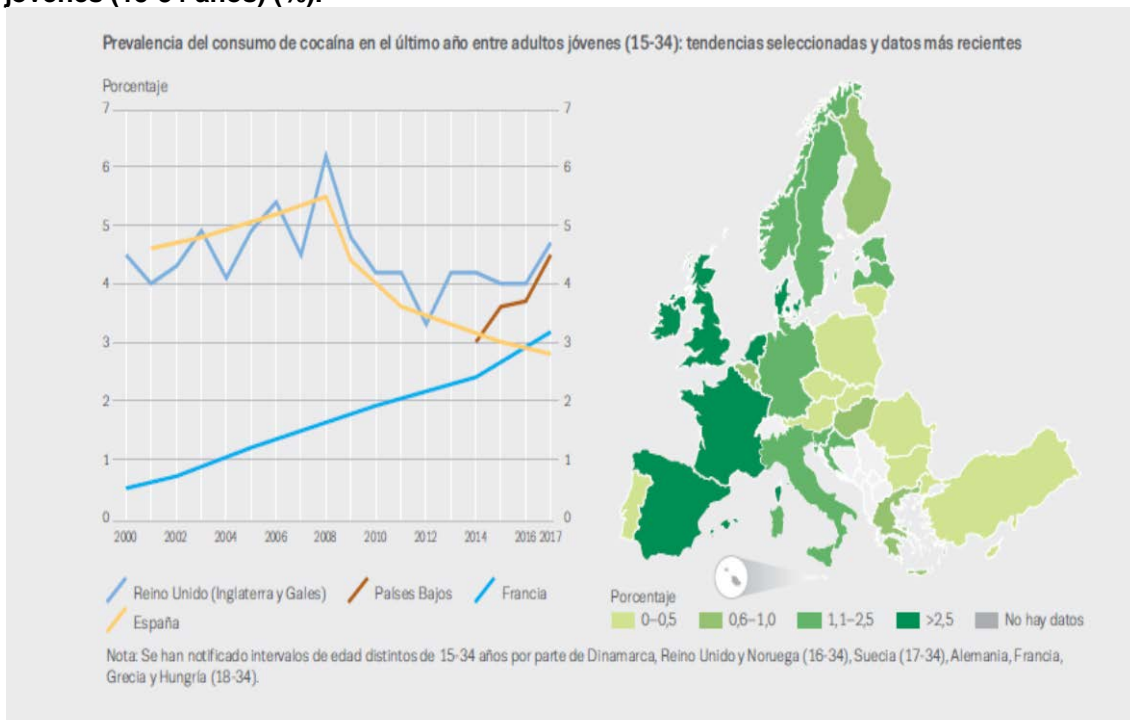
Source: UNODC estimates.

UNODC, 2019

Según datos del informe presentado por el Observatorio Europeo sobre las Drogas y las toxicomanías de 2019, la cocaína es la droga estimulante más consumida en Europa, su consumo aumenta en los últimos años y los datos de prevalencia son mayores en los países del sur y oeste. Se estima que 3.9

millones de personas habían utilizado cocaína al menos una vez en el último año, que representa un 1.2% del total de la población entre 15-64 años y 33500 personas iniciaron tratamiento por primera vez para esta sustancia. Entre los adultos jóvenes (15-34 años) 2.6 millones habían consumido droga en el último año (2.1%) (Figura 2). Tres países en Europa (España, Italia y el Reino Unido) tienen las mayores tasas de inicio de tratamiento para el consumo de cocaína, suman un 73% en total. Según datos de prevalencia a lo largo de la vida, el primer país es el Reino Unido (10.7%) y en segundo lugar se encuentra España (10.4%) (European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction ,EMCDDA, 2019).

Figura 2. Prevalencia en Europa del consumo de cocaína en el último año en adultos jóvenes (15-34 años) (%).



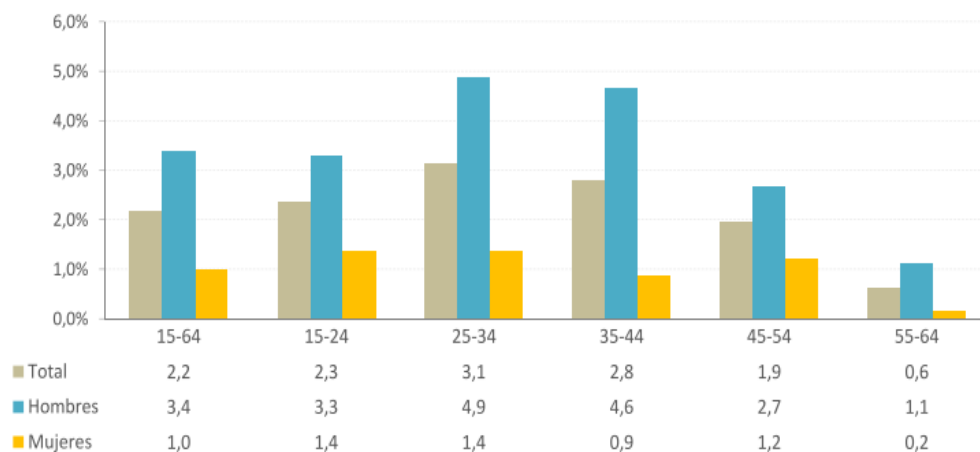
Observatorio Europeo sobre las Drogas y las toxicomanías, 2019

En España, la encuesta EDADES de 2017 que realiza el Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA) dentro del Plan Nacional sobre Drogas (PNSD)(OEDA, 2017) refleja que la cocaína en España después del cannabis, es la sustancia ilegal que se consume con mayor frecuencia. Después del cannabis, la cocaína es la sustancia ilegal que se considera de mayor facilidad de acceso en 24 horas (42.3% de la población entre 15-64 años) y son cifras

similares a la encuesta anterior de 2015. En dicha encuesta, el 10.3% de la población entre 15-64 años refería haber consumido cocaína alguna vez en su vida (este valor ha tenido un incremento de 1.1 puntos porcentuales en la cocaína en polvo respecto 2015 y un 0.5 en el caso de la cocaína base), un 2.2% en los últimos 12 meses y un 1.1% en los últimos 30 días. La edad media de inicio de consumo de cocaína en polvo era de 21.1 años en 2017, siendo en España minoritario el consumo de cocaína en base con una edad de inicio superior a 23 años. En cuanto a las diferencias de género, se apreciaba como la prevalencia de consumo durante el último año fue mayor entre los hombres (3,4%) que entre las mujeres (1%) y como estas diferencias se incrementaban entre los 25-44 años (Figura 3). Valorando datos de incidencia (consumo por primera vez), 85000 individuos consumieron cocaína en el último año y en los hombres se apreciaron mayores tasas y tasas superiores entre los 15-24 años.

Figura 3. Prevalencia en España del consumo de cocaína en el último año según el sexo y la edad en adultos jóvenes (15-34 años) (%).

Prevalencia de consumo de cocaína polvo y/o base en los últimos 12 meses, según sexo y edad (%). España, 2017.



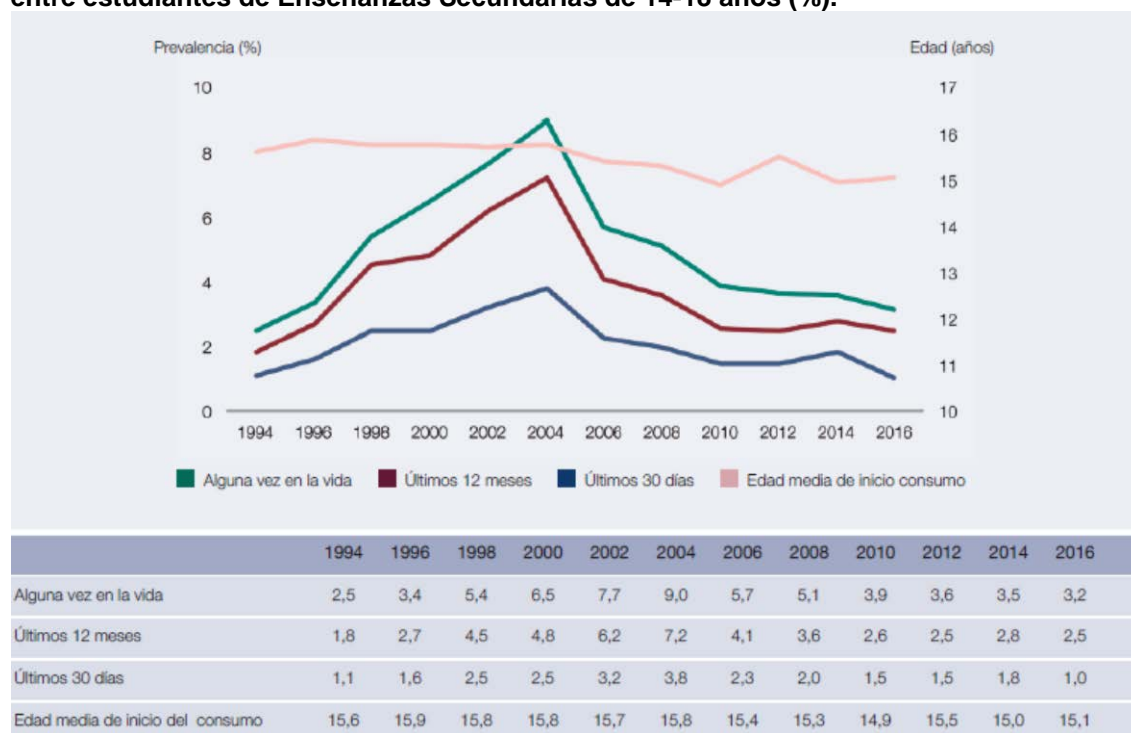
FUENTE: OEDA Encuesta sobre Alcohol y Drogas en España (EDADES)

EDADES, 2017

La encuesta sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias en España (ESTUDES) de 2018, que realiza el Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA) dentro del Plan Nacional sobre Drogas (PNSD), refleja la tendencia en los últimos años al descenso de la proporción de estudiantes

entre 14 y 18 años que han consumido cocaína, siendo en 2016 un valor del 3.2 % los que habían consumido en alguna ocasión. Por otro lado, el consumo de cocaína tiene mayor prevalencia entre los chicos en todos los tramos de edad y de hecho, se apreció en 2016 un descenso de la prevalencia entre las chicas respecto al año anterior. Desde 2004 la edad media del primer consumo se ha ido reduciendo partiendo de 16 años hasta en 2016, que se situaba cerca de los 15 años, siendo igual en ambos sexos (Figura 4). Entre los 17 y 18 años se produce el mayor incremento de prevalencia de consumo de cocaína, tanto en chicas (17 años 3% versus 18 años 5%) como chicos (17 años 5.3% versus 18 años 10.4%) (OEDA, 2018).

Figura 4. Evolución de la prevalencia del consumo de cocaína y edad media del consumo entre estudiantes de Enseñanzas Secundarias de 14-18 años (%).



FUENTE: OEDA. Encuesta sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias en España (ESTUDES).

ESTUDES, 2018

La comorbilidad alcohol-cocaína, como describe el Observatorio Español sobre drogas es elevada (OEDA, 2017); de hecho, el patrón de policonsumo es elevado entre los pacientes afectados por un Trastorno por Consumo de cocaína, siendo las principales drogas el alcohol y el cannabis. Según los datos de EDADES, si se analizan los consumidores de riesgo de alcohol (escala

AUDIT ≥ 8), un porcentaje del 10.7 refería haber consumido cocaína en el último mes; en cambio, en los que no se consideraban consumidores de riesgo, el porcentaje era 0,7%. Estudios estiman datos superiores a un 60% de consumo de alcohol en pacientes con Trastorno por Consumo de Cocaína (Araos et al., 2017; Singh, 2019).

El informe del Observatorio Español sobre drogas 2017(OEDA, 2017), aporta datos sobre el número de admisiones a tratamiento por Trastorno por Consumo de drogas ilegales que hubo en 2015, las cifras fueron de 47.308 y se observó como la cocaína fue la que presentaba mayores tasas (36,6%). En cuanto a las cifras de admisiones a tratamiento por primera vez, la cocaína fue la que se representó en segundo lugar (35.5%) siendo la primera el cannabis (47%). Entre los admitidos a tratamiento por cocaína en 2015, la principal vía de consumo fue la intranasal o esnifada (83.5%), la segunda fue la fumada (12,9%) y tercera la inyectada (0,4%). Del conjunto de admitidos a tratamiento por consumo de cocaína, el perfil más frecuente sería un varón de 36 años que acude por primera vez y por iniciativa propia, con estudios primarios/secundarios y trabajando o parado habiendo trabajado previamente, que no consume a diario y que el alcohol y el cannabis son también drogas utilizadas de forma concomitante. Analizando por otro lado cifras de atenciones en urgencias por consumo de sustancias psicoactivas, en 2015, la cocaína fue la sustancia que requirió con mayor frecuencia observando valores de 43,4% (5.238 episodios). En los estudios de Trastornos por Uso de Sustancias, un factor que se considera de elevada importancia para valorar los resultados, es la adherencia o retención a tratamiento. En el caso del Trastorno por Consumo de cocaína, a lo largo del tiempo, las tasas de adherencia al tratamiento se han mantenido similares con valores iguales o inferiores al 50%. El estudio de los factores de predicción de retención o abandono de tratamiento se considera primordial, pero hasta la actualidad no existen datos consistentes (Stotts et al.,2007).

1.1.2. Formas de presentación y farmacocinética

La cocaína es un alcaloide derivado de las hojas del arbusto *Erythroxylon coca*, es originario de América del Sur, donde se mastican las hojas de coca por sus

propiedades estimulantes desde hace siglos. Fue sintetizada por primera vez en el siglo XIX por Albert Niemann (1860), por sus efectos como anestésico local y posteriormente Carl Koller (1884) inició su uso como anestésico en la práctica clínica para cirugía oftálmica y luego se extendió su uso como anestésico. Debido a la capacidad toxicológica y adictiva de la cocaína, en ese mismo siglo se inició la investigación relacionada con la síntesis de alternativas anestésicas y en 1892 se sintetizó la procaína, que fue usada con posterioridad como anestésico local sustituto (O'Brien, 2018).

Los efectos psicoestimulantes de la cocaína tras su administración se podrían resumir en: sensación de placer y euforia, aumento del rendimiento intelectual y del estado de alerta, disminución del cansancio y del sueño.

La cocaína se encuentra en diferentes formas de presentación (Kaplan & Sadock, 2015):

- Hojas de coca: contienen un 0,5-1% de cocaína.
- Pasta base de coca: se obtiene al tratar las hojas de coca con queroseno o gasolina combinado con ácido sulfúrico. Contiene sulfato de cocaína entre un 40-70%. La vía de consumo es la fumada mezclada con tabaco o cáñamo.
- Clorhidrato de cocaína: es una sal cristalina en forma de polvo blanco que se obtiene a partir de la pasta básica mezclada con diversas sustancias como el éter y el ácido clorhídrico. La vía de consumo es intranasal o intravenosa y su riqueza en cocaína es variada.
- Cocaína base y crack: se obtiene al procesar el clorhidrato de cocaína con bicarbonato de sodio y éter, obteniendo un alcaloide sólido que se consume por vía fumada denominado cocaína base. En el mismo proceso, se obtienen unas "piedras" de pureza muy elevada también consumidas por vía fumada.

Existen tres vías posibles de consumo de cocaína: intranasal (más frecuente), inyectada y fumada. Las dos últimas son las que se consideran de mayor riesgo, debido a que sus efectos son más intensos, cortos y conllevan mayor riesgo de consumo compulsivo y desarrollo de un Trastorno por Consumo Grave (el-Guebaly et al., 2015). Una vez se consume cocaína a través de la vía

esnifada, el efecto máximo aparece a los 15-30 minutos y alcanza su concentración máxima a los 30-45 minutos con una duración de 3-4 horas.

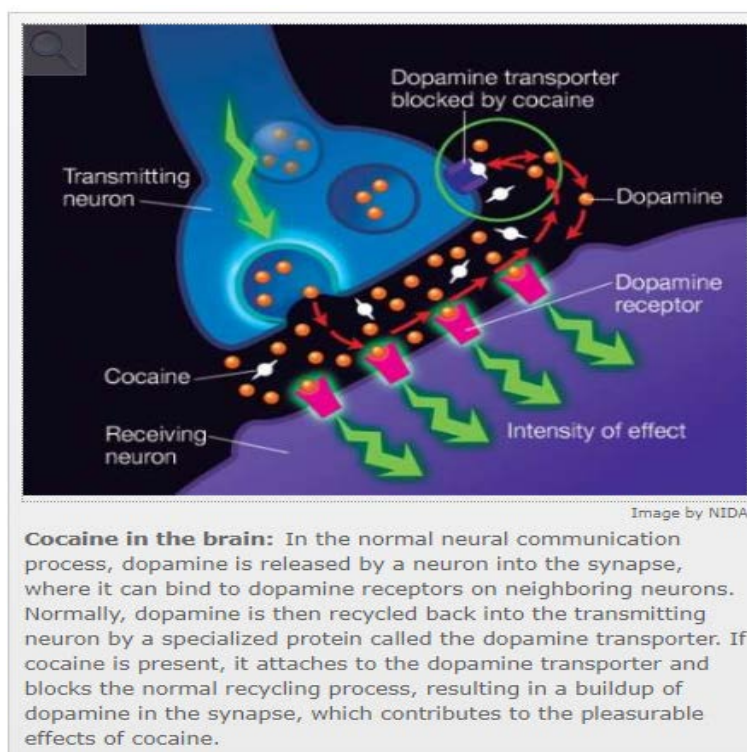
Los principales metabolitos de la cocaína son benzoilecgonina (BE, 40%) y la ecgonina metil éster (EME, 50%), ambos inactivos. La producción de benzoilecgonina se debe a la hidrólisis espontánea y a una carboxilesterasa hepática. Posteriormente, la Ecgonina metil éster se produce por la actividad de las esterasas plasmáticas y hepáticas (pseudocolinesterasas) (O'Brien, 2018). La cocaína tiene una semivida de eliminación de 0.5-1.5 horas, BE 6-8 horas y EME 3-8 horas (Farré et al., 1993; Farré et al., 1997). La determinación de dichos metabolitos en orina, puede darse a lo largo de 2-5 días después del consumo.

Como ya se ha comentado a nivel epidemiológico, las tasas de consumo simultáneo de alcohol y cocaína son elevadas; y cuando esto ocurre, la cocaína se transforma a través de una carboxilesterasa hepática en un metabolito activo, el cocaetileno (benzoiletilococaína), que es un etil éster de la benzoilecgonina. El cocaetileno, es equivalente a la cocaína en cuanto al nivel de actividad bloqueando transportadores de neurotransmisores y sus dosis alcanzan hasta un 20% del total (O'Brien, 2019), la diferencia es su semivida de eliminación más prolongada (Farré et al., 1997; Liu et al., 2018).

1.1.3. Farmacología de la cocaína

La cocaína a nivel molecular actúa a través de la inhibición de los transportadores de monoaminas de la membrana neuronal presináptica (especialmente la dopamina-DAT, pero también de la serotonina-SERT o y la noradrenalina-NET), bloquea la recaptación de estos neurotransmisores y como consecuencia incrementa sus concentraciones en el espacio sináptico (Camí y Farré, 2003; Volkow et al., 2009) (Figura 5).

Figura 5. Mecanismo de acción de la cocaína a nivel molecular.



<https://www.drugabuse.gov/publications/research-reports/cocaine/how-does-cocaine-produce-its-effects>

El consumo agudo de cocaína, produce los efectos característicos de un potente psicoestimulante. A nivel del sistema nervioso, se pueden observar síntomas como sensación de alerta, euforia, incremento del rendimiento intelectual, incremento del rendimiento psicomotor, reducción de la fatiga y de las horas de sueño y hiporexia. Estos síntomas de tipo cognitivo como pueden ser la euforia, sensación de placer o bienestar, son los que se relacionan con el consumo repetitivo por su papel de reforzadores positivos. A nivel molecular, los síntomas agudos mencionados, se deben a la acción de la cocaína en los circuitos cerebrales de recompensa, provocando el incremento de los niveles de dopamina en el núcleo estriado y como consecuencia una mayor ocupación de los receptores postsinápticos dopaminérgicos (Fowler et al., 2001). En el caso del principio activo cocaetileno, consecuencia del consumo concomitante de alcohol y cocaína, también se observa principalmente su capacidad para bloquear al transportador de dopamina (DAT) a nivel presináptico en el núcleo

accumbens, y produce un incremento de la sensación de euforia y del refuerzo positivo (Liu et al., 2018).

Con el consumo agudo de cocaína, también se observa la aparición de síntomas como midriasis, incremento de la temperatura corporal, bruxismo, hipertensión arterial y aumento de la frecuencia cardíaca, que se explican a nivel molecular por el incremento de las concentraciones de adrenalina, norepinefrina, cortisol, corticotropina y factor liberador de corticotropina (Sarnyai et al., 2001). La acción aguda a nivel molecular de la cocaína, tanto a nivel del sistema nervioso central como periférico puede provocar clínica psiquiátrica, neurológica, cardíaca e incluso la muerte.

Una vez se establece el consumo repetitivo de cocaína y éste pasa a ser crónico, se desarrolla un Trastorno por Consumo de Cocaína, que conlleva cambios neuroadaptativos que modulan las funciones de recompensa, motivación, función ejecutiva y inhibición de conducta, circuitos de condicionamiento y memoria. Se observan fenómenos como la tolerancia, el consumo en atracones y la abstinencia. A nivel molecular se desarrolla una disfunción del sistema dopaminérgico debido a la reducción de la disponibilidad del transportador de dopamina en el sistema nervioso central que conlleva una disminución de la liberación de dopamina en el núcleo estriado y una disminución de la sensibilidad del sistema de recompensa, que como consecuencia lleva al consumo repetitivo (Koob y Volkow, 2010; Volkow et al., 2009) y frecuentemente al patrón de consumo en atracones, es decir, compulsivo. A pesar de que se desarrolle una disfunción de los sistemas de recompensa, la cocaína tiene la capacidad de estimularlos de una manera más potente que cualquier otro estímulo natural, es capaz de activarlos y esto explica el desarrollo del fenómeno de tolerancia en que la persona consume dosis cada vez más elevadas para conseguir los mismos efectos.

En el momento que desaparecen los efectos de la cocaína, se observa la clínica de abstinencia (disforia, fatiga) y un intenso deseo de consumo ("craving"). Estudios mediante PET y RMf (Baler y Volkow, 2006; Volkow y Morales, 2015) relacionan la abstinencia y la intensidad del deseo de consumo

con la intensidad de activación de las estructuras mesolímbicas (amígdala y su extensión). La clínica abstinencial implica neurotransmisores como la corticorelina (corticotropin-releasing factor, CRF), noradrenalina (NA) y dinorfina (implicada en el afecto negativo o refuerzo negativo). El deseo intenso de consumo se ha visto relacionado con el glutamato (Koob y Volkow, 2010; Zorrilla et al., 2012).

A nivel estructural, una vez establecido el consumo crónico de cocaína, se aprecia la disminución de la funcionalidad del córtex prefrontal y de la sustancia gris (Figura 6). Diferentes estudios han apreciado como esta hipofuncionalidad conlleva los cambios a nivel cognitivo mencionados anteriormente, como pueden ser la capacidad para valorar riesgos, tomar decisiones, la constancia y el incremento de la impulsividad (Hirsiger et al., 2019; Verdejo-Garcia et al., 2014; Volkow et al., 2011; Volkow et al., 2010).

Figura 6. Correlación entre la disponibilidad de receptores D2 y el metabolismo en regiones prefrontales cerebrales.

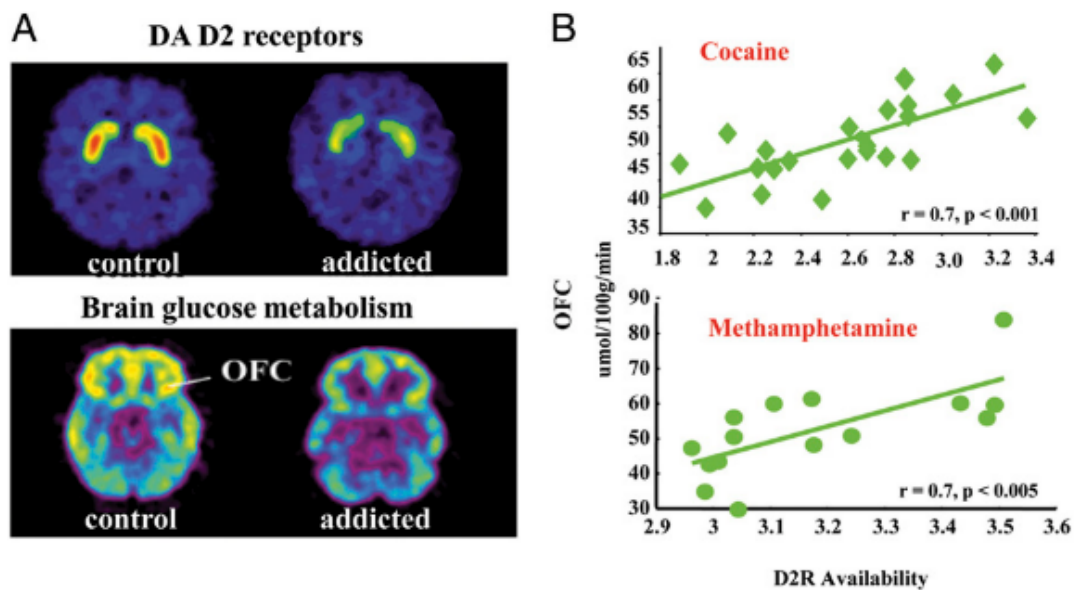


Fig. 4. Correlations between striatal D2R availability and metabolism in prefrontal brain regions. (A) Axial brain images for a control and for a cocaine-addicted subject for baseline images of D2R availability in striatum (obtained with [¹¹C]raclopride) and of brain glucose metabolism in OFC (obtained with [¹⁸F]FDG). (B) Correlations between striatal D2R and metabolism in OFC in cocaine-addicted and methamphetamine-addicted subjects. Reprinted from ref. 13, Copyright (2009), with permission from Elsevier.

Volkow, 2011

1.1.4. Trastorno relacionados con el consumo de cocaína

1.1.4.1. Criterios DSM5:

A continuación, se detallan los criterios DSM5 para la Intoxicación (Tabla 1), Abstinencia (Tabla 2), Trastorno por Consumo (Tabla 3) y la lista de posibles Trastornos Inducidos (Tabla 4).

Tabla 1. Criterios DSM5 para la Intoxicación por Estimulantes.

<p>A. Consumo reciente de una sustancia anfetamínica, cocaína u otro estimulante.</p> <p>B. Comportamiento problemático o cambios psicológicos clínicamente significativos (p. ej. euforia o embotamiento afectivo, cambios en la sociabilidad, hipervigilancia, sensibilidad interpersonal, ansiedad, tensión o rabia; comportamientos estereotípicos, juicio alterado) que aparecen durante o poco después del consumo de un estimulante.</p> <p>C. Dos (o más) de los signos o síntomas siguientes que aparecen durante o poco después del consumo de un estimulante:</p> <ol style="list-style-type: none">1. Taquicardia o bradicardia.2. Dilatación pupilar.3. Tensión arterial elevada o reducida.4. Sudoración o escalofríos.5. Náuseas o vómitos.6. Pérdida de peso.7. Agitación o retraso psicomotores.8. Debilidad muscular, depresión respiratoria, dolor torácico o arritmias cardíacas.9. Confusión, convulsiones, discinesias, distonías o coma. <p>D. Los signos o síntomas no se pueden atribuir a ninguna otra afección médica y no se explican mejor por otro trastorno mental, incluida una intoxicación con otra sustancia.</p>
--

Tabla2. Criterios DSM5 para la Abstinencia Estimulantes.

A. Cese (o reducción) de un consumo prolongado de una sustancia anfetamínica, cocaína u otro estimulante.

B. Humor disfórico y dos (o más) de los siguientes cambios fisiológicos, que aparecen en el plazo de unas horas o varios días tras el Criterio A:

1. Fatiga.
2. Sueños vívidos y desagradables.
3. Insomnio o hipersomnias.
4. Aumento del apetito.
5. Retraso psicomotor o agitación.

C. Los signos o síntomas del Criterio B provocan un malestar clínicamente significativo o deterioro en lo social, laboral u otras áreas importantes del funcionamiento.

D. Los signos o síntomas no se pueden atribuir a ninguna otra afección médica y no se explican mejor por otro trastorno mental, incluidas una intoxicación o abstinencia de otra sustancia.

Gawin y Kleber (1986) describieron diferentes fases de la abstinencia a cocaína. En función del momento en que se encuentre el individuo, esto determinará el tratamiento sintomático que precisa, debido a que no existe un tratamiento específico para abordar la clínica de abstinencia de cocaína. Las distintas fases son:

1. Fase aguda (Crash): 4-9 días

1.1. Inicial: agitación, depresión, anorexia, craving (+++).

1.2. Media: fatiga, depresión, insomnio, aumento del deseo de dormir, craving (-).

1.3. Tardía: agotamiento, hipersomnias, hiperfagia, sin craving.

2. Abstinencia: 1 -10 semanas

2.1. Inicial: normalización del sueño, eutimia, craving (+/-), ansiedad baja.

2.2. Media y tardía: anhedonia, anergia, ansiedad, craving (+++), estímulos condicionados que exacerban el craving.

3. Extinción: duración indeterminada: respuesta hedónica normal; estado de ánimo eutímico, craving episódico, estímulos condicionados que exacerban el craving.

Tabla 3. Criterios DSM5 para el Trastorno por Consumo de Estimulantes.

A. Un modelo de consumo de sustancias anfetamínicas, cocaína u otros estimulantes que provoca un deterioro o malestar clínicamente significativo y que se manifiesta al menos por dos de los hechos siguientes en un plazo de 12 meses:

1. Se consume el estimulante con frecuencia en cantidades superiores o durante un tiempo más prolongado del previsto.

2. Existe un deseo persistente o esfuerzos fracasados de abandonar o controlar el consumo de estimulantes.

3. Se invierte mucho tiempo en las actividades necesarias para conseguir el estimulante, consumirlo o recuperarse de sus efectos.

4. Ansias o un poderoso deseo o necesidad de consumir estimulantes.

5. Consumo recurrente de estimulantes que lleva al incumplimiento de los deberes fundamentales en el trabajo, la escuela o el hogar.

6. Consumo continuado de estimulantes a pesar de sufrir problemas sociales o interpersonales persistentes o recurrentes, provocados o exacerbados por sus efectos.

7. El consumo de estimulantes provoca el abandono o la reducción de importantes actividades sociales, profesionales o de ocio.

8. Consumo recurrente de estimulantes en situaciones en las que provocan un riesgo físico.

9. Se continúa con el consumo de estimulantes a pesar de saber que se sufre un problema físico o psicológico persistente o recurrente probablemente causado o exacerbado por ellos.

10. Tolerancia, definida por alguno de los siguientes hechos:

a. Una necesidad de consumir cantidades cada vez mayores de estimulantes para conseguir la intoxicación o el efecto deseado.

b. Un efecto notablemente reducido tras el consumo continuado de la misma cantidad de un estimulante.

11. Abstinencia, manifestada por alguno de los hechos siguientes:

a. Presencia del síndrome de abstinencia característico de los estimulantes.

b. Se consume el estimulante (o alguna sustancia similar) para aliviar o evitar los síntomas de abstinencia.

El DSM 5 define la gravedad del trastorno en 3 niveles:

Leve: Presencia de 2–3 síntomas

Moderado: Presencia de 4–5 síntomas

Grave: Presencia de 6 o más síntomas

Y la evolución de la remisión del trastorno la clasifica según:

En remisión inicial: no se ha cumplido ninguno de los criterios diagnósticos durante un mínimo de 3 meses (excepto el Criterio A4).

En remisión continuada: no se ha cumplido ninguno de de los criterios diagnósticos durante un periodo de 12 meses o más (excepto el Criterio A4).

Tabla 4. Lista de Trastornos Inducidos por el consumo de estimulantes.

1. Trastorno psicótico inducido por estimulantes
2. Trastorno bipolar inducido por los estimulantes
3. Trastorno depresivo inducido por estimulantes
4. Trastorno de ansiedad inducido por estimulantes
5. Trastorno obsesivo-compulsivo inducido por estimulantes
6. Trastorno del sueño inducido por estimulantes
7. Disfunción sexual inducida por estimulantes

1.1.4.2. Criterios WHO, CIE-11:

La clasificación según la CIE-11, describe los siguientes diagnósticos:

Intoxicación por cocaína

Condición transitoria clínicamente significativa que se desarrolla durante o poco después del consumo de cocaína y que se caracteriza por alteraciones de la conciencia, la cognición, la percepción, el afecto, el comportamiento o la coordinación.

Estas alteraciones están causadas por los efectos farmacológicos conocidos de la cocaína y su intensidad se relaciona estrechamente con la cantidad de cocaína consumida.

Las características comunes de presentación de la intoxicación por cocaína son euforia inadecuada, ansiedad, enojo, deficiencia de la atención, hipervigilancia, agitación psicomotora, ideación paranoide (algunas veces de una intensidad que lleva a las ideas delirantes), alucinaciones auditivas, confusión y cambios en sociabilidad. Se puede experimentar sudoración o escalofríos y náuseas o vómitos, y dolor en el pecho. Los signos físicos pueden incluir taquicardia, hipertensión y dilatación pupilar. En algunos casos más raros, habitualmente en la intoxicación más grave, puede haber convulsiones, debilidad muscular, discinesia o distonía.

Síndrome de abstinencia de la cocaína

El síndrome de abstinencia de la cocaína es un conjunto clínicamente significativo de síntomas, comportamientos y características fisiológicas que varían en cuanto a su intensidad y duración y que se producen en el cese o la reducción del consumo de cocaína en los individuos que han desarrollado dependencia fisiológica, o han tomado cocaína durante un período prolongado o en grandes cantidades.

Las características de presentación del síndrome de abstinencia de la cocaína pueden incluir estado de ánimo disfórico, irritabilidad, fatiga, inercia, sueños

vívidos desagradables, insomnio o hipersomnias, aumento del apetito, agitación o enlentecimiento psicomotor y ansia de cocaína.

Episodio de consumo nocivo de cocaína

Se trata de un episodio único de consumo de cocaína que ha causado daños a la salud física o mental de una persona o que ha redundado en un comportamiento que conduce a daño a la salud de los demás. El daño a la salud de la persona puede deberse a una o varias de las siguientes posibilidades:

- 1) Comportamiento relacionado con la intoxicación.
- 2) Efectos tóxicos directos o secundarios en los órganos y sistemas del cuerpo.
- 3) Vía perjudicial de administración.

El daño a la salud de terceros incluye toda forma de daño físico, incluidos los traumatismos y de trastorno mental que puedan atribuirse directamente al comportamiento debido a la intoxicación por cocaína por parte de la persona a la que se está aplicando el diagnóstico de episodio único de consumo nocivo de cocaína.

Este diagnóstico no debe aplicarse si el daño se atribuye a un patrón conocido de consumo de cocaína

Patrón nocivo de consumo de cocaína

Se trata de un patrón de consumo de cocaína que ha causado daños a la salud física o mental de una persona o que ha redundado en un comportamiento que conduce a daño a la salud de los demás.

El patrón de consumo de cocaína es evidente durante un período de al menos 12 meses si el consumo es episódico y al menos un mes si el consumo es continuo (diario o casi a diario).

El daño a la salud de la persona puede deberse a una o varias de las siguientes posibilidades:

- 1) Comportamiento relacionado con la intoxicación.
- 2) Efectos tóxicos directos o secundarios en los órganos y sistemas del cuerpo.
- 3) Vía perjudicial de administración.

El daño a la salud de terceros incluye toda forma de daño físico, incluidos los traumatismos, y de trastorno mental que puedan atribuirse directamente al comportamiento debido a la intoxicación por cocaína por parte de la persona a la que se está aplicando el diagnóstico de patrón nocivo de consumo de cocaína.

Se clasifica en: episódico, continuo o no especificado

Dependencia de la cocaína

La dependencia de la cocaína es un trastorno de la regulación del consumo de la cocaína que surge de su consumo repetido o continuo. El rasgo característico es un fuerte impulso interno para consumir cocaína, que se manifiesta por la incapacidad para controlar el consumo, aumento de la prioridad que se da al consumo sobre otras actividades y persistencia del consumo a pesar del daño o las consecuencias negativas. Estas experiencias suelen ir acompañadas de una sensación subjetiva de impulso o necesidad imperiosa de consumir cocaína. Las características fisiológicas de la dependencia también pueden estar presentes, incluida la tolerancia a los efectos de la cocaína, los síntomas de abstinencia después del cese o la reducción en el consumo, o el consumo repetido de cocaína o sustancias farmacológicamente similares para prevenir o aliviar los síntomas de la abstinencia.

Las características de la dependencia suelen ser evidentes durante un período de al menos 12 meses, pero el diagnóstico se puede hacer si el consumo de cocaína es continuo (diario o casi diario) durante al menos 1 mes.

Se clasifica en: consumo actual, remisión completa temprana, remisión parcial prolongada, remisión completa prolongada o sin especificación.

Delirium inducido por cocaína

El delirium inducido por cocaína se caracteriza por un estado agudo de perturbación de la atención y conciencia con características específicas de delirio que se desarrollan durante o poco después de la intoxicación o la abstinencia del consumo de cocaína.

La cantidad y la duración del consumo deben ser capaces de producir un delirio.

Los síntomas no se explican mejor por un trastorno mental primario, por el consumo o la abstinencia de otra sustancia, o por otra afección de salud que no está clasificada como trastorno mental, del comportamiento o del neurodesarrollo.

Trastorno psicótico inducido por cocaína

El trastorno psicótico inducido por la cocaína se caracteriza por síntomas psicóticos (p. ej., delirios, alucinaciones, pensamiento desorganizado, comportamiento sumamente desorganizado) que se desarrollan durante o poco después de la intoxicación o la abstinencia de la cocaína.

La intensidad o la duración de los síntomas son sustancialmente superiores a los trastornos psicóticos de percepción, cognición o comportamiento que son característicos de la intoxicación por cocaína o el síndrome de abstinencia.

La cantidad y duración del consumo de cocaína deben ser capaces de producir síntomas psicóticos.

Los síntomas no se explican mejor por un trastorno mental primario (por ejemplo, esquizofrenia, un trastorno del estado de ánimo con síntomas psicóticos), como podría ser el caso si los síntomas psicóticos hubieran precedido al inicio del consumo de cocaína, si los síntomas persistieran durante un período sustancial después de la interrupción del consumo o la abstinencia, o si existiese otro indicio de un trastorno mental primario preexistente con síntomas psicóticos (por ejemplo, antecedentes de episodios anteriores no asociados con el consumo de cocaína).

Otros trastornos inducidos por la cocaína:

- Trastorno del estado de ánimo inducido por cocaína
- Trastorno de ansiedad inducido por cocaína
- Trastorno obsesivo compulsivo u otro trastorno relacionado inducido por cocaína
- Trastorno del control de los impulsos inducido por cocaína

Otros trastornos específicos debidos al consumo de cocaína

Trastornos debidos al consumo de cocaína, sin especificación

1.1.5. Complicaciones del consumo de cocaína (Textbook of Addiction Treatment: International Perspectives, 2015)

Se pueden experimentar diferentes complicaciones con el consumo de cocaína, ya sea durante la situación de intoxicación, a nivel agudo o crónico.

1.1.5.1. Somáticas:

- Enfermedades cardiovasculares: hipertensión, taquicardia, disección aórtica, isquemia miocárdica, arritmias ventriculares, miocardiopatía dilatada.
- Enfermedades neurológicas: hemorragia subaracnoidea, estatus epiléptico.
- Enfermedades respiratorias: pneumotórax, edema agudo de pulmón.
- Enfermedades digestivas: isquemia intestinal, hepatotoxicidad.
- Rabdomiólisis
- Enfermedades renales: insuficiencia renal, glomerulonefritis, nefrotoxicidad, isquemia renal
- Enfermedades infecciosas: VIH, VHC, Tuberculosis, ETS

1.1.5.2. Psiquiátricas (ver DSM 5 y CIE-11)

Se añade a estas complicaciones, el hecho de que el consumo de cocaína predispone a un mayor riesgo de alteraciones conductuales bajo sus efectos como agresividad y conductas de riesgo (sexuales, conducción de

vehículos...); pero también bajos los efectos del síndrome de abstinencia, debido a los síntomas tanto físicos como psíquicos que puede presentar.

En el caso del consumo alcohol y cocaína concomitantes, las complicaciones que presentan se caracterizan por ser más complejas. Se ha relacionado a este grupo de pacientes con una mayor gravedad global, con mayor número de conductas de riesgo, mayor problemática a nivel psicopatológico (mayor número de intentos de suicidio) y disfunción social, familiar, laboral y legal (Heil et al., 2001). Por otro lado, también se ha descrito una atenuación de los efectos adversos de la cocaína tras el consumo de alcohol, como la agitación o inquietud o clínica psicótica (Liu et al., 2018); sin embargo, el principio activo cocaetileno, se relaciona con mayor número de complicaciones cardiovasculares y mayor riesgo de muerte. En estos pacientes se ha observado una peor respuesta al tratamiento, requiriendo de intervenciones más complejas y intensivas y estudios específicos de efectividad y tolerancia (Kampman et al., 2013). La causa de esta mayor complejidad se relaciona tanto por las interacciones farmacodinámicas como el condicionamiento psicológico (Liu et al., 2018).

1.1.6. Tratamiento del Trastorno por Consumo de Cocaína

En la actualidad no disponemos de un tratamiento estándar eficaz para el abordaje del Trastorno por Consumo de Cocaína. Existen aproximaciones a nivel farmacológico y psicológico que se describen a continuación.

1.1.6.1. Tratamiento farmacológico

A nivel farmacológico, si el individuo se encuentra en estado de intoxicación, debido a la variabilidad de síntomas que se pueden presentar en dicho momento, el tratamiento es soporte-sintomático en función de la clínica y no existe un antídoto específico que revierta su efecto.

En cuanto al abordaje del Trastorno por Consumo de Cocaína, no disponemos en el momento actual de fármacos específicos que puedan modular los

cambios neuroadaptativos provocados por el consumo crónico de cocaína. Los datos epidemiológicos en cuanto a prevalencia y impacto, reflejan que la búsqueda de un fármaco efectivo, es de clara importancia. Las líneas de investigación se basan en los diferentes sistemas de neurotransmisión relacionados con la acción de la cocaína (Kohut y Bergman, 2017) (dopaminérgico, gabaérgico o glutamaérgico, serotoninérgico o adrenérgico); pero a pesar de algunas aproximaciones, persisten datos con baja evidencia:

1) ANTICONVULSIVOS (Alvarez et al., 2010; Minozzi et al., 2015):

El estudio de diferentes fármacos anticonvulsivantes se ha basado en la acción de los neurotransmisores GABA y glutamato modulando la función dopaminérgica. Diferentes metanálisis concluyen que todos estos fármacos, hasta el momento no demuestran eficacia.

Álvarez et al. (2010), realizaron un metanálisis incluyendo los 15 estudios que cumplían los criterios: randomizados, doble ciego y comparados con placebo; donde se estudiaban carbamazepina, fenitoína, ácido valproico, tiagabina, gabapentina, lamotrigina y topiramato; incluyendo 1236 pacientes. No se observaron diferencias respecto a placebo sobre la retención a tratamiento y analizando controles de orina positivos, sólo topiramato mostró mejoría (Kampan, 2004), pero se trataba de una muestra pequeña (n=40).

Minozzi et al. (2015), incluyeron 20 estudios cumpliendo los criterios de ser randomizados y comparados con placebo con 2068 pacientes. En ellos se analizaban: carbamazepina, gabapentina, lamotrigina, fenitoína, tiagabina, topiramato y vigabatrina. La conclusiones fueron que los fármacos anticonvulsivos no muestran eficacia superior a placebo, por lo que no tendrían la indicación para el Trastorno por Consumo de cocaína.

2) PSICOESTIMULANTES (Castells et al., 2010; Castells et al., 2016; Pérez-Mañá et al., 2011)

Pérez-Mañá et al. (2011), realizaron un metanálisis con 29 estudios que cumplieran las características de ser randomizados, en paralelo, controlados con placebo, con una muestra total de 2467 participantes, analizando

diferentes fármacos con acción indirecta como agonistas dopaminérgicos (modafinilo, selegilina, bupropion, disulfiram, metilfenidato, dexamfetamina, mazindol, l-DOPA-carbidopa). Las conclusiones fueron que estos fármacos mejoraban la consecución de la abstinencia de las sustancias psicoestimulantes, pero no la retención; a la vez, ningún estudio se consideró libre de sesgos.

En el metanálisis más reciente realizado por Castells et al. (2016), se incluyeron 26 estudios con un total de 2366 participantes y se analizaron los siguientes fármacos: bupropion, dexamfetamina, lisdexamfetamina, metilfenidato, modafinilo, mazindol, metamfetamina, mezcla de sales de anfetamina y selegilina. En el análisis se encontró una baja retención a tratamiento, factor a considerar como posible sesgo en la interpretación de los resultados encontrados. Los resultados obtenidos mostraron una leve calidad de evidencia de que los psicoestimulantes mejoraban el mantenimiento de la abstinencia, pero no se apreciaba una reducción del uso de cocaína en los que mantenían el consumo ni mejora de la retención. Se observó una ligera mejoría en los pacientes en tratamiento con metadona en el mantenimiento de la abstinencia a heroína y cocaína. Por otro lado, en el análisis específico por fármacos, bupropion y dexamfetamina, mostraron mayor proporción de adquisición de la abstinencia respecto a placebo.

3) ANTIDEPRESIVOS (Pani et al., 2011; Torrens et al., 2005; Torrens et al., 2011)

No existen evidencias hasta la actualidad, a favor del uso de antidepresivos en el Trastorno por Uso de Cocaína.

Torrens et al. (2005), observaron en su metanálisis, que el uso de antidepresivos en pacientes con Trastorno por Uso de Cocaína sin presentar un Trastorno Depresivo comórbido, no mostraba evidencia significativa de mejoría, analizando 14 estudios randomizados, controlado con placebo y doble ciego, con los siguientes antidepresivos: desipramina, bupropion, gepirona, fluoxetina, imipramina y ritanserina. Posteriormente, en el metanálisis realizado por Torrens et al. en 2011, analizando los pacientes con comorbilidad

depresión-cocaína, sólo el uso de desipramina mostraba una reducción del consumo de cocaína.

Pani et al. (2011), analizaron en su metanálisis 37 estudios con un total de 3551 y todos eran comparados con placebo. No se observaron diferencias en cuanto a la retención, si tasas mejores de abstinencia en los antidepresivos aunque sin ser estadísticamente significativas. Los antidepresivos evaluados fueron desipramina, fluoxetina, bupropion, nefazodona, ritanserina, buspirona, gepirona, paroxetina, citalopram, venlafaxina, selegilina, triptófano, sertralina y imipramina. En el análisis específico de fármacos tricíclicos, se incluyeron 5 estudios con un total de 367 participantes y 4 sólo usando desipramina con un total de 254 participantes, a pesar que los resultados eran favorables a los antidepresivos, no era estadísticamente significativo.

En contraste, tal y como se ha mencionado en el apartado de psicoestimulantes, el uso de bupropion ha mostrado resultados positivos en estudios, por lo que probablemente sea necesario un mayor número de ensayos para valorar su posible eficacia, ya que hasta la actualidad se tienen datos sólo de un número reducido de sujetos.

4) ANTIPSIKÓTICOS (Álvarez et al., 2013; Indave et al., 2016, Farré et al., 2017)

Los diferentes metanálisis que se han llevado a cabo hasta la actualidad, analizando el uso de antipsicóticos en el Trastorno por Uso de Cocaína, tanto típicos como atípicos (risperidona, olanzapina, quetiapina, aripiprazol, haloperidol y reserpina), no muestran evidencias significativas respecto a su posible eficacia. Hay que considerar que se trata de muestras muy pequeñas y que se precisa de mayor número de estudios, sobre todo con los antipsicóticos con doble mecanismo de acción sobre la dopamina.

5) DISULFIRAM (Pani et al., 2010)

En el momento actual, disulfiram, cuyo mecanismo de acción se caracteriza por la interacción con la dopamina, es el tratamiento que ha demostrado resultados más positivos; pero igualmente no tiene indicación para el tratamiento del

Trastorno por Consumo de cocaína, debido a divergencias en los resultados de los estudios, siendo unos a favor (Gaval-Crux, 2009) y otros en contra (Carroll, 2016).

Pani et al. (2010), analizaron en su metanálisis 492 ensayos donde se comparaba disulfiram sólo o asociado con intervención psicosocial con no intervención o placebo u otros tratamientos. Al comparar disulfiram con placebo, se observó en 2 estudios (131 participantes) una tendencia a favor de disulfiram en cuanto al número de abandonos. Al comparar disulfiram con naltrexona, 3 estudios (131 participantes) mostraron una tendencia a favor de disulfiram en cuanto al número de abandonos. Al comparar disulfiram con la no intervención, un estudio (90 participantes) reflejó diferencias estadísticamente significativas a favor de disulfiram en cuanto al máximo de semanas de abstinencia sostenida y número de sujetos que consiguieron 3 o más semanas de abstinencia sostenida. Así, a pesar de observarse una leve evidencia a favor de disulfiram, se requiere un mayor número de estudios randomizados.

La hipótesis del mecanismo de acción de disulfiram sobre el consumo de cocaína, observada en estudios con animales, se basa en su acción como inhibidor del enzima dopamina- β -hidroxilasa (DBH), el cual se encarga de metabolizar la dopamina hacia norepinefrina. Como consecuencia a esta acción, disulfiram incrementaría la concentración de dopamina en algunas áreas cerebrales pero no a nivel extracelular, normalizando así los niveles de dopamina en los consumidores crónicos, los cuales como hemos comentado anteriormente están alterados. A la vez, se produciría una reducción del efecto noradrenérgico ligado el refuerzo positivo del consumo de cocaína (Gaval-Crux y Weinshenker, 2009; Schroeder et al., 2010; Weinshenker, 2010) (Figura 7).

Figura 7. Mecanismo de acción de disulfiram sobre la dopamina

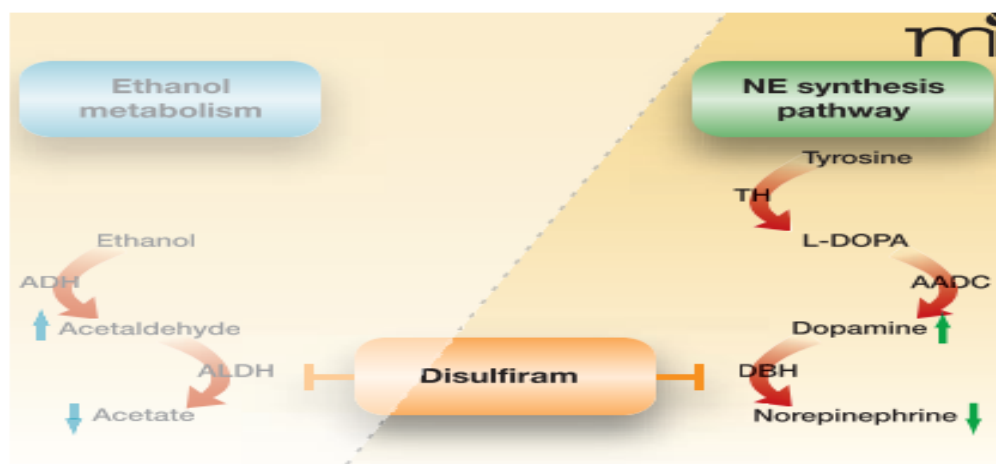


Figure 3. Disulfiram inhibition of the norepinephrine (NE) biosynthetic pathway. In the catecholamine synthesis pathway, tyrosine is converted into 3,4-dihydroxy-L-phenylalanine (L-DOPA) by tyrosine hydroxylase (TH), which is then transformed into dopamine by aromatic amino acid decarboxylase (AADC), whereupon dopamine b-hydroxylase (DBH) converts dopamine into norepinephrine. Disulfiram inhibits DBH, reducing the production of norepinephrine and increasing the pool of dopamine.

Gaval-Crux, 2009

A pesar de la posible efectividad de disulfiram sobre el consumo de cocaína, su uso tiene una importante limitación: el consumo concomitante de alcohol. Disulfiram actúa como potente inhibidor irreversible de la aldehído deshidrogenasa-1 (ALDH-1), provocando el conocido como efecto disulfiram, en que se incrementan las concentraciones de acetaldehído en sangre si se consume alcohol y se producen los siguientes efectos indeseables: náuseas, vómitos, mareos, sudoración, enrojecimiento facial. La efectividad de disulfiram se relaciona con estos efectos adversos en el Trastorno por Consumo de Alcohol; pero si queremos tratar el consumo de cocaína, sería una contraindicación su uso si persiste el consumo de alcohol. Debido a que los datos epidemiológicos, muestran una elevada prevalencia del uso concomitante alcohol-cocaína, se puede considerar una limitación importante en el uso de dicho fármaco.

Por otro lado, analizando desde la perspectiva de diferencias de género, existen algunos resultados que reflejan que disulfiram es menos efectivo en

mujeres en cuanto al uso para el Trastorno por Consumo cocaína (DeVito et al., 2014).

6) VACUNAS Y ANTICUERPOS (Evans et al., 2016; Kosten et al., 2014; Wetzel, 2017):

Se trata de estrategias terapéuticas basadas en la administración de agentes periféricos bloqueadores de la cocaína que frenan su entrada en el SNC. Se encuentran en desarrollo, su acción se relaciona con la capacidad de promover la producción de anticuerpos contra la cocaína o bien su rápida degradación en la sangre.

1.1.6.2.Tratamiento psicológico

Hasta el momento actual, no existe abordaje psicoterapéutico específico que se haya demostrado superior al resto; pero igualmente se considera importante ya sea de manera individual o grupal, para fomentar la adquisición de abstinencia o prevenir recaídas.

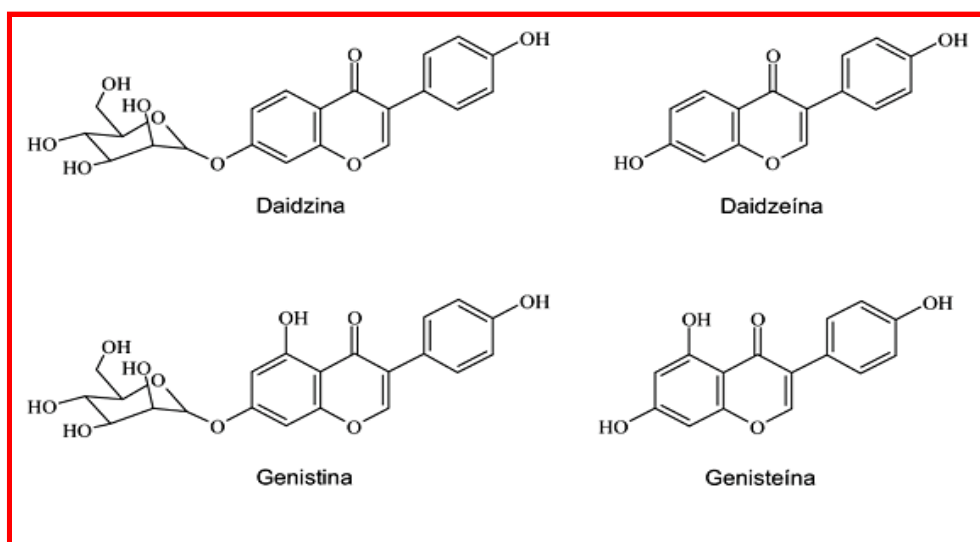
Así, con la evidencia que tenemos hasta la actualidad, cuando un paciente acude a tratamiento para el trastorno por consumo de cocaína, hay que individualizar caso a caso y elegir el abordaje farmacológico y psicoterapéutico más adecuado. La elección del abordaje, dependerá por un lado de las características de presentación del propio trastorno y su gravedad; y por otro lado, de diferentes factores como la presencia o no de patología somática o la existencia de Trastornos Psiquiátricos no relacionados con Sustancias comórbidos, en que se necesitará la introducción de pautas farmacológicas adecuadas a cada uno de ellos y abordajes psicoterapéuticos específicos. Además, en función del estado del paciente, habrá que decidir cómo se realiza la desintoxicación inicial y posterior prevención de recaídas (es decir, tratamiento intrahospitalario, ambulatorio, comunidad terapéutica) y que medidas de soporte se toman, como son la realización de controles de orina.

1.2. ISOFLAVONAS

1.2.1 Características principales y usos

Las isoflavonas, son polifenoles activos que se encuentran en la soja y otras leguminosas y su actividad biológica más conocida es como antioxidantes y fitoestrógenos (Figura 8).

Figura 8. Estructura molecular de las isoflavonas



Las principales isoflavonas son daidzina y genistina que se transforman en dos compuestos activos, la daidzeína y la genisteína, respectivamente (U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2015). La daidzina también se metaboliza en equol a través de la acción de las bacterias intestinales.

En los países occidentales se ingiere una dosis promedio diaria baja de isoflavonas (< 1 mg/d), pero en los países asiáticos es alta de 40-50 mg/d y en Japón es de 200 mg/d. Su consumo se ha relacionado con una menor incidencia de osteoporosis, cáncer de mama, síntomas menopáusicos (Messina, 2014; Michelfelder, 2009; Pastor, 2006) y enfermedades cardiovasculares (Michelfelder, 2009). La explicación a los efectos beneficiosos descritos de las isoflavonas, se debería a su mayor selectividad por los receptores estrogénicos tipo beta respecto el estradiol, actuando así a nivel de sistema nervioso central, vasos sanguíneos, hueso y tracto urogenital. Por otro

lado, el efecto protector sobre el cáncer de mama se relacionaría con la hipótesis de no actuar sobre el receptor alfa estrogénico. Los síntomas menopáusicos (sofocos) y su disminución con la ingesta de isoflavonas, se relacionarían con la hipótesis de su acción como agonista estrogénica sobre el centro termorregulador hipotalámico.

Hay que decir que hasta la actualidad, los estudios clínicos se han limitado a ser epidemiológicos para evaluar la posible efectividad de las isoflavonas en síntomas menopáusicos, a nivel cardiovascular y endocrinológico sobre el ciclo menstrual. Estos estudios han podido demostrar los beneficios del uso de isoflavonas en los niveles de colesterol, síntomas menopáusicos y osteoporosis; por el contrario, la prevención del cáncer de próstata y de mama no se han obtenido datos concluyentes (Michelfelder, 2009).

1.2.2 Efectos indeseables

El consumo de isoflavonas se considera seguro y según la AEMPS, su indicación actualmente aprobada es para el tratamiento de la clínica menopáusica, específicamente los sofocos (las dosis recomendadas oscilan entre 1-2 cápsulas al día: 40-80 mg de isoflavonas totales/día). A la venta se encuentran diferentes preparados de extractos de soja que contienen isoflavona, pueden ser desde medicamentos, productos de parafarmacia o suplementos alimentarios y en diferentes concentraciones. En España algunos tienen autorización como especialidades farmacéuticas publicitarias, y por tanto de venta sin receta.

Los efectos indeseables principales de las isoflavonas son gastrointestinales (diarrea) y menos frecuentes cefaleas, mareo, amenorrea, molestias musculoesqueléticas y prolongación del período menstrual (Michelfelder, 2009).

1.2.3 Metabolización

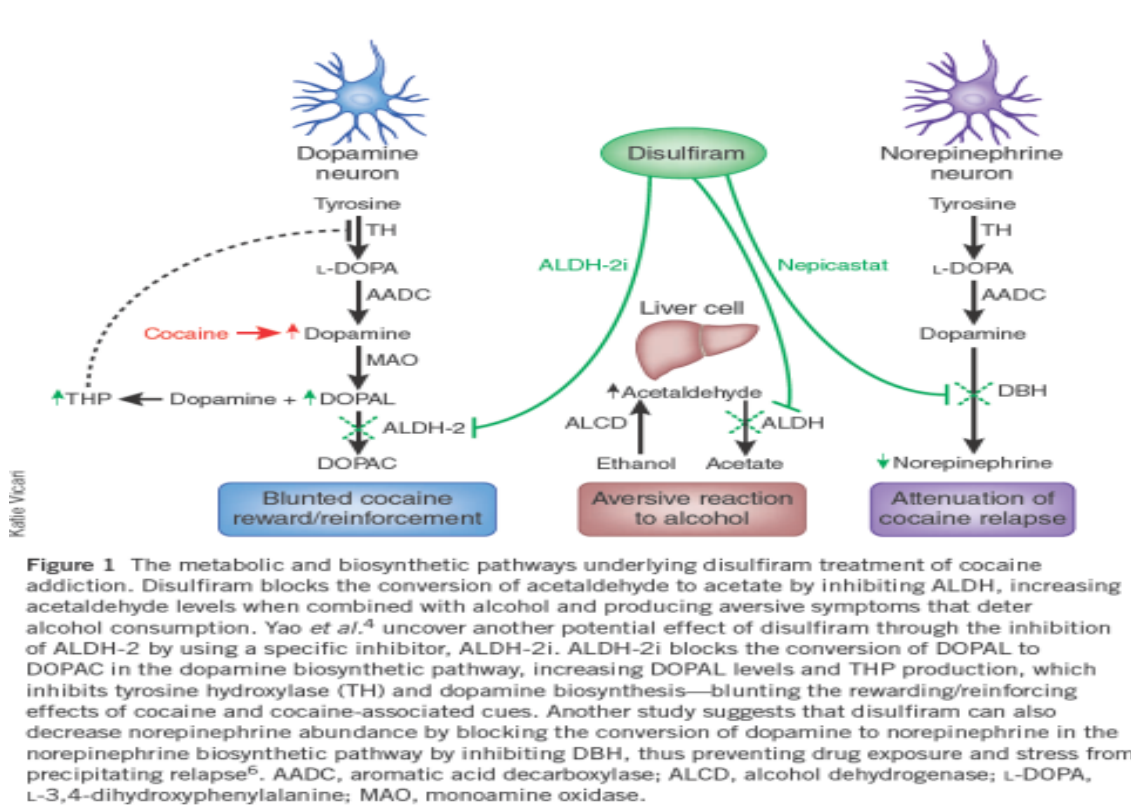
La acción enzimática de las bacterias intestinales, transforma a las isoflavonas (daidzina, genistina, glicitina) tras su ingestión oral, mediante glicólisis y desmetilación en sus formas activas no glicosadas (agliconas). Posteriormente, las formas activas (genisteína, daidzeína, gliciteína) se absorben a través de la

mucosa intestinal de forma rápida, por absorción pasiva y circulan a nivel plasmático unidas a proteínas plasmáticas alcanzándose una elevada concentración plasmática. El tiempo medio para alcanzar la concentración plasmática máxima (t_{max}) de genisteína y daidzeína es de 6-8h. Una vez en plasma, los enzimas intestinales y hepáticos se encargan de su conjugación con ácido glucurónico y sulfato, excretándose posteriormente a nivel renal sobretodo y biliar dentro de las 24 horas tras su ingesta. La semivida de eliminación de la genisteína y daidzeína tiene valores entre 6-10h (Anupongsanugool et al., 2005; Rüfer et al., 2008); pero debido a su recirculación enterohepática a través de la desconjugación y reabsorción y posteriormente metabolización, existe dos picos en cuanto a concentraciones plasmáticas.

1.2.4 Isoflavonas como Inhibidores selectivos de la aldehído deshidrogenasa 2(ALDH2)

Algunas isoflavonas, en especial daidzina-daidzeína, actúan como inhibidores selectivos de la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2) (Gao et al., 2001; Lowe et al., 2008; Koppaka et al., 2012). A diferencia de disulfiram, que actúa como inhibidor irreversible de la ALDH1 y ALDH2, las isoflavonas son inhibidores selectivos reversibles de ALDH2, por lo que se debería presuponer su no efecto sobre el metabolismo del acetaldehído.

La inhibición de ALDH2 bloquea el metabolismo de la dopamina, es decir, la conversión del sustrato DOPAL a DOPAC aumentando sus niveles. Consecuentemente, DOPAC forma junto a la dopamina el producto de condensación tetrahidropapaverolina (THP) que se acumula en el área tegmental ventral. Los incrementos de niveles de THP disminuyen la biosíntesis y liberación de dopamina a través de la inhibición de la tirosina hidroxilasa (TH).



Weinschenker, 2010

1.2.5 Isoflavonas y su uso en Trastorno por Consumo de Sustancias

Durante siglos, la medicina tradicional china y japonesa ha utilizado extractos de raíz y de las flores del kudzu (*Pueraria lobata*) para tratar la resaca tras el consumo agudo de alcohol y el Trastorno por Consumo de Alcohol (Overstreet *et al.*, 2003). Dichos efectos podrían explicarse por la actividad biológica de daidzina y compuestos relacionados sobre la ALDH2 (Keung *et al.*, 2003; Soyku *et al.*, 2010).

Algunos estudios en modelos animales han podido observar como la daidzina y análogos sintéticos, tienen la capacidad de reducir el consumo de alcohol (Overstreet *et al.*, 1996; Gao *et al.*, 2003; Arolfo *et al.*, 2009). En los estudios realizados en humanos, se ha ensayado el extracto de kudzu para evaluar parámetros fisiológicos que pueden estar alterados en los consumidores de alcohol. En uno de estos estudios, no se encontró que la administración de un extracto de kudzu altera el ciclo sueño/vigilia, ni los parámetros de sueño, como hacen otras medicaciones en bebedores moderados, por lo que según los autores, podría ser un tratamiento de utilidad para el alcoholismo (Bracken *et*

al., 2011). En otro ensayo clínico, donde se administraba de forma aguda alcohol en voluntarios sanos, estos mismo autores no encontraron que la administración de kudzu alterara los efectos subjetivos del alcohol ni el rendimiento psicomotor, luego el posible beneficio terapéutico no parece deberse a que el kudzu modificara dichos efectos (Penetar et al., 2011). Existe un piloto no controlado donde se observó cómo tras la administración de extracto de Kudzu (1500 mg/d; 6% de daidzeína y daidzina), se reducía el consumo de alcohol en bebedores graves (Lukas et al., 2005). En ensayos controlados con voluntarios sanos, tras la administración de extracto de Kudzu, se apreció una disminución en el consumo de alcohol en parámetros como número de cervezas bebidas, disminución el tamaño del trago (sorbo) y aumento de la latencia entre tragos (sorbos) (Penetar et al., 2012; Penetar et al., 2015). Otro ensayo controlado con pacientes afectados de un Trastorno por Consumo de Alcohol observó también una reducción del consumo (Lukas et al., 2013) durante la administración de extracto de Kudzu a lo largo de 4 semanas.

En cuanto al consumo de cocaína, de acuerdo con el mecanismo de acción de los inhibidores de la ALDH2 descrito (Weinshenker, 2010), siendo capaces de inhibir la síntesis y la liberación de dopamina, se ha postulado en modelos animales su capacidad como supresores de la liberación de dopamina por parte de la cocaína, siendo capaces de reducir la autoadministración de cocaína así como la recaída inducida por estímulos ambientales (Yao et al., 2010; Martin et al., 2013). En la actualidad, no existen estudios realizados en humanos que evalúen el posible efecto de las isoflavonas o inhibidores de la ALDH2 sintéticos sobre el consumo de cocaína.

2. JUSTIFICACIÓN

A nivel mundial, la cocaína es la tercera droga de consumo ilegal más consumida; Europa, EEUU y Oceanía lideran el consumo mundial. Por otro lado, el patrón de consumo de cocaína, se caracteriza por una elevada prevalencia de uso concomitante de otras sustancias de abuso, en especial el alcohol.

A pesar de los datos de elevada prevalencia y como consecuencia de impacto en salud, en la actualidad no se dispone de fármacos específicos para tratar el Trastorno por Consumo de Cocaína. Las diferentes investigaciones, no han podido encontrar un tratamiento que muestre eficacia. Actualmente, el único que ha demostrado datos más eficaces es disulfiram; pero debido a su acción inhibiendo de forma irreversible la aldehído deshidrogenasa 1-ALDH1 (también inhibe de forma irreversible aldehído deshidrogenasa 2-ALDH2), su uso está totalmente contraindicado si se consume alcohol simultáneamente.

El mecanismo de acción de la cocaína se caracteriza por la inhibición de los transportadores de monoaminas de la membrana neuronal presináptica (especialmente la dopamina-DAT) y como consecuencia incrementa las concentraciones de monoaminas en el espacio sináptico. Diferentes isoflavonas, destacando la Daidzina, inhiben de forma selectiva la enzima ALDH2. Dicha inhibición, provoca un bloqueo en el metabolismo de la dopamina y por lo tanto, reduce la biosíntesis y liberación de dopamina a través de la inhibición de la tirosina hidroxilasa (TH). Por otro lado, se ha postulado que las isoflavonas no actúan sobre la ALDH1 y esta característica, nos hace extrapolar su seguridad con el consumo de alcohol comórbido.

No existen actualmente estudios en humanos que valoren el posible efecto de las isoflavonas en el Trastorno por Consumo de Cocaína. Sí existen estudios con animales que describen como las isoflavonas podrían reducir la liberación de dopamina por parte de la cocaína, teniendo esta acción efecto en sobre la repetición del consumo o las recaídas.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Esta tesis doctoral consta de tres estudios, de los cuales a continuación se describen las hipótesis y objetivos generales y específicos.

3.1 HIPÓTESIS

3.1.1. Hipótesis generales

-La administración de un inhibidor natural selectivo del aldehído deshidrogenasa de tipo 2-ALDH2 (daidzina-daidzeína, contenida en el extracto de soja) es eficaz en el tratamiento del trastorno por consumo de cocaína en pacientes ambulatorios, reduciendo el consumo de cocaína.

-El inhibidor natural de la ALDH2 puede administrarse con seguridad y tolerabilidad en pacientes con trastorno por consumo de alcohol concomitante.

3.2.1. Hipótesis específicas

Estudio 1: Farmacocinética a dosis única de diferentes preparados de extracto de soja para la elección de unos de ellos

La farmacocinética de los inhibidores naturales selectivos de la aldehído deshidrogenasa 2-ALDH2 (daidzina-daidzeína), puede variar según el producto utilizado.

Estudio 2: Evaluación de la seguridad de la combinación de isoflavonas y alcohol

La administración de isoflavonas conteniendo un inhibidor natural de la aldehído deshidrogenasa 2-ALDH2 (daidzina-daidzeína), no produce a las dosis administradas una interferencia en el metabolismo del alcohol y por lo tanto no se presentan síntomas relacionados con la acumulación de acetaldehído.

Estudio 3: Estudio piloto del uso de las isoflavonas de la soja en el tratamiento del Trastorno por Consumo de Cocaína

La administración de un inhibidor natural de la aldehído deshidrogenada de tipo 2-ALDH2 (daidzina-daidzeína, contenida en el extracto de soja) es eficaz en el

tratamiento del trastorno por consumo de cocaína en pacientes ambulatorios, reduciendo el consumo de cocaína y su gravedad.

3.2 OBJETIVOS

3.2.1. Objetivo general

Evaluar la posible eficacia de un inhibidor natural selectivo de la aldehído deshidrogenasa de tipo 2-ALDH2 (daidzina-daidzeína, contenida en el extracto de soja) en el tratamiento del Trastorno por Consumo de Cocaína y conocer si interfiere en el metabolismo del acetaldehído.

3.2.2. Objetivos específicos

Estudio 1: Farmacocinética a dosis única de diferentes preparados de extracto de soja para la elección de unos de ellos

Seleccionar un preparado de extracto de soja de entre los disponibles en el mercado.

Estudio 2 Evaluación de la seguridad de la combinación de isoflavonas y alcohol

Conocer si la administración de una dosis elevada de daidzina-daidzeína puede interaccionar de forma aguda con el alcohol.

Estudio 3: Estudio piloto del uso de las isoflavonas de la soja en el tratamiento del Trastorno por Consumo de Cocaína

Evaluar la posible eficacia de un inhibidor natural de la ALDH2 (daidzina-daidzeína, contenida en el extracto de soja) en pacientes con trastorno por consumo de cocaína.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

A continuación, se describen los materiales y metodología utilizados en los tres estudios que componen esta tesis doctoral, los 2 primeros han sido publicados y el tercero se encuentra pendiente de publicación.

Estudio 1: Farmacocinética a dosis única de diferentes preparados de extracto de soja para la elección de unos de ellos

-Diseño: estudio randomizado, cruzado, con un período de lavado de 3 días (2 sesiones experimentales) y abierto.

-Muestra: 12 voluntarios sanos.

-Se administraron 2 extractos de soja comercializados, a dosis equivalentes de isoflavonas según la descripción de la composición del fabricante:

-Super-Absorbable Soy Isoflavones® (LifeExtension, USA).

-Fitoladius® (Merck, España)

-Variables:

Principal: concentraciones plasmáticas de daidzeína.

Secundaria: concentraciones plasmáticas de genisteína.

Estudio 2: Evaluación de la seguridad de la combinación de isoflavonas y alcohol

-Diseño: estudio randomizado, cruzado y simple ciego.

2 sesiones experimentales:

1-Etanol 0,5 g/kg

2-Daidzina 80 mg + etanol 0,5 g/kg a las 2h

-Muestra: 10 voluntarios sanos.

-Variables:

Principal: concentraciones de etanol en sangre.

Secundarias: síntomas clínicos de reacción tipo disulfiram mediante la valoración de constantes vitales (PAS/PAD; FC; temperatura facial y oral) y efectos subjetivos/indeseables (escala ARCI y VAS).

Estudio 3: Estudio piloto del uso de las isoflavonas de la soja en el tratamiento del Trastorno por Consumo de Cocaína

-Diseño: estudio piloto, no controlado, unicéntrico, de 12 semanas de duración de tratamiento activo y 4 semanas de seguimiento. Todos los participantes recibieron el mismo tratamiento activo y la dosis se ajustó al contenido de daidzina-daidzeína del extracto de soja escogido, administrando 40mg a la mañana y 40mg a la noche. Los voluntarios participaron en un programa de incentivar económica. Las muestras de orina se recogieron 3 veces por semana.

-Muestra: 9 pacientes con Trastorno por Consumo de Cocaína según los criterios DSM-5.

-Variables:

Principal: la abstinencia de cocaína durante las tres últimas semanas de la fase de tratamiento (semana 10-12).

Secundarias:

-Porcentaje de muestras de orina negativas para los metabolitos de la cocaína (BE<150ng/ml y EME<15ng/ml) durante las 8 últimas semanas de la fase de tratamiento.

-La gravedad del Trastorno por Consumo de Cocaína evaluado mediante las puntuaciones del Addiction Severity Index (ASI-Lite), Severity Dependence Scale (SDS), Brief Substance Craving Scale (BSCS), Cocaine Selective Severity Assessment (CSSA) y el Clinical Global Impression (CGI).

A continuación se adjunta diagrama esquemático:

Visitas	Selección	Fase de tratamiento farmacológico						Alta	Seguimiento
		Semanas							
Semanas	-7 a día -1	0	2	4	6	8	10	12	16
Consentimiento informado	X								
Criterios de inclusión y exclusión	X	X							
Características demográficas	X								
Medicación concomitante	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Antecedentes médicos y de tratamiento	X								
Medicación		X	X	X	X	X	X		
Acontecimientos adversos		X	X	X	X	X	X	X	X
PRISM	X								
DSM-5	X								
ASI-Lite		X						X	
SUR	X	X	X	X	X	X	X	X	X
BSCS	X	X	X	X	X	X	X	X	X
SDS	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CSSA	X	X	X	X	X	X	X	X	X
CGI-S, CGI-I		X	X	X	X	X	X	X	X
HRBS		X						X	X
SF-36		X						X	X
HAM-D	X	X		X		X		X	X
C-SSRS	X	X		X		X		X	X
CIWA	X								
Cribaje de drogas	X	X		X		X	X	X	
Muestras de orina (variables)	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Análítica de sangre+sedimento	X				X			X	X
Test de embarazo	X	X			X			X	
Muestras de cabello	X				X			X	X
ECG	X							X	
Constantes Vitales	X	X	X	X	X	X	X	X	X

5. RESULTADOS

5.1. Estudio 1: Pharmacokinetic Comparison of Soy Isoflavone Extracts in Human Plasma

Rodríguez-Morató, J., Farré, M., Pérez-Mañá, C., Papaseit, E., Martínez-Riera, R., de la Torre, R., & Pizarro, N. (2015). Pharmacokinetic Comparison of Soy Isoflavone Extracts in Human Plasma. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63(31), 6946–6953. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.5b02891>.

Pharmacokinetic Comparison of Soy Isoflavone Extracts in Human Plasma

Jose Rodríguez-Morató,^{†,‡,§,||} Magí Farré,^{†,‡,§,||} Clara Pérez-Mañá,^{†,‡} Esther Papaseit,^{†,‡}
 Roser Martínez-Riera,^{#,⊥} Rafael de la Torre,^{*,†,‡,§} and Nieves Pizarro^{†,‡}

[†]Integrative Pharmacology and Systems Neuroscience Research Group, Neurosciences Research Program, IMIM (Hospital del Mar Medical Research Institute), Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003, Spain

[‡]Pompeu Fabra University (CEXS-UPF), Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003, Spain

[§]CIBER de Fisiopatología Obesidad y Nutrición, Santiago de Compostela 15706, Spain

[#]Department of Pharmacology, Therapeutics and Toxicology and Department of Psychiatry, Universitat Autònoma de Barcelona, UAB Campus, M Building, Barcelona 08193, Spain

[⊥]Institut de Neuropsiquiatria i Adiccions, Adiction Unit and IMIM, Dr. Aiguader 88, Barcelona 08003, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: The soy isoflavones daidzein and genistein produce several biological activities related to health benefits. A number of isoflavone extracts are commercially available, but there is little information concerning the specific isoflavone content of these products or differences in their bioavailability and pharmacokinetics. This study describes the development and validation of an analytical method to detect and quantify daidzein, genistein, and equol in human plasma using liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS). The method was applied in a crossover, randomized, bioavailability study. Twelve healthy volunteers were administered the same total isoflavones dose from two isoflavone supplement preparations (Super-Absorbable Soy Isoflavones (Life Extension, USA) and Fitoladius (Merck, Spain)). The pharmacokinetic parameters (AUC_{0-24}/dose and $C_{\text{max}}/\text{dose}$) of the isoflavones from the two preparations differed significantly. Such differences in bioavailability and kinetics may have relevant effects on the health benefits derived from their intake.

KEYWORDS: Soy isoflavone extracts, daidzein, genistein, equol, bioavailability, pharmacokinetics, clinical trial

INTRODUCTION

Many isoflavones act as phytoestrogens due to the fact that these compounds present similarities in chemical structure and properties to those of endogenous steroids (e.g., 17- β -estradiol). The most important dietary sources of isoflavones are soybeans and soy-derived foods. The soy isoflavone aglycones daidzein (4',7-dihydroxyisoflavone), equol (4',7-dihydroxy-3,4-dihydroisoflavone), and genistein (4',5,7-trihydroxyisoflavone) (see Figure 1) display a number of biological

activities that have been related to lower occurrences of cardiovascular diseases, osteoporosis, hormone-dependent cancers, adverse menopausal manifestations, and age-related cognitive decline.^{1,2}

To evaluate the importance of isoflavones in human health, it is necessary to have a better understanding of the bioavailability and pharmacokinetics of these compounds. Isoflavone disposition follows several deconjugation and conjugation steps. Soy and unfermented soy food isoflavones are mainly found as glycosides (e.g., daidzin, genistin, and glycitin); they display high hydrophilicity and molecular weights and are the object of a number of metabolic biotransformations. First, gut bacterial β -glucosidases³ and the gastric acidic pH carry out the hydrolysis of the sugar moiety. This facilitates the absorption process^{4,5} that takes place by passive diffusion in the upper small intestine.⁶ Then, the intestinal⁷ and hepatic⁸ phase II enzymes UDP-glucuronyl transferases and PAPS-sulfotransferases carry out the corresponding conjugation with glucuronic acid and sulfate. The excretion of these conjugates can be both renal and biliary, the later undergoing enterohepatic recirculation, which leads to deconjugation, reabsorption, and further metabolism.^{1,5} Most circulating isoflavones are in the form of

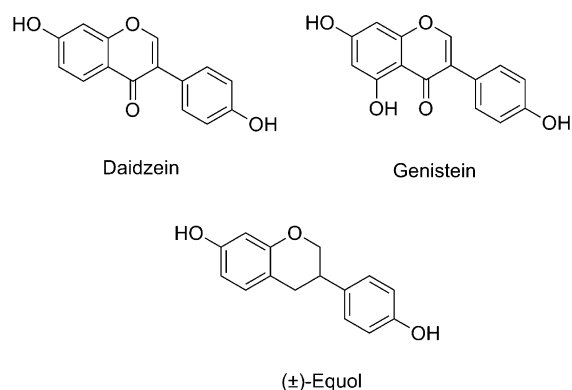


Figure 1. Chemical structures of daidzein, equol, and genistein.

Received: April 10, 2015

Revised: July 14, 2015

Accepted: July 17, 2015

Published: July 17, 2015

glucuronides,⁹ and a small fraction is sulfated or left unconjugated.¹ Although it is generally believed that aglycones are the most active biological compounds in humans, conjugates have also been postulated as displaying biological activities,¹⁰ and some of them, such as sulfates, have been reported to have higher activities than the corresponding aglycones.¹¹

Whereas daidzein and genistein are present in soy foods, equol is a metabolite of daidzein, the production of which depends upon the individual gut microflora;¹² only 30–50% of the adult Caucasian population is able to produce it.¹ Unlike daidzein or genistein, equol presents a stereogenic center at C-3, and therefore different enantiomeric forms exist. In humans, (*S*)-equol is the only enantiomer that is produced by intestinal bacterial flora.¹³ This fact is of clinical relevance because both enantiomers have different activities; (*S*)-equol, but no (*R*)-equol, displays high affinity for the estrogen receptor beta ($ER\beta$), and its activity is even higher than that of estradiol.¹³

Because of the beneficial health effects that soy isoflavones may provide to humans, several brands of isoflavone extracts have been commercialized over the past decades. However, there is little information concerning these preparations with respect to their specific isoflavone profile and quantity. Differences in bioavailability and pharmacokinetics may have an impact on isoflavone biological and pharmacological activities.

A number of analytical methods have been developed to detect and quantify isoflavone concentrations in biological fluids (plasma, serum, and urine). The most commonly used include gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS),¹⁴ high-performance liquid chromatography (HPLC) with electrochemical detection,¹⁵ HPLC with UV detection,¹⁶ and liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS).^{4,17} At present, LC-MS/MS is the most commonly employed analytical technique due to its high sensitivity and selectivity.

The aim of the present study was to develop and validate an LC-MS/MS method for bioavailability studies of commercial isoflavone preparations that would be subsequently used in clinical research. A randomized, crossover, bioavailability study of two different, commercially available soy isoflavone extracts (Super-Absorbable Soy Isoflavones (Life Extension, USA) and Fitoladius (Merck, Spain)) was performed.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals and Reagents. Daidzein, orthophosphoric acid (85%), β -glucuronidase from *Helix pomatia* (H-2 and H-1), β -glucuronidase from *Escherichia coli*, citric acid monohydrate, and sodium citrate dihydrate were purchased from Sigma-Aldrich Corp. (St. Louis, MO, USA). Equol and genistin were purchased from LC Laboratories (Woburn, MA, USA). Genistein was purchased from Extrasynthèse (Lyon, France). Daidzein-4-sulfate disodium salt, daidzein-7- β -D-glucuronide potassium salt, daidzein-7- β -D-glucuronide-4-sulfate disodium salt, and equol-4-sulfate were custom synthesized by Toronto Research Chemicals Inc. (Toronto, ON, Canada). Daidzein- d_6 and equol- d_4 were purchased from Medical Isotopes Inc. (Pelham, NH, USA). Methanol, acetonitrile (HPLC gradient grade), ammonium hydroxide, and acetic acid were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ultrapure water was obtained using a Milli-Q purification system (Millipore Ibérica, Barcelona, Spain). Drug-free plasma was obtained from the Hospital del Mar blood bank (Barcelona, Spain).

Working Standards. Standard stock solutions of all analytes and their corresponding internal standards (IS), with the exceptions of daidzein-7- β -D-glucuronide and daidzein-7- β -D-glucuronide-4-sulfate, where water was used, were prepared by dissolving 10 mg of each

substance in 10 mL of methanol. Working solutions were prepared by further diluting the starting solutions and were kept in dark flasks at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Instrumentation: LC-MS/MS Conditions. Identification and quantification analysis was performed using an Agilent 1200 series HPLC system (Agilent Technologies) coupled to a triple-quadrupole (6410 Triple Quad LC-MS; Agilent) mass spectrometer with an electrospray interface. Nitrogen was employed as a drying and nebulizing gas. A capillary voltage of 4 kV in negative ionization mode was used, and the source temperature was set to 325 $^{\circ}\text{C}$.

The liquid chromatographic separation of daidzein, equol, and genistein was performed at 40 $^{\circ}\text{C}$ on an Acquity UPLC BEH C_{18} column (100 mm \times 3.0 mm i.d., 1.7 μm particle size) (Waters Corp.). The mobile phase was an isocratic solvent system consisting of 0.01% ammonium acetate at pH 5 and methanol (40:60, v/v) at a flow rate of 0.3 mL/min. The injection volume was 10 μL . The total run time was 5 min per sample. All compounds were monitored in negative ionization using the multiple reaction mode. Daidzein and genistein were quantified by comparing their peak area ratios with that of daidzein- d_6 (IS1), whereas equol was quantified using equol- d_4 as internal standard (IS2). Due to the chemical structure similarities between daidzein and genistein, daidzein- d_6 was used as the internal standard of genistein.

Sample Preparation. First, a 1 mL aliquot of plasma sample was transferred into a glass tube and spiked with 30 μL of IS1 solution (containing daidzein- d_6 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) and 10 μL of IS2 (containing 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of equol- d_4). Approximately 3000 units of β -glucuronidase H1 (2 mg/mL, in 0.1 M sodium citrate buffer, pH 5) was added, and the sample was incubated at 37 $^{\circ}\text{C}$ for 16 h in a shaking water bath. Hydrolysis time could be reduced to 1 h if the temperature of the water bath was increased to 55 $^{\circ}\text{C}$.

After the sample had cooled to room temperature, 1 mL of 4% H_3PO_4 was added, and all of the tubes were centrifuged at 3500 rpm for 5 min. They were then submitted to a solid-phase extraction (SPE) procedure using Oasis MAX cartridges (3 cm^3 , 60 mg; Waters Corp., Dublin, Ireland). Cartridges were conditioned with 2 mL of methanol and equilibrated with 2 mL of water. After sample loading, interferences were washed away with 2 mL of 5% NH_4OH and 2 mL of 2% HCOOH containing 10% methanol. The compounds of interest were then eluted with 2 mL of a solution of methanol containing 2% HCOOH . After the evaporation of the solvent ($<29\text{ }^{\circ}\text{C}$, $<10\text{ psi}$), analytes were reconstituted in 100 μL of $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ 0.01%, pH 5/MeOH (50:50). Finally, samples were centrifuged at 12000 rpm for 10 min at 4 $^{\circ}\text{C}$ and supernatants analyzed by HPLC-MS/MS.

Method Validation. Calibration Curves and Linearity. Calibration standards of daidzein, equol, and genistein were prepared each analysis day and consisted of two replicates at six different concentrations (5, 50, 200, 500, 750, and 1000 ng/mL). Calibration curves were prepared by adding the appropriate volume of working solutions, evaporating the solvent under N_2 (25 $^{\circ}\text{C}$, 10 psi), and adding 1 mL of isoflavone-free plasma. Calibration curves with their corresponding slope (s), intercept, and correlation coefficient (r) were calculated by weighting ($1/x$) the least-squares linear regression of the peak area ratio (analyte/IS) versus the concentration of the standards. The method was considered linear if the coefficient of determination was >0.99 .

Intra-assay Accuracy and Precision. To evaluate the precision and accuracy of the method, quality control (QC) samples were prepared by spiking known amounts of the analytes to isoflavone-free human plasma to achieve final concentrations of 5 ng/mL (lower limit of quantification; LLOQ), 10 ng/mL (low QC), 100 ng/mL (medium QC), and 800 ng/mL (high QC) of daidzein, equol, and genistein. Five replicates of each QC were analyzed against the calibration curve, and the obtained concentrations were compared to their nominal value.

Intra-assay accuracy was expressed as the percent relative error of the estimated concentrations. It was evaluated by five replicates of the QC samples that were analyzed in 1 day, at each concentration level. Accuracy was acceptable if the mean concentration was within 15% of

the nominal values with the exception of the LLOQ, which was acceptable if it was within 20% of the nominal value.

Intra-assay precision of the method was calculated as the relative standard deviation (RSD, %) of the estimated concentrations obtained for five replicates of the QC samples that were analyzed in 1 day, at each concentration level. Precision was acceptable if the RSD was within 15% of the nominal values with the exception of the LLOQ, which was acceptable if it was within 20% of the nominal value.

Interassay Accuracy and Precision. Interassay accuracy and interassay precision were calculated as described for intra-assay accuracy and precision with data obtained during three validation assays that took place during three different days.

Limit of Detection (LOD). The LOD was calculated using the standard deviations (SD) of the obtained concentrations from five replicates of the LLOQ (5 ng/mL) and the slope (s) of the calibration curve, according to the following formula: $LOD = 3.3 \times (SD/s)$. Additionally, at the estimated LOD of the surrogated analytes, it was confirmed that the LOD was at least 3 times the signal-to-noise ratio of a blank plasma sample.

Lower Limit of Quantification (LLOQ). The LLOQ was the lowest concentration calibrator experimentally tested that presented acceptable accuracy (80–120%) and precision ($\pm 20\%$).

Extraction Recovery. The extraction process recovery was evaluated by comparing the responses of a mixture of standards with and without extraction. For this purpose, six different sources of isoflavone-free plasma were spiked at a low (5 ng/mL) and high (800 ng/mL) level of concentration. The extraction recovery was calculated as the quotient of response of standard solutions spiked into plasma before extraction (with standard) and the response of standard solutions spiked into plasma after extraction. Results are expressed as a percentage.

Matrix Effect. In a similar way, the matrix effect was analyzed using six different batches of isoflavone-free plasma at two concentrations (5 and 800 ng/mL). It was evaluated according to the following formula: $\% \text{ matrix effect} = 100 \times [(\text{response of the post extracted spiked sample} / \text{response of the nonextracted neat solvent with analytes}) - 1]$. A negative percent value indicated ion suppression, whereas a positive percent value indicated ion enhancement.

Stability. Stability of working solutions of daidzein, daidzein- d_6 , equol, equol- d_4 , and genistein in methanol was evaluated to ensure that neither sample preparation nor stored conditions could affect the concentration of the analytes. For this purpose, freeze and thaw stability, short-term stability at room temperature, and long-term stability in the freezer were evaluated.

Application to Real Samples: Quantification of Daidzein, Equol, and Genistein in Human Blood Samples. **Study Design.** A randomized, crossover, bioavailability study with a washout period of 3 days was performed. The study was conducted in accordance with the Helsinki Declaration, approved by the local Ethical Committee (CEIC-Parc de Salut Mar), and took place in the Clinical Research Unit of Hospital del Mar Medical Research Institute (IMIM, Barcelona, Spain). Written informed consent was obtained from all of the participants prior to any study-related procedure. Participants were financially compensated for any inconvenience caused.

Subjects. A total of 12 healthy, nonsmoker volunteers (4 females and 8 males), aged between 20 and 37 years (average 26.1 ± 5.5 years), were selected through a volunteer database. Their mean weight and height were 67.8 ± 10.3 kg and 172.5 ± 12.4 cm, respectively. The body mass index of each subject was within 19.6 and 25.4 kg/m² (22.7 ± 1.9 kg/m²). The women had regular menstrual cycles (26–32 days). Subjects underwent a general physical examination, complete chemistry and hematology blood test, urinalysis, and 12-lead ECG. Moreover, during the 3 days prior to the intervention, they were asked to follow a diet free from daidzin, genistin, daidzein, and genistein (including soybeans and soy-derived foods). A list of isoflavone-rich food was provided. Alcoholic beverages were not permitted 72 h prior to each intervention.

Commercial Isoflavone Preparations. The soy isoflavone preparations used in this study were two commercially available brands: Super-Absorbable Soy Isoflavones (Life Extension, USA; hard gelatin capsules) and Fitoladius (Merck, Spain; soft gelatin capsules). As

provided by the manufacturer, each capsule of Super-Absorbable Soy Isoflavones contains 123 mg of soy extract, with 54 mg of isoflavones (44%), 22 mg of which are daidzin and daidzein; 28 mg, genistin and genistein; and 6 mg, glycitin and glycitein. Each capsule of Fitoladius contains 60 mg of soybean seed extract (*Glycine max*), with 24 mg (40%) of total isoflavone content; the specific amounts of each isoflavone are not, however, described in the information leaflet.

Drug Administration and Sample Collection. The treatment with Super Absorbable Soy Isoflavones consisted of a single oral intake of 2 capsules (total dose = 108 mg of isoflavones), whereas that of Fitoladius was 4 capsules (total dose = 96 mg of isoflavones). The objective of this approach was to compensate the previously mentioned differences in isoflavone content of the extracts, as provided by the manufacturers (54 vs 24 mg in each capsule). On the intervention days, each volunteer received an oral dose of a soy isoflavone extract. To avoid batch-to-batch differences in isoflavone composition, all of the capsules of each treatment were from the same batch number. Moreover, as explained below, the composition of five different capsules corresponding to that batch was analyzed.

Subjects arrived at the clinical trial unit on the intervention day at 7:45 a.m. after an overnight fast. Spot urine samples were collected for drug testing (opiates, cocaine, amphetamines, and cannabis) by a rapid test device (Instant-View, Alpha Scientific Designs, Inc., Poway, CA, USA). In addition, a breath ethanol test was also conducted. A positive screen test was considered an exclusion criterion. Intervention days were separated by at least a 3-day washout period. An in-dwelling intravenous catheter was inserted into a subcutaneous vein in the forearm of the nondominant arm, and blood samples were collected at baseline and 1, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, and 24 h after treatment administration. Blood was collected into 10 mL tubes containing EDTA and centrifuged (3000 rpm, 10 min, 4 °C). The plasma samples were then separated and frozen at -20 °C until analysis.

Quantification of Isoflavones in Soy Extract Capsules. Although the treatment dosages (based on the information provided by the manufacturers) were designed to contain similar doses of isoflavones, it was expected that there would be differences in the plasmatic concentrations of specific isoflavones (e.g., genistein and daidzein) as in the Fitoladius preparation their composition was not declared. Consequently, it was necessary to measure the exact content of isoflavones of the capsules. The isoflavone content of the preparations [aglycones (daidzein and genistein) and β -glycoside conjugates (daidzin and genistin)] was determined by LC-MS/MS as follows: a sample stock solution (1 mg/mL) from each was prepared by dissolving 10.0 mg of capsule content in 10 mL of methanol and sonicating it for 5 min to achieve complete dissolution. Analysis solutions of 100 and 10 μ g/mL were prepared by further diluting the stock solution. One milliliter of the analysis solution, spiked with 30 μ L of a solution containing 10 μ g/mL daidzein- d_6 , was subjected to the previously described solid phase extraction procedure. Ten microliters of the solution was injected in the LC-MS/MS system. Each determination was performed by analyzing five different capsules corresponding to the same batch used for the study. The separation of the compounds was carried out using the same conditions described earlier. The aglycones were quantified directly, whereas the glycosides were quantified indirectly after hydrolysis. Calculations were based on the response factor of the ratio of the analyte versus internal standard.

Pharmacokinetic Analysis. The maximum plasma concentration (C_{\max}) and the time to reach C_{\max} (t_{\max}) were determined from the curves constructed by plotting the plasma concentrations over time. The terminal slope (k_e) of the concentration–time curve was determined by log–linear regression using at least the last three points. The elimination half-life ($t_{1/2}$) of the terminal log–linear phase was calculated following the equation $\ln 2/k_e$. The area under the curve (AUC_{0-24h}) was calculated by the trapezoidal method during the 24 h following the ingestion of the corresponding soy isoflavone extract. All of the plasma samples collected from each subject were analyzed in the same batch of analysis. To compare the pharmacokinetics of genistein and daidzein in both preparations, the AUC_{0-24h} and C_{\max} were adjusted for the dose administered (AUC_{0-24h}/dose and C_{\max}/dose). Taking into account that the

Table 1. MS/MS Condition Settings

compound	retention time (min)	collision energy (eV)	precursor ion (m/z^-)	product ion (m/z^-)	dwell (s)	fragmentor (V)
daidzein	2.53	30	253	223, 208, 195	0.03	120
daidzein- d_6	5.53	35	259	229, 214, 137	0.03	140
equol	2.87	10	241	146, 121, 93	0.03	80
equol- d_4	2.87	10	245	150, 138, 123	0.03	100
genistein	3.09	30	269	159, 133, 107	0.03	120

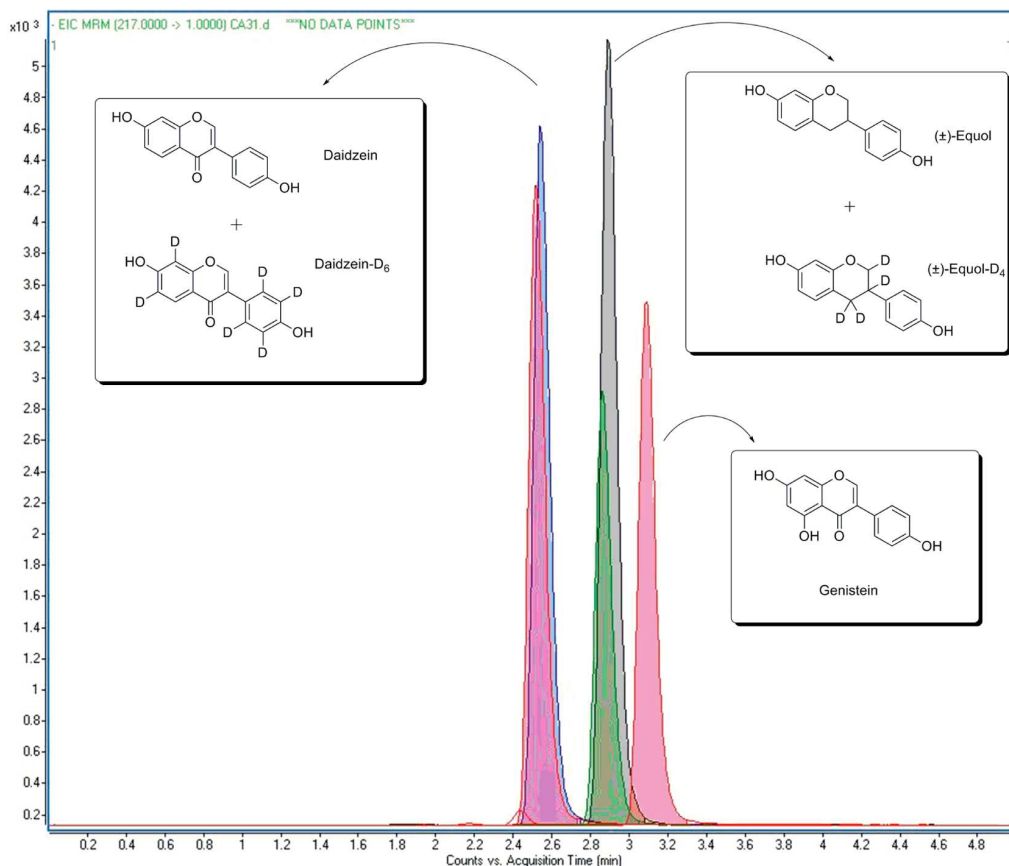


Figure 2. Chromatogram of an extracted plasma sample. A blank plasma was spiked with daidzein, equol, and genistein (500 ng/mL) and their corresponding internal standards (300 and 100 ng/mL). Following extraction and using an isocratic gradient, analytes were separated within 5 min.

isoflavone extracts contained a mixture of glycosides and aglycones, the dose administered was calculated as the sum of the amount of glycoside and aglycone, expressed in milligrams of aglycone.

Statistical Analysis. A Student's t test for paired samples was used for the statistical comparison of AUC_{0-24h} , C_{max} , $t_{1/2}$, k_{el} , AUC_{0-24h}/dose , and C_{max}/dose . A nonparametric method was used (Wilcoxon signed-rank test) for t_{max} . Analyses were performed using SPSS Statistics for Windows (version 18.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Significance was defined as $p < 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

Method Development and Optimization. *Optimization of MS/MS Conditions.* To evaluate ionization sources and multiple reaction monitoring (MRM) transitions, the three most intense fragments of each compound (daidzein, daidzein- d_6 , equol, equol- d_4 , and genistein) were selected using pure standards at 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ in negative ion mode. To further improve MRM conditions, the effect of gas temperature and collision and fragmentor energies were investigated over the ranges of 300–350 $^{\circ}\text{C}$, 0–45 eV, and 60–140 V, respectively.

The optimal gas temperature was determined at 325 $^{\circ}\text{C}$, and the optimized values for fragmentor and collision energy of each metabolite, as well as the selected MRM transitions, are detailed in Table 1.

Optimization of LC Conditions. Different chromatographic columns were tested to study their effect on peak shapes and separation efficiency. Depending on the polarity of the stationary phase, these included cyanopropylsilyl (CN; Acquity UPLC HSS cyano 1.8 μm , 2.1 \times 50 mm), n -octylsilyl (C_8 ; Zorbax SB- C_8 RRHT 1.8 μm , 2.1 \times 100 mm), phenylhexylsilyl (Acquity UPLC BEH Phenyl 1.7 μm 2.1 \times 100 mm), and n -octadecylsilyl (C_{18} ; Acquity UPLC BEH C_{18} 1.7 μm , 3.0 \times 100 mm) moieties on silica. After having compared the four chromatographic columns, the latter was chosen to continue with the optimization of the methodology because it provided the best separation with good resolution for equol, daidzein, and genistein.

Chromatographic separation of the analytes was optimized by evaluating four mobile phases (0.1% HCOOH, 0.01% $\text{NH}_4\text{CH}_3\text{COO}$, acetonitrile, and methanol). A rapid separation

Table 2. Linearity, Limit of Detection, Matrix Effect, and Extraction Recovery for the Studied Analytes

compound	determination coefficient (r^2)	limit of detection (ng/mL)	matrix effect (%)		extraction recovery (%)	
			5 ng/mL	800 ng/mL	5 ng/mL	800 ng/mL
daidzein	0.999	0.6	17.8	2.1	86.2	85.9
daidzein- d_6			-7.1	-11.6	79.2	77.5
equol	0.999	0.9	-7.6	-4.8	79.0	84.5
equol- d_4			-12.3	-17.2	76.7	80.2
genistein	0.996	1.0	-1.8	-9.4	79.1	80.5

(<5 min) of the three compounds of interest was achieved using an isocratic solvent system consisting of 0.01% ammonium acetate at pH 5 and methanol (40:60, v/v) (Figure 2).

Optimization of the Solid Phase Extraction Procedure. To optimize the extraction of the analytes of interest from plasma, several solid-phase extraction procedures were evaluated by spiking known amounts of the analytes and calculating the corresponding recoveries and matrix effect. Five different cartridges were evaluated. These included Oasis MCX, WAX, MAX, WCX, and HLB (Waters Corp.). The highest recovery of the analytes was achieved when MAX cartridges were used, although a marked matrix effect was present. To avoid the coeluting matrix components affecting the ionization efficiency of the analytes, different washes were evaluated. Neither basic washes with 5% NH_4OH nor additional washing steps using methanol improved the matrix effect. However, when acidic washes were studied using mixtures of methanol and 2% formic acid, the matrix effect was enhanced. The best results were obtained when 2% HCOOH and methanol (90:10; v/v) were employed.

Optimization of the Hydrolysis. The efficacy of different enzymes to hydrolyze the sulfate and glucuronic acid moieties present in the phase II conjugates of equol, genistein, and daidzein was evaluated. Different enzyme preparations (β -glucuronidases from *H. pomatia* H-2, purified H-2, H-1, and β -glucuronidase from *Escherichia coli*), glucuronidase and sulfatase units, incubation times, and temperatures were studied. Several custom synthesized products containing sulfate and/or glucuronide moieties (daidzein-4-sulfate, equol-4-sulfate, daidzein-7- β -D-glucuronide, daidzein-7- β -D-glucuronide-4-sulfate) were used as substrates, and the percentage of hydrolysis achieved in each case was evaluated.

The best results were obtained when the samples were treated with 3000 units of β -glucuronidase H-1 from *H. pomatia* at pH 5 after an incubation at 37 °C for 16 h. Interestingly, similar results were achieved when the hydrolysis time was reduced to 1 h and the temperature of the water was increased to 55 °C. This glucuronidase has been previously used in the analysis of soy isoflavones.^{18–21}

Under the conditions described above, the percentage of hydrolysis of daidzein-4-sulfate, daidzein-7- β -D-glucuronide, and daidzein-7- β -D-glucuronide-4-sulfate was >95%. With greater amounts of β -glucuronidase (5000 units), the percentage of hydrolysis was constant, although the matrix effect increased. Whereas the hydrolysis of most of the metabolites was successful, none of the studied conditions was able to hydrolyze equol-4-sulfate, the yield being below 5%. Studies regarding equol metabolism in humans, monkeys, and rats have reported that sulfation is a minor metabolic pathway of this compound.²² As described below, despite having detected equol in plasma samples from three volunteers, the

pharmacokinetics of this metabolite has not been evaluated in this study.

It is worth noting that a total quantification of isoflavones was chosen due to the large number of isoflavone glucuronide and sulfate metabolites conjugates that have been described to date in humans¹⁶ and animals.⁹ Although some of these conjugates are commercially available, the lack of an appropriate commercially available IS for all of them for their proper quantification was a major limitation for their inclusion in the bioavailability study. For this reason, a total quantification of the isoflavones was performed following sample hydrolysis. To do so, four different representative metabolites presenting glucuronides and/or sulfate moieties were custom synthesized. The hydrolysis procedure was optimized to ensure that the conditions used were able to release the aglycones. Finally, the quantification of total isoflavones was performed in real plasma samples using the optimized hydrolysis procedure.

Method Validation. Validation of the analytical method was performed following the European Medicines Agency guidelines on bioanalytical method validation (http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Scientific_guideline/2011/08/WC500109686.pdf, accessed April 30, 2014).

The linearity of the calibration curve was evaluated from three different prepared batches as described above. Satisfactory determination coefficients ($r^2 > 0.99$) were obtained for all of the analytes in the selected range of 5–1000 ng/mL.

Intra- and interday accuracies presented acceptable percent relative error for the three compounds, and the intra- and interday precisions were constantly below 15% RSD (Supplementary Table 1).

The LODs for daidzein, equol, and genistein were 0.6, 0.9, and 1.0 ng/mL, respectively. The LLOQ for these three isoflavones was 5 ng/mL.

The percent matrix effects for daidzein, equol, genistein, and their corresponding IS assessed at 5 and 800 ng/mL indicate that ion suppression was lower than 17.2% and ion enhancement was not higher than 17.8%. The extraction recoveries were between 77.5 and 86% (Table 2).

No significant degradation of daidzein, equol, and genistein in human plasma took place after long-term storage at -20 °C during the analysis period. The low and high QC samples presented acceptable values ($\pm 15\%$ the nominal values) during at least 8 months after their preparation.

Quantification of Isoflavones in Soy Preparations. Supplementary Table 2 shows the quantification of daidzein, genistein, daidzin, and genistin present in one capsule of the commercially available soy preparations studied. Both commercial sources presented predominantly β -glycoside conjugates (98%), the free forms representing only a small percentage of the isoflavone content (approximately 2%). In *Fitoladius*, daidzin was found to account for 37.4% of the total isoflavone

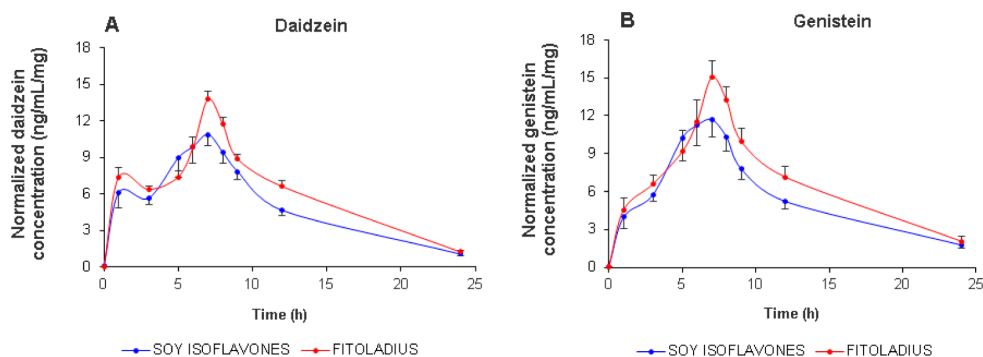


Figure 3. Time course plasma concentrations of genistein and daidzein after a single oral administration of two different isoflavone extracts to human subjects ($n = 12$): (A) daidzein time course plasmatic concentrations after Super Absorbable Soy Isoflavones and Fitoladius treatment; (B) genistein time course plasmatic concentrations after treatments. For comparison purposes, the concentration values were normalized by the dose administered. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean.

Table 3. Plasma Pharmacokinetic Parameters of Daidzein and Genistein after a Single Oral Administration of Fitoladius (4 Capsules) and Super Absorbable Soy Isoflavones (2 Capsules)^a

	daidzein		genistein	
	Soy Isoflavones	Fitoladius	Soy Isoflavones	Fitoladius
AUC_{0-24h} (ng·h/mL)	5408 \pm 928**	3376 \pm 839**	5723 \pm 1587	5838 \pm 1275
$AUC_{0-24h}/dose$ (ng·h/mL·mg)	120.8 \pm 20.7*	144.8 \pm 36.0*	131.5 \pm 36.5**	159.7 \pm 34.9**
C_{max} (ng/mL)	618.6 \pm 116.8**	350.3 \pm 90.8**	630.8 \pm 206.3	620.5 \pm 196.9
$C_{max}/dose$ (ng/mL·mg)	13.8 \pm 2.6	15.0 \pm 3.9	14.5 \pm 4.7*	17.0 \pm 5.4*
t_{max} (h)	6.3 \pm 2.0	6.8 \pm 0.8	6.3 \pm 2.1	6.9 \pm 1.0
$t_{1/2}$ (h)	4.5 \pm 1.6	5.4 \pm 3.3	5.9 \pm 2.1	5.8 \pm 2.6
k_e (h ⁻¹)	0.18 \pm 0.07	0.16 \pm 0.07	0.13 \pm 0.05	0.14 \pm 0.07

^aData are expressed as the mean \pm standard deviation: *, $p < 0.05$; **, $p < 0.005$. Abbreviations: AUC_{0-24h} , area under the curve from 0 to 24 h; C_{max} , peak plasma concentration; t_{max} , time at peak plasma concentration; $t_{1/2}$, elimination half-life; k_e , elimination rate constant.

weight, whereas genistin was the most abundant isoflavone, representing 60.3%. On the other hand, Super Absorbable Soy Isoflavones had almost the same amount of daidzin as genistin (50.0 and 48.1%, respectively). The aglycones were present only in very low amounts, daidzein being at a higher proportion (1.1–1.7%) than genistein (0.6–0.7%). The total isoflavone content of Fitoladius was found to exactly match the content provided in the information pamphlet (23.8 vs 24 mg). In the case of Super-Absorbable Soy Isoflavones, the content of genistin and genistein was 1.2-fold that described by the manufacturer (35.5 vs 28 mg). As for daidzein and daidzin concerns, the amount quantified (34.5 mg) was 1.6-fold that given in the specifications (22 mg). This fact is of relevance because the dosages administered to the volunteers were based on the information provided by the manufacturer. To compensate for these differences, the pharmacokinetic parameters were normalized by the dose administered. To do so, each plasmatic concentration value (derived from the calibration curve) was divided by the amount administered of the corresponding isoflavone.

The other constituents present in the soy preparations were excipients. In the case of Fitoladius, and according to the manufacturer, these are primrose oil, glyceryl monostearate, glycerol, cuprosodic chlorophyll, gelatin, titanium dioxide, and purified water. In the case of Super-Absorbable Soy Isoflavones, these are ascorbyl palmitate and vegetable cellulose. The analysis of these excipients is beyond the scope of this paper.

Quantification of Isoflavones in Human Plasma Samples. *Equol.* Only 3 of the 12 volunteers were found to be equol producers. In these volunteers, equol concentrations

started to increase between 5 and 6 h after the treatment administration and could still be detected at 24 h. Therefore, the pharmacokinetics of this metabolite is not evaluated in this study.

Daidzein and Genistein Pharmacokinetics. Time course plasma concentrations of total genistein and daidzein are shown in Figure 3. Some studies have described that daidzein presents higher bioavailability than genistein,²³ whereas others have reported the contrary.²⁴ In our study, no differences in bioavailability were observed between daidzein and genistein after the treatment with Super Absorbable Soy Isoflavones or Fitoladius. The double peak found in the time course plasma concentrations suggests an enterohepatic circulation, which is characteristic of these compounds (Figure 3).^{6,25} To a lesser extent, the small percentages of aglycones present in the soy extracts could also contribute to this pharmacokinetic profile, as the free forms are absorbed more quickly than the glycosides.²⁶

The pharmacokinetic parameters studied (AUC_{0-24h} , C_{max} , $AUC_{0-24h}/dose$, $C_{max}/dose$, t_{max} , $t_{1/2}$, k_e) are reported in Table 3. As shown using the $AUC_{0-24h}/dose$ ratio, the bioavailability of daidzein and genistein was higher after the intake of Fitoladius ($p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively), compared to Super Absorbable Soy Isoflavones (Figure 3).

$C_{max}/dose$ values of genistein also differed significantly between treatments ($p < 0.001$). After the intake of Fitoladius, these values were higher than the other studied preparation. No differences were observed in t_{max} , $t_{1/2}$, and k_e .

Several factors can influence the metabolism and bioavailability of isoflavones in humans. These include age, ethnic background, dietary habits, food matrix, intestinal microflora,

intestinal transit time, previous exposure to isoflavones, and glycosidase production.^{27,28} In our case, the differences in bioavailability suggest that the excipients/matrix in which these products are present may play an important role in the absorption process, which could have a direct impact on the bioavailability of soy isoflavones. This fact would explain the different pharmacokinetic profile observed between treatments when the same 12 volunteers received two different soy extracts.

Our study has strengths and limitations. One of the strengths is the crossover design, which allowed the same participants to be included in the different treatments, thus minimizing interferences with other confounder variables. Another strength lies in the fact of including both genders among the participants, thus providing a better representation of the overall population. One limitation of our study is that, due to the available commercial sources of the soy extracts, the isoflavone composition of the two tested products differed significantly. Consequently, the participants did not receive exactly the same doses in the two soy isoflavone extracts. To minimize these differences, the exact amount of each isoflavone was first analyzed, and normalization by the dose administered was performed prior to pharmacokinetic analyses.

In conclusion, in the present study we developed a LC-MS/MS method based on an enzymatic hydrolysis with β -glucuronidase H1 followed by a SPE procedure using Oasis MAX cartridges. The analytical method was successfully validated following the European Medicines Agency guidelines on Bioanalytical Method Validation. This methodology presents a good recovery of the analytes, very low matrix effects, a rapid chromatographic separation, and high sensitivity. The limits of detection for daidzein, equol, and genistein in 1 mL of plasma sample were 0.6, 0.9, and 1.0 ng/mL, respectively. Once the method was validated, a crossover, randomized, bioavailability study was performed. The method was then applied to the plasma samples of the 12 volunteers. The pharmacokinetic profiles of daidzein and genistein were studied.

After having been normalized, Fitoladius presented higher bioavailability and achieved higher C_{\max} values than Super Absorbable Soy Isoflavones for daidzein and genistein. As the other pharmacokinetic parameters were similar between both treatments, we suggest that these differences in bioavailability come from the matrix/excipients present in the capsules of the isoflavone extracts.

The preparations studied are over-the-counter dietetic preparations, they do not require medical prescription, and some of them can be purchased on the Internet. Thus, the regulation of these products probably is not as strict as that applied to prescription drugs. Consequently, a detailed and accurate description of the specific isoflavone content present in the capsules is lacking. Indeed, describing the content of the capsules as “X mg of isoflavones” or “Y mg of genistin and genistein” does not provide clear and accurate information about composition. This is an important fact because there are a number of different isoflavones, which vary in molecular weight, pharmacokinetic profile, and biological activities.²⁹ As a consequence, the exact content of each isoflavone should be provided by the manufacturers in order to have better knowledge of the content of the capsules and their corresponding beneficial health effects.

The purpose of this study was the selection of one isoflavone extract preparation for its use in a clinical trial with the aim of

treating drug addiction. In this context we performed the bioavailability study. Results from this study show that isoflavone extracts vary not only in their composition (not unexpected) but also in the amounts reported by manufacturers in each preparation. In a clinical pharmacology context and looking at therapeutic indications with methodologically robust designs, the results from this study are quite disturbing.

■ ASSOCIATED CONTENT

📄 Supporting Information

Supplementary Table 1, intra- and interday precision and accuracy of quality control samples of daidzein, equol, and genistein in human plasma; supplementary Table 2, isoflavone content of one capsule of Fitoladius and Super Absorbable Soy Isoflavones. The Supporting Information is available free of charge on the ACS Publications website at DOI: 10.1021/acs.jafc.5b02891.

■ AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*(R.T.) Phone: +34 933160484. Fax: +34 933160467. E-mail: rtorre@imim.es.

Present Address

[¶]Clinical Pharmacology Unit. Hospital Universitari Germans Trias i Pujol-IGTP, Badalona 08916, Spain.

Author Contributions

^{||}Authorship credit should be equally distributed between authors J.R.-M. and M.F. independent of the order.

Funding

Funded by grants from the Ministerio de Sanidad (Investigación Clínica Independiente, EC-10-166), Fondo de Investigación Sanitaria-ISCI-III-FEDER RTA (RD12/0028/0009), CIBEROBN (CB06/03/0028), Generalitat de Catalunya (AGAUR 2014SGR680, predoctoral fellowship FI-DGR 2013 for J.R.-M.), and PN I+D+I 2008-2011 and ISCI-III CA11/00215 for N.P. C.P.-M. and E.P. are Rio Hortega fellows (ISCI-III, CM12/00085 and CM13/00016). The author's work was independent of the sources of funding.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

■ REFERENCES

- (1) Yuan, J. P.; Wang, J. H.; Liu, X. Metabolism of dietary soy isoflavones to equol by human intestinal microflora – implications for health. *Mol. Nutr. Food Res.* **2007**, *51*, 765–781.
- (2) Milenkovic, D.; Jude, B.; Morand, C. miRNA as molecular target of polyphenols underlying their biological effects. *Free Radical Biol. Med.* **2013**, *64*, 40–51.
- (3) Day, A. J.; DuPont, M. S.; Ridley, S.; Rhodes, M.; Rhodes, M. J.; Morgan, M. R.; Williamson, G. Deglycosylation of flavonoid and isoflavonoid glycosides by human small intestine and liver beta-glucosidase activity. *FEBS Lett.* **1998**, *436*, 71–75.
- (4) Setchell, K. D.; Brown, N. M.; Zimmer-Nechemias, L.; Brashear, W. T.; Wolfe, B. E.; Kirschner, A. S.; Heubi, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *Am. J. Clin. Nutr.* **2002**, *76*, 447–453.
- (5) Kurzer, M. S.; Xu, X. Dietary phytoestrogens. *Annu. Rev. Nutr.* **1997**, *17*, 353–381.
- (6) Barnes, S. The biochemistry, chemistry and physiology of the isoflavones in soybeans and their food products. *Lymphatic Res. Biol.* **2010**, *8*, 89–98.
- (7) Ronis, M. J.; Little, J. M.; Barone, G. W.; Chen, G.; Radominska-Pandya, A.; Badger, T. M. Sulfation of the isoflavones genistein and

daidzein in human and rat liver and gastrointestinal tract. *J. Med. Food* **2006**, *9*, 348–355.

(8) Nakano, H.; Ogura, K.; Takahashi, E.; Harada, T.; Nishiyama, T.; Muro, K.; Hiratsuka, A.; Kadota, S.; Watabe, T. Regioselective monosulfation and disulfation of the phytoestrogens daidzein and genistein by human liver sulfotransferases. *Drug Metab. Pharmacokinet.* **2004**, *19*, 216–226.

(9) Fang, N.; Yu, S.; Badger, T. M. Characterization of isoflavones and their conjugates in female rat urine using LC/MS/MS. *J. Agric. Food Chem.* **2002**, *50*, 2700–2707.

(10) Yuan, B.; Zhen, H.; Jin, Y.; Xu, L.; Jiang, X.; Sun, S.; Li, C.; Xu, H. Absorption and plasma disposition of genistin differ from those of genistein in healthy women. *J. Agric. Food Chem.* **2012**, *60*, 1428–1436.

(11) Pugazhendhi, D.; Watson, K. A.; Mills, S.; Botting, N.; Pope, G. S.; Darbre, P. D. Effect of sulphation on the oestrogen agonist activity of the phytoestrogens genistein and daidzein in MCF-7 human breast cancer cells. *J. Endocrinol.* **2008**, *197*, 503–515.

(12) Xu, X.; Harris, K. S.; Wang, H. J.; Murphy, P. A.; Hendrich, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora in women. *J. Nutr.* **1995**, *125*, 2307–2315.

(13) Setchell, K. D.; Clerici, C.; Lephart, E. D.; Cole, S. J.; Heenan, C.; Castellani, D.; Wolfe, B. E.; Nechemias-Zimmer, L.; Brown, N. M.; Lund, T. D.; Handa, R. J.; Heubi, J. E. S-equol, a potent ligand for estrogen receptor beta, is the exclusive enantiomeric form of the soy isoflavone metabolite produced by human intestinal bacterial flora. *Am. J. Clin. Nutr.* **2005**, *81*, 1072–1079.

(14) Setchell, K. D.; Brown, N. M.; Desai, P.; Zimmer-Nechemias, L.; Wolfe, B. E.; Brashear, W. T.; Kirschner, A. S.; Cassidy, A.; Heubi, J. E. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J. Nutr.* **2001**, *131*, 1362S–1375S.

(15) King, R. A.; Bursill, D. B. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *67*, 867–872.

(16) Hosoda, K.; Furuta, T.; Ishii, K. Simultaneous determination of glucuronic acid and sulfuric acid conjugated metabolites of daidzein and genistein in human plasma by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2010**, *878*, 628–636.

(17) Twaddle, N. C.; Churchwell, M. L.; Doerge, D. R. High-throughput quantification of soy isoflavones in human and rodent blood using liquid chromatography with electrospray mass spectrometry and tandem mass spectrometry detection. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2002**, *777*, 139–145.

(18) Wyns, C.; Bolca, S.; De Keukeleire, D.; Heyerick, A. Development of a high-throughput LC/APCI-MS method for the determination of thirteen phytoestrogens including gut microbial metabolites in human urine and serum. *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2010**, *878*, 949–956.

(19) Kuklenyik, Z.; Ye, X.; Reich, J. A.; Needham, L. L.; Calafat, A. M. Automated online and off-line solid-phase extraction methods for measuring isoflavones and lignans in urine. *J. Chromatogr. Sci.* **2004**, *42*, 495–500.

(20) Parker, D. L.; Rybak, M. E.; Pfeiffer, C. M. Phytoestrogen biomonitoring: an extractionless LC-MS/MS method for measuring urinary isoflavones and lignans by use of atmospheric pressure photoionization (APPI). *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *402*, 1123–1136.

(21) Rybak, M. E.; Parker, D. L.; Pfeiffer, C. M. Determination of urinary phytoestrogens by HPLC–MS/MS: a comparison of atmospheric pressure chemical ionization (APCI) and electrospray ionization (ESI). *J. Chromatogr. B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2008**, *861*, 145–150.

(22) Schwen, R. J.; Nguyen, L.; Jackson, R. L. Elucidation of the metabolic pathway of S-equol in rat, monkey and man. *Food Chem. Toxicol.* **2012**, *50*, 2074–2083.

(23) Xu, X.; Wang, H.-J.; Murphy, P. A.; Cook, L.; Hendrich, S. Daidzein is a more bioavailable soymilk isoflavone than is genistein in adult women. *J. Nutr.* **1994**, *124*, 825–832.

(24) Setchell, K. D.; Faughnan, M. S.; Avades, T.; Zimmer-Nechemias, L.; Brown, N. M.; Wolfe, B. E.; Brashear, W. T.; Desai, P.; Oldfield, M. F.; Botting, N. P.; Cassidy, A. Comparing the pharmacokinetics of daidzein and genistein with the use of ¹³C-labeled tracers in premenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 411–419.

(25) Sfakianos, J.; Coward, L.; Kirk, M.; Barnes, S. Intestinal uptake and biliary excretion of the isoflavone genistein in rats. *J. Nutr.* **1997**, *127*, 1260–1268.

(26) Izumi, T.; Piskula, M. K.; Osawa, S.; Obata, A.; Tobe, K.; Saito, M.; Kataoka, S.; Kubota, Y.; Kikuchi, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J. Nutr.* **2000**, *130*, 1695–1699.

(27) Zubik, L.; Meydani, M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside forms in American women. *Am. J. Clin. Nutr.* **2003**, *77*, 1459–1465.

(28) Setchell, K. D. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, *68*, 1333S–1346S.

(29) López-Gutiérrez, N.; Romero-González, R.; Garrido Frenich, A.; Martínez Vidal, J. L. Identification and quantification of the main isoflavones and other phytochemicals in soy based nutraceutical products by liquid chromatography–orbitrap high resolution mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **2014**, *1348*, 125–136.

5.2. Estudio 2: Soy Isoflavone Extract Does Not Increase the Intoxicating Effects of Acute Alcohol Ingestion in Human Volunteers

Martínez-Riera, R., Pérez-Mañá, C., Papaseit, E., Fonseca, F., de la Torre, R., Pizarro, N., Torrens M., Farré, M. (2019). Soy Isoflavone Extract Does Not Increase the Intoxicating Effects of Acute Alcohol Ingestion in Human Volunteers. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00131>.



Soy Isoflavone Extract Does Not Increase the Intoxicating Effects of Acute Alcohol Ingestion in Human Volunteers

Roser Martínez-Riera^{1,2,3†}, Clara Pérez-Mañá^{2,4†}, Esther Papaseit^{2,4†}, Francina Fonseca^{1,2}, Rafael de la Torre^{5,6}, Nieves Pizarro^{2,5}, Marta Torrens^{1,2*} and Magí Farré^{2,4}

¹ Institut de Neuropsiquiatria i Addiccions, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain, ² Department of Psychiatry and Legal Medicine and Department of Pharmacology, Therapeutics and Toxicology, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallès, Spain, ³ Red de Salud Mental Gipuzkoa, Osakidetza, San Sebastián-Donostia, Spain, ⁴ Clinical Pharmacology Unit, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol and Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, Spain, ⁵ Integrative Pharmacology and Systems Neurosciences Research Group, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, Spain, ⁶ Department of Experimental and Health Sciences (CEXS), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, Spain

OPEN ACCESS

Edited by:

Juan J. Canales,
University of Tasmania, Australia

Reviewed by:

Edward John Ogden,
Swinburne University of Technology,
Australia
Paluri Sai Shantanu Rao,
University of Findlay, United States

*Correspondence:

Marta Torrens
Mtorrens@parcdesalutmar.cat

† These authors have contributed
equally to this work and share
first authorship

Specialty section:

This article was submitted to
Neuropharmacology,
a section of the journal
Frontiers in Pharmacology

Received: 16 October 2018

Accepted: 05 February 2019

Published: 27 February 2019

Citation:

Martínez-Riera R, Pérez-Mañá C, Papaseit E, Fonseca F, de la Torre R, Pizarro N, Torrens M and Farré M (2019) Soy Isoflavone Extract Does Not Increase the Intoxicating Effects of Acute Alcohol Ingestion in Human Volunteers. *Front. Pharmacol.* 10:131. doi: 10.3389/fphar.2019.00131

Soy beans contain isoflavones, including daidzein and genistein, with biological activities related to therapeutic effects in reducing osteoporosis, decreasing adverse menopausal manifestations, providing protection from cardiovascular diseases, and reducing hormone-dependent cancers and age-related cognitive-decline. Daidzein has been described as inhibiting the aldehyde-dehydrogenase-2 enzyme (ALDH2), and reducing alcohol use in clinical pilot studies. Our aim was to evaluate the possible interactions between a soy extract product and alcohol in a crossover, single blind, randomized study. Ten healthy male volunteers participated in two experimental sessions: one with a single dose of alcohol (0.5 g/kg, Vodka Absolut, Sweden), and the other with four capsules of a soy extract product (Super-Absorbable Soy Isoflavones, Life-Extension, United States) and, 2 h later, the same dose of alcohol. Results showed no differences in vital signs except a slightly higher significant reduction in diastolic blood pressure at 2, 3, 4, and 8 h after administration with alcohol alone in comparison with soy extract+alcohol. Ethanol-induced subjective and adverse effects were similar for both conditions with the exception of headache (higher at 8 h after alcohol alone). Our results demonstrate that a single dose of a soy isoflavone extract did not influence alcohol pharmacokinetics and pharmacological effects and did not induce any disulfiram-reaction symptoms. Soy extract and alcohol did not interact and can be administered safely.

Keywords: soy extracts, isoflavones, daidzein, genistein, aldehyde-dehydrogenase-2 enzyme, alcohol, clinical trial

INTRODUCTION

Isoflavones are biologically active polyphenols found in soybeans and other legumes. In the former, the principal ones are daidzin (40%) and genistin (50%) which transform into two active compounds, daidzein and genistein, respectively (U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2015). Daidzein is also metabolized by intestinal bacteria to the active

compound equol. Daidzein consumption has been related to phytoestrogen and antioxidant activity, a lower incidence of menopausal symptoms (Messina, 2014), and a reduction in osteoporosis, breast cancer, and cardiovascular diseases (Michelfelder, 2009). This isoflavone is more selective for estrogen receptor (ER)/beta than estradiol which could explain such activities. The ingestion of soy isoflavones is considered safe, the most common adverse effects are gastrointestinal (diarrhea) and more rarely headache, prolonged menstrual period, amenorrhea, dizziness, and musculoskeletal complaints (Michelfelder, 2009). Some isoflavones, especially daidzin-daidzein, have been reported to inhibit the aldehyde-dehydrogenase-2 enzyme (ALDH2) (Gao et al., 2001; Lowe et al., 2008; Koppaka et al., 2012).

Kudzu (*Pueraria lobata*) root extracts and flowers contain isoflavones, for instance, puerarin (about 60% of the total isoflavones), and daidzin. Kudzu is used in traditional Japanese and Chinese medicine to treat alcohol hangover and alcohol substance use disorder (Overstreet et al., 2003a,b). Some studies in animal models have shown that daidzin and synthetic analogs have the capacity to reduce alcohol intake (Overstreet et al., 1996; Gao et al., 2003; Arolfo et al., 2009). In humans, a pilot study in a naturalistic setting demonstrated that the administration of a kudzu extract reduced alcohol consumption in heavy drinkers (Lukas et al., 2005). In controlled clinical trials with healthy volunteers, a reduction in alcohol intake when kudzu extract isoflavones were taken before drinking was reported (Penetar et al., 2012; Lukas et al., 2013; Penetar et al., 2015).

As already established, alcohol is biotransformed enzymatically to acetaldehyde by alcohol-dehydrogenase (ADH) and later metabolized into acetate by aldehyde-dehydrogenase (ALDH1). Disulfiram, used for the treatment of alcohol substance use, inhibits ALDH1 and ALDH2 irreversibly, producing an accumulation of acetaldehyde concentrations in blood which leads to undesirable effects if alcohol is simultaneously consumed. Symptoms, which include sickness, nausea, vomit, sweating, dizziness, and facial erythema, are known as the “disulfiram-reaction” or “antabuse-reaction.”

For centuries traditional Chinese medicine has employed different isoflavones for the treatment of alcohol substance use (Keung, 2003; Lu et al., 2009; Soyka and Rösner, 2010) with the advantage that they do not affect acetaldehyde levels, induce disulfiram-like effects (Penetar et al., 2011), or alter the sleep cycle (Bracken et al., 2011).

There are no previously published papers evaluating the possible interference/influence of soy isoflavone extracts on alcohol pharmacokinetics, acute pharmacological effects, and induction of a “disulfiram-like effect” despite their potential interaction in the treatment of alcohol abuse. The aim of the present study was to evaluate the interactions between a soy extract containing isoflavones and alcohol, in relation to the pharmacokinetics and acute effects of alcohol, in order to design future clinical trials to assess the possible therapeutic effects of isoflavones on substance use disorders, specifically cocaine.

MATERIALS AND METHODS

Study Design

The study protocol was approved by the local Human Research Ethics Committee (CEIC-Parc de Salut Mar) and conducted in accordance with the Helsinki Declaration and local legislation. The trial was registered in a public database (ClinicalTrials.gov Identifier: NCT02309801). All the participants were informed about the study and signed a written informed consent before participation. All subjects were financially compensated for their participation.

The study was a randomized, single-blinded (the participants were informed that they could receive different doses of alcohol in the two sessions), and crossover clinical trial. Subjects participated in two different experimental sessions separated by at least 3 days. In one session they received a glass of water (240 mL) and 2 h later a single oral dose of alcohol was administered (0.5 g/kg, Vodka Absolut® 40°, Sweden); in the other, they were given four capsules containing a soy extract product with a glass of water (240 mL) and 2 h later the same dose of alcohol.

Soy Isoflavone Extract

A commercial soy extract product (Super-Absorbable Soy Isoflavones®, hard gelatin capsules, Life-Extension, United States) was employed. According to the manufacturer each capsule contained 54 mg of total isoflavones (22 mg daidzin-daidzein, 28 mg genistin-genistein, and 4 mg glycitin-glycitein). The dose administered (four capsules) was chosen in order to provide a total content of daidzin/daidzein (approximately 88 mg) which represented twice the dose recommended for the symptomatic therapy of menopausal symptoms (Brewer, 1984; Christensen et al., 1991; Gao et al., 2001) or that used in trials for asthma therapy (Smith et al., 2015).

Subjects

A total of 10 healthy males were recruited from a volunteer database. The screening visit took place within the 3 weeks prior to commencing the study sessions. Subjects underwent a general physical examination, a 12-lead ECG, and a complete blood and urine analysis, including drugs of abuse in urine. Inclusion criteria were (i) recreational use of alcohol (<4 units of alcohol per day); (ii) previous experience of acute alcohol intoxication; and (iii) no history of substance abuse/dependence according to the Diagnosis and Statistical Criteria for Mental Disorders (DSM-IV-R). Exclusion criteria were (i) current tobacco smokers; (ii) current or previous history of mental disorders; (iii) any somatic illness that could interfere with alcohol and soy; (iv) the consumption of >5/day drinks of tea, coffee or similar xanthine-containing beverages during the 3 months prior to the study; and (v) the use of soy derivatives during the previous month.

Procedure

Subjects were admitted to the Clinical Research Unit facilities at 07:45 a.m. after an overnight fast. Upon arrival, they

were asked about any drug consumption or adverse event that could affect their participation. They were requested to refrain from using any psychoactive drug for a minimum of 7 days prior to the study and throughout it, and from consuming caffeinated products for 24 h and alcohol for 48 h. They were also asked to follow a diet free from daidzein (soy and derivatives) 3 days before and 48 h after each session. A urine sample was collected for drug of abuse testing (Instant-View®, Multipanel 10 Test Drug Screen, Alfa Scientific Designs Inc., Poway, CA, United States). Alcohol concentrations in breath were analyzed.

An intravenous catheter in the non-dominant arm was inserted for blood sampling.

Physiological and Subjective Effects

Non-invasive systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), heart rate (HR), oral and cutaneous facial temperature (OT, FT) were repeatedly recorded at baseline, immediately before capsule administration, and at 2 (immediately before beverage administration), 2.5, 3, 4, 5, 6, 8, and 10 h after first administration. All assessments were carried out with a Dinamap™ 8100-T vital signs monitor (Critikon,

TABLE 1 | Summary of results of the physiological and subjective effects observed after administration of soy extract+alcohol and alcohol (*n* = 10).

Variable	Parameter	Soy extract+Alcohol	Alcohol	P-value
Physiological				
SBP	Emax	-4.5 ± 11.66	-9.2 ± 11.05	0.323
	AUC ₀₋₁₀	-24.4 ± 40.4	-39.17 ± 41.7	0.302
DBP	Emax	-4.8 ± 9.92	-10.5 ± 8.72	0.081
	AUC ₀₋₁₀	-25.8 ± 41.36	-58.8 ± 35.59	0.052
HR	Emax	-3.7 ± 13.09	-1.2 ± 15.26	0.368
	AUC ₀₋₁₀	-14.9 ± 61.2	-9.75 ± 59.58	0.759
OT	Emax	-0.26 ± 0.31	-0.23 ± 0.47	0.873
	AUC ₀₋₁₀	-0.967 ± 1.159	-1.2 ± 2.19	0.747
FT	Emax	0.75 ± 1.34	1.59 ± 0.67	0.039
	AUC ₀₋₁₀	6.04 ± 7.2	8.1 ± 5.59	0.205
Visual Analog Scales				
Drunkenness	Emax	17.6 ± 29.018	20.8 ± 19.1	0.602
	AUC ₀₋₁₀	35.36 ± 84.037	25.387 ± 35.1	0.569
Content	Emax	18.1 ± 30.2	23.9 ± 26.2	0.361
	AUC ₀₋₁₀	29.687 ± 67.9	29.91 ± 47.07	0.980
Nausea	Emax	0.5 ± 1.58	0.8 ± 1.75	0.718
	AUC ₀₋₁₀	0.2 ± 0.79	1.1 ± 3.1	0.416
Vertigo	Emax	3.2 ± 10.119	2.2 ± 6.9	0.812
	AUC ₀₋₁₀	5.27 ± 16.68	0.9 ± 3	0.449
Dizziness	Emax	9.4 ± 22.667	10.9 ± 18.3	0.687
	AUC ₀₋₁₀	19.9 ± 55.3	22.7 ± 47.09	0.627
Face flushing	Emax	7.5 ± 13.938	9.6 ± 14.9	0.696
	AUC ₀₋₁₀	16.3 ± 37.38	10.98 ± 20.8	0.614
Headache	Emax	5.3 ± 9.58	16.2 ± 27.9	0.217
	AUC ₀₋₁₀	18.16 ± 40.4	48.3 ± 87.9	0.274
Breathing difficulty	Emax	0	0	-
	AUC ₀₋₁₀	0	0	-
ARCI questionnaire				
ARCI-PCAG	Emax	2.4 ± 3.6	3.4 ± 3.59	0.266
	AUC ₀₋₁₀	9.8 ± 14.56	14.05 ± 14.2	0.237
ARCI-MBG	Emax	2.6 ± 2.836	2.7 ± 3.3	0.876
	AUC ₀₋₁₀	4.48 ± 5.01	3.4 ± 3.2	0.329
ARCI-LSD	Emax	4.8 ± 1.47	5.2 ± 1.7	0.373
	AUC ₀₋₁₀	42.26 ± 7.1	43.2 ± 8.27	0.328
ARCI-LSD	Emax	4.5 ± 0.97	4.6 ± 1.07	0.882
	AUC ₀₋₁₀	38.26 ± 5.8	36.7 ± 5.5	0.355
ARCI-BG ARCI-A	Emax	1.4 ± 1.4	1.8 ± 1.686	0.168
	AUC ₀₋₁₀	3.07 ± 3.8	4.5 ± 4.47	0.113

Values are differences from baseline (mean values and standard deviation). Systolic blood pressure (SBP, mmHg); diastolic blood pressure (DBP, mmHg), heart rate (HR, beats/min), (temperature (T, °C), visual analog scale (VAS, mm), Addiction Research Center Inventory questionnaire (ARCI, score), Emax = maximal/peak effects, AUC₀₋₁₀, area under the curve from 0 to 10 h.

Tampa, FL, United States). Cutaneous facial temperature was measured at the same time with an additional monitor (Critikon, Tampa, FL, United States).

Subjective effects were evaluated using a set of visual analog scales (VAS) at baseline (0 h), 2, 2.25, 2.5, 2.75, 3, 3.5, 4, 5, 6, 8, and 10 h after first administration. VAS (100 mm) were labeled with different adjectives marked at opposite ends from “not at all” to “extremely” (Peiró et al., 2013; Farré et al., 2015; Papaseit et al., 2016). Subjects were asked to rate effects of drunkenness, content, nausea, vertigo, dizziness, feeling of face flushing, headache, and breathing difficulty.

In addition, the 49-item short form Addiction Research Center Inventory (ARCI) was administered at baseline and at 2, 2.75, 3.5, and 10 h after first treatment administration. The Spanish validated version of the ARCI (Lamas et al., 1994) is sensitive to the effects of a variety of drug of abuse classes with five subscales: PCAG (pentobarbital-chlorpromazine-alcohol group, a measure of sedation); MBG (morphine-benzedrine group, a measure of euphoria); LSD (lysergic acid diethylamide group, a measure of dysphoria and somatic symptoms); BG (benzedrine group, a stimulant subscale relating to intellectual efficiency and energy); and A (amphetamine, a measure of d-amphetamine effects) (Farré et al., 2015).

Pharmacokinetics

Blood samples and ethanol breath concentrations were collected at baseline (before soy extract administration), and at 2 (before ethanol administration), 2.25, 2.5, 2.75, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, and

24 h after soy extract administration. Ethanol was determined in blood (DRI® Ethyl Alcohol Assay, Thermo Fisher, Fremont, CA, United States) and breath (Alcotest, Dräger, Germany). Daidzein, genistein, and the endogenous metabolite equol were determined by liquid chromatography coupled to tandem mass spectrometry (LC/MS/MS) using a validated method (Rodríguez-Morató et al., 2015).

Statistical Analysis

Effects

Differences with respect to baseline were calculated for vital signs (SBP, DBP, HR, and OT-FT) and subjective effects (VAS, ARCI). Maximum/peak effects (Emax) and the time to reach maximum effects (tmax) were also determined for the previously mentioned variables. The area under the curve of the concentrations from 0 to 10 h (AUC_{0–10 h}) using the trapezoidal rule was calculated for vital signs and subjective effects.

For the statistical comparison of AUC and Emax a Student’s *t*-test for paired samples was employed. For tmax a non-parametric Wilcoxon test was used. A repeated measure ANOVA with two factors (treatment and time) was used to compare the time course of effects. When treatment or the treatment × time interaction was statistically significant, multiple Tukey *post hoc* comparisons were performed at each time point.

Experimental Pharmacokinetic Parameters

Peak concentration (Cmax), time to reach peak concentrations (Tmax), and area under the concentration-time curve from 0 to

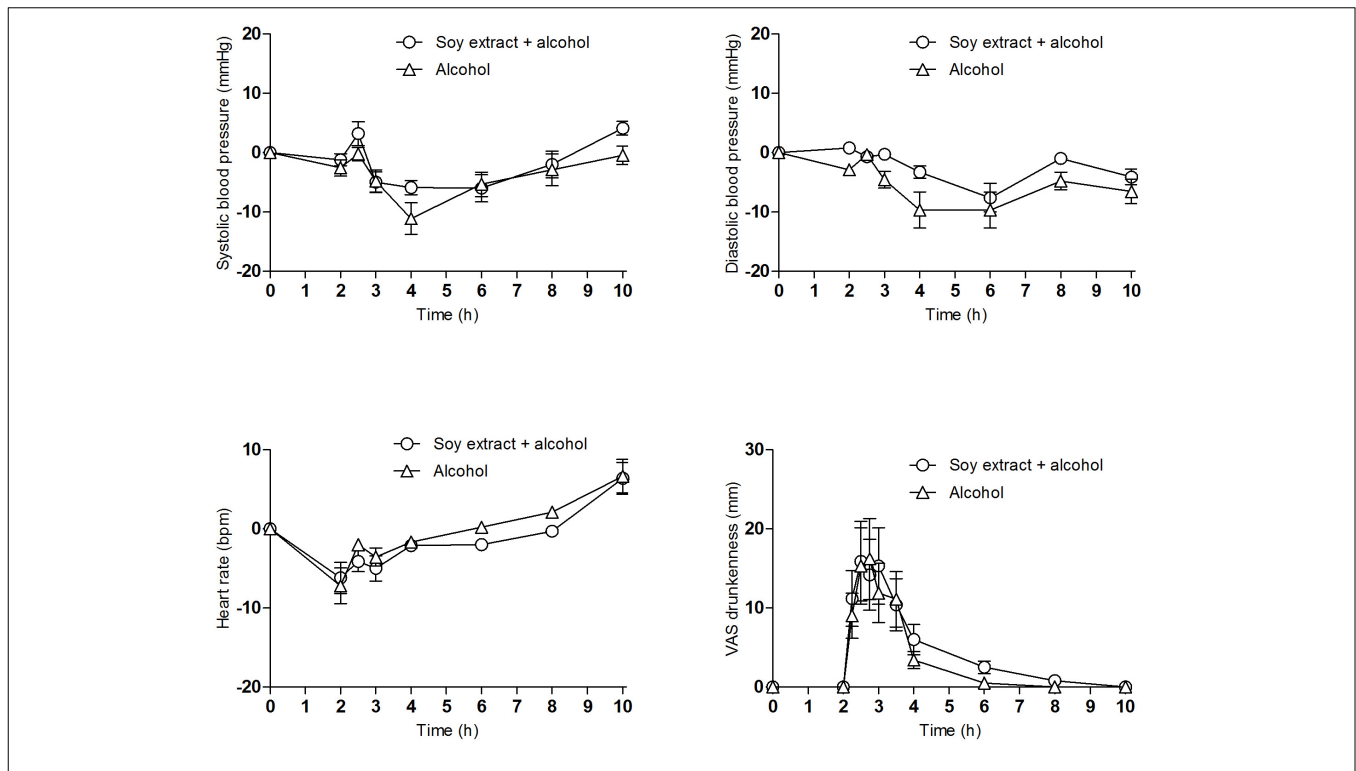


FIGURE 1 | Time course of the physiological and subjective effects after administration of alcohol and soy extract+alcohol. Mean values and standard error (n = 10). Figures correspond to systolic and diastolic blood pressure (mmHg), heart rate (beats/min), and drunkenness (mm).

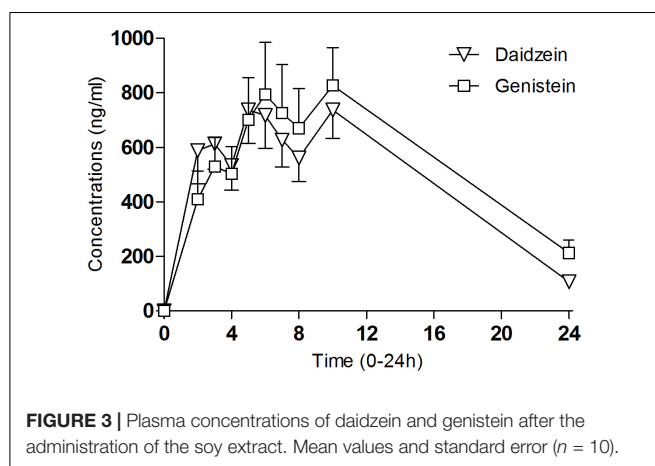
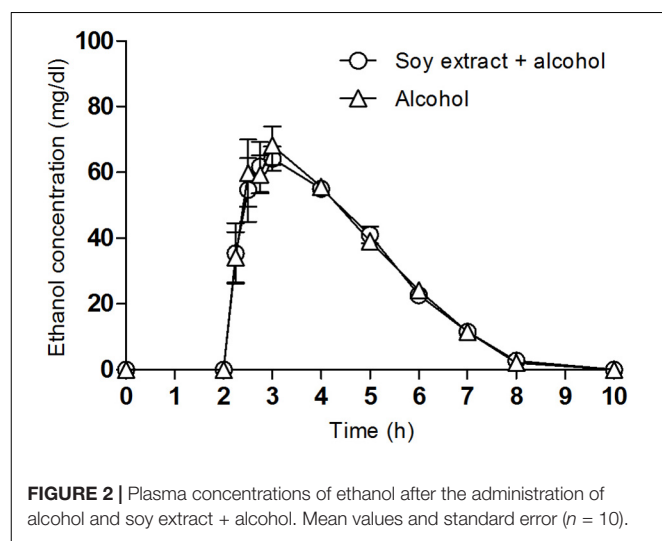


FIGURE 3 | Plasma concentrations of daidzein and genistein after the administration of the soy extract. Mean values and standard error ($n = 10$).

FIGURE 2 | Plasma concentrations of ethanol after the administration of alcohol and soy extract + alcohol. Mean values and standard error ($n = 10$).

TABLE 2 | Pharmacokinetic parameters of alcohol in plasma ($n = 10$).

Pharmacokinetic parameters	Soy extract + Alcohol	Alcohol	P-value
	Mean \pm SD	Mean \pm SD	
Cmax (ng/ml)	77 \pm 16.99	77 \pm 22.25	1
AUC ₀₋₁₀ (ng/ml/h)	216.57 \pm 30.40	219.67 \pm 27.2	0.806
Tmax (h)*	2.75 (2.5-4)	3 (2.5-4)	0.256

Mean values and standard deviation (mean values and standard deviation) for Cmax and AUC. Median values and range for Tmax. AUC, area under the curve; Cmax, peak/maximal concentration; SD, standard deviation; Tmax, time to reach peak concentrations. *Median values and range for Tmax (Wilcoxon test).

10 h (AUC₀₋₁₀) from ethanol plasma concentrations over time were determined using Pharmacokinetic Functions for Microsoft Excel (Joel Usansky, Atul Desai, and Diane Tang-Liu, Department of Pharmacokinetics and Drug Metabolism, Allergan, Irvine, CA, United States).

All statistical tests were performed with the PASW Statistics 18.0 (SPSS, Chicago, IL, United States). A value of $p < 0.05$ was considered statistically significant.

RESULTS

Subject Characteristics

The 10 healthy male participants had a mean age of 25.2 ± 3.6 years, mean weight 74.0 ± 7.0 kg, and a body mass index of 23.3 ± 2.6 . The participants consumed ethanol regularly (10.0 ± 7.1 standard drinks/week; 1 standard drink = 10 g of pure ethanol). All subjects completed the study and no serious adverse events occurred during the experimental sessions.

Physiological Effects

Table 1 shows a summary of the physiological and subjective effects. Regarding vital signs, no differences were observed in Emax and AUC for SBP, DBP, HR, and oral temperature between both conditions: alcohol and soy extract+alcohol (Figure 1, SBP,

DBP HR). A slight difference in cutaneous facial temperature was found in the Emax (1.59 and 0.75°C after alcohol and soy extract+alcohol, respectively). In the time course analysis, a slightly higher reduction of DBP was reported at 2 h (-2.89 , 0.8 ; $p < 0.05$), 3 h (-4.5 , -0.3 ; $p < 0.05$), 4 h (-9.67 , -3.3 ; $p < 0.01$), and 8 h (-4.78 , -1 ; $p < 0.05$) after administration with alcohol alone in comparison with soy extract+alcohol, respectively.

Subjective Effects

In VAS, alcohol and soy extract+alcohol showed very similar subjective effects (drunkenness, content, nausea, vertigo, dizziness, face flushing, and breathing difficulty), without statistically significant differences (Figure 1, drunkenness). However, the alcohol alone condition, in contrast to the soy extract+alcohol, showed higher scores for headache at 8 h (16 mm, 3.7 mm, respectively, $p < 0.01$).

With regard to the ARCI questionnaire, no differences were reported between alcohol and soy extract+alcohol.

Alcohol Concentrations

Pharmacokinetic parameters for blood ethanol concentrations over time curves are shown in Figure 2. No differences were observed for ethanol concentrations in blood between alcohol and soy extract+alcohol (Table 2). In both conditions, 10 h after drug administration, alcohol concentrations in plasma were deemed undetectable.

Daidzein, Genistein, and Equol Concentrations

Pharmacokinetic parameters for blood isoflavone concentrations (daidzein and genistein) over time curves are shown in Figure 3. Daidzein-concentrations peaked at 6.1 h (± 3.2) after administration and genistein at 7.3 h (± 3). The mean Cmax of daidzein was 1016.5 ng/ml (± 303.1) and genistein 1039.0 ng/ml (± 496.9). The concentrations of equol, a metabolite of daidzein, peaked at 24 h. Its pharmacokinetic parameters could not be calculated due to a limited number of evaluations (24 h). Multiple peaks along the plasma concentrations over time suggest an enterohepatic recirculation of isoflavones.

DISCUSSION

According to our findings, soy isoflavones neither interact with alcohol nor induce disulfiram-like effects with respect to alcohol pharmacokinetics and effects (vital signs and subjective/adverse effects). A previous study (Penetar et al., 2011) also suggested that the administration of a purified extract of a kudzu herbal medication containing isoflavones (mostly puerarin [19%], followed by daidzin [4%], and daidzein [2%]) did not increase the intoxicating effects of acute alcohol consumption in human volunteers (blood alcohol levels, subjective effects, and psychomotor performance).

We only found slightly significant changes in headache and, at some time points, facial temperature, and diastolic blood pressure when alcohol was administered. Such minimal changes could have been attributed to placebo (nocebo) effects, nevertheless, as a placebo capsule condition was not included we cannot substantiate this interpretation.

Our results were similar to a previous pharmacokinetic study in which the pharmacokinetic parameters for blood isoflavone concentrations showed double peaks in time-course plasma, thus supporting enterohepatic recirculation, characteristic of isoflavone metabolism (Rodríguez-Morató et al., 2015). We observed that the T_{max} for alcohol appeared between 2.5 and 4 h after administration, the T_{max} for the first peak for daidzein-genistein was between 2 and 4 h, and the maximal concentrations of both isoflavones were around 6 h. During 0.5–6 h blood alcohol levels were higher than those recommended for driving, within the range of the maximal isoflavone concentrations. As isoflavones show intensive presystemic metabolism concentrations in the liver they could be elevated enough at 0.5–2 h to inhibit hepatic metabolic enzymes (Chandrasekharan and Aglin, 2013; Rodríguez-Morató et al., 2015). We are, however, unaware of the consequences of alcohol administration regarding the time peak of isoflavone concentrations.

In contrast to disulfiram, some isoflavones are strong reversible inhibitors of ALDH2 and mild inhibitors of ALDH1. In the central nervous system, blocking ALDH2 inhibits dopamine metabolism by hindering the conversion of DOPAL to DOPAC, increasing levels of aldehyde DOPAL, and forming tetrahydropapaveroline (THP) in the ventral tegmental area. THP inhibits tyrosine hydroxylase (TH) and consequently decreases dopamine biosynthesis thus blunting the reinforcing effects of cocaine (Yao et al., 2010). In male mice, daidzein and genistein decreased cocaine-reinforcing effects, and daidzein, but not genistein, reduced cue-induced cocaine relapse (Martin et al., 2013). Alcohol is a substance commonly abused in combination with cocaine. A number of studies have found that about 60% of individuals with cocaine use disorder have co-occurring diagnoses of alcohol use disorder (Araos et al., 2017). Taking into account the pharmacodynamic profile of isoflavones, they could be used for future clinical trials studying possible treatments for substance use disorders (alcohol and cocaine), without requiring absolute alcohol abstinence as an inclusion requirement.

Our study has some limitations. The sample included a small number of healthy volunteers and not patients with

substance use disorders. Moreover, only males participated as isoflavones could present gender-based differences in metabolism (Soukup et al., 2016). Our research was performed using a single dose of isoflavones and a standard dose of alcohol for interaction studies. As the selected isoflavone dose was within the range of safe menopause symptom therapy, we are unable to advance results employing higher doses and/or repeated administrations. Disulfiram-like symptoms also appear at low-medium doses of alcohol when ALDH1 inhibitors are administered (Kline et al., 1987; Visapää et al., 2002). We employed a natural extract with a mixture of isoflavones and are thus unaware of whether the results could change after a single dose of each pure isoflavone or metabolite such as equol. Our study did not include a placebo condition, nevertheless, the non-significant symptomatic differences reported between the groups could be explained by placebo/nocebo effects. Neither were acetaldehyde concentrations analyzed nor any measure of psychomotor performance performed. The fact that Japanese and Chinese food contains elevated doses of isoflavones, and there are no adverse effects when alcohol is consumed, could support our results demonstrating a possible isoflavone mechanism of action on ALDH2. We did not, however, include a measure of the activity of these enzymes, and our findings do not provide significant evidence about the effect of soy extract on human aldehyde-dehydrogenase (or ALDH) isozymes.

CONCLUSION

Substances such as soy isoflavones can be safely administered in combination with alcohol. They could be a new strategy for the treatment of substance use disorders without involving the risks associated with disulfiram.

DATA AVAILABILITY

The datasets for this manuscript are not publicly available because Data will be available to other researchers following publication. Requests to access the datasets should be directed to mtorrens@parcdesalutmar.cat.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

MF, MT, EP, CP-M, FF, and RM-R conceptualized the study design. MF, EP, CP-M, and RM-R collected the data. RdIT and NP analyzed the alcohol and isoflavones. MF, MT, EP, CP-M, FF, RdIT, and RM-R wrote the manuscript.

FUNDING

This work was supported by the following projects (Instituto de Salud Carlos III-ISCIII Red de Trastornos Adictivos-RTA RD16/0017/0003 and RD16/0017/0010, Juan Rodés JR16/00020), integrated in the National R + D + I and funded by the

ISCIII and the European Regional Development Fund (FEDER). In addition, by grants from Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad (Plan Nacional Sobre Drogas, PNSD 2015I054 and 2016I024), Suport Grups de

Recerca AGAUR Gencat (2017 SGR 316, 2017 SGR 530, and 2017 SGR 138), and Instrumental Action for the Intensification of Health Professionals-Specialist Practitioners (PERIS: SLT006/17/00014).

REFERENCES

- Araos, P., Vergara-Moragues, E., González-Saiz, F., Pedraz, M., García-Marchena, N., Romero-Sanchiz, P., et al. (2017). Differences in the rates of drug polyconsumption and psychiatric comorbidity among patients with cocaine use disorders according to the mental health service. *J. Psychoactive Drugs* 49, 306–315. doi: 10.1080/02791072.2017.1342151
- Arofo, M. P., Overstreet, D. H., Yao, L., Fan, P., Lawrence, A. J., Tao, G., et al. (2009). Suppression of heavy drinking and alcohol seeking by a selective ALDH-2 Inhibitor. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 33, 1935–1944. doi: 10.1111/j.1530-0277.2009.01031.x
- Bracken, B. K., Penetar, D. M., Maclean, R. R., and Lukas, S. E. (2011). Kudzu Root extract does not perturb the sleep/wake cycle of moderate drinkers. *J. Altern. Complement. Med.* 17, 961–966. doi: 10.1089/acm.2010.0540
- Brewer, C. (1984). How effective is the standard dose of disulfiram? A review of the alcohol-disulfiram reaction in practice. *Br. J. Psychiatry* 144, 200–202. doi: 10.1192/bjp.144.2.200
- Chandrasekharan, S., and Aglin, A. (2013). Pharmacokinetics of dietary isoflavones. *J. Steroids Hormon. Sci.* S12:004. doi: 10.4172/2157-7536.S12-004
- Christensen, J. K., Møller, I. W., Rønsted, P., Angelo, H. R., and Johansson, B. (1991). Dose-effect relationship of disulfiram in human volunteers. I: clinical studies. *Pharmacol. Toxicol.* 68, 163–165. doi: 10.1111/j.1600-0773.1991.tb01215.x
- Farré, M., Tomillero, A., Pérez-Mañá, C., Yubero, S., Papaseit, E., Roset, P.-N., et al. (2015). Human pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) after repeated doses taken 4h apart Human pharmacology of MDMA after repeated doses taken 4h apart. *Eur. Neuropsychopharmacol.* 25, 1637–1649. doi: 10.1016/j.euroneuro.2015.05.007
- Gao, G.-Y., Li, D.-J., and Keung, W. M. (2001). Synthesis of potential antidipsotropic isoflavones: inhibitors of the mitochondrial monoamine oxidase-aldehyde dehydrogenase pathway. *J. Med. Chem.* 44, 3320–3328. doi: 10.1021/jm0101390
- Gao, G. Y., Li, D. J., and Keung, W. M. (2003). Synthesis of daidzin analogues as potential agents for alcohol abuse. *Bioorganic Med. Chem.* 11, 4069–4081. doi: 10.1016/S0968-0896(03)00397-3
- Keung, W. M. (2003). Anti-dipsotropic isoflavones: the potential therapeutic agents for alcohol dependence. *Med. Res. Rev.* 23, 669–696. doi: 10.1002/med.10049
- Kline, S. S., Mauro, V. F., Forney, R. B. Jr., Freimer, E. H., and Somani, P. (1987). Cefotetan-induced disulfiram-type reactions and hypoprothrombinemia. *Antimicrob. Agents Chemother.* 31, 1328–1331.
- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., et al. (2012). Aldehyde dehydrogenase inhibitors: a comprehensive review of the pharmacology, mechanism of action, substrate specificity, and clinical application. *Pharmacol. Rev.* 64, 520–539. doi: 10.1124/pr.111.005538
- Lamas, X., Farré, M., Llorente, M., and Camí, J. (1994). Spanish version of the 49-item short form of the addiction research center inventory (ARCI). *Drug Alcohol Depend.* 35, 203–209. doi: 10.1016/0376-8716(94)90075-2
- Lowe, E. D., Gao, G.-Y., Johnson, L. N., and Keung, W. M. (2008). Structure of Daidzin, a naturally occurring anti-alcohol-addiction agent, in complex with human mitochondrial aldehyde dehydrogenase. *J. Med. Chem.* 51, 4482–4487. doi: 10.1021/jm800488j
- Lu, L., Liu, Y., Zhu, W., Shi, J., Liu, Y., Ling, W., et al. (2009). Traditional medicine in the treatment of drug addiction. *Am. J. Drug Alcohol Abuse* 35, 1–11. doi: 10.1080/00952990802455469
- Lukas, S. E., Penetar, D., Berko, J., Vicens, L., Palmer, C., Mallya, G., et al. (2005). An extract of the Chinese herbal root kudzu reduces alcohol drinking by heavy drinkers in a naturalistic setting. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 29, 756–762. doi: 10.1097/01.ALC.0000163499.64347.92
- Lukas, S. E., Penetar, D., Su, Z., Geaghan, T., Maywalt, M., Tracy, M., et al. (2013). A standardized kudzu extract (NPI-031) reduces alcohol consumption in nontreatment-seeking male heavy drinkers. *Psychopharmacology* 226, 65–73. doi: 10.1007/s00213-012-2884-9
- Martin, M., Cabrera, R., Maldonado, R., Torrens, M., de la Torre, R., and Farré, M. (2013). "Isoflavone administration reduces cocaine self-administration responses and cue-induced cocaine seeking behavior and relapse in mice," in *Proceedings of the Dopamine 2013. Program and Book of Abstracts*, Alghero.
- Messina, M. (2014). Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *Am. J. Clin. Nutr.* 100, 423S–430S. doi: 10.3945/ajcn.113.071464
- Michelfelder, A. J. (2009). Soy: a complete source of protein. *Am. Fam. Physician* 79, 43–47.
- Overstreet, D. H., Keung, W.-M., Rezvani, A. H., Massi, M., and Lee, D. Y. W. (2003a). Herbal remedies for alcoholism: promises and possible pitfalls. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 27, 177–185. doi: 10.1097/01.ALC.0000051022.26489.CF
- Overstreet, D. H., Kralic, J. E., Morrow, A. L., Ma, Z. Z., Zhang, Y. W., and Lee, D. Y. W. (2003b). NPI-031G (puerarin) reduces anxiogenic effects of alcohol withdrawal or benzodiazepine inverse or 5-HT_{2C} agonists. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 75, 619–625. doi: 10.1016/S0091-3057(03)00114-X
- Overstreet, D. H., Lee, Y.-W., Rezvani, A. H., Pei, Y.-H., Criswell, H. E., and Janowsky, D. S. (1996). Suppression of alcohol intake after administration of the Chinese herbal medicine, NPI-028, and its derivatives. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 20, 221–227. doi: 10.1111/j.1530-0277.1996.tb01633.x
- Papaseit, E., Pérez-Mañá, C., Mateus, J.-A., Pujadas, M., Fonseca, F., Torrens, M., et al. (2016). Human pharmacology of mephedrone in comparison with MDMA. *Neuropsychopharmacology* 41, 2704–2713. doi: 10.1038/npp.2016.75
- Peiró, A. M., Farré, M., Roset, P. N., Carbó, M., Pujadas, M., Torrens, M., et al. (2013). Human pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, ecstasy) after repeated doses taken 2 h apart. *Psychopharmacology* 225, 883–893. doi: 10.1007/s00213-012-2894-7
- Penetar, D. M., Maclean, R. R., McNeil, J. F., and Lukas, S. E. (2011). Kudzu extract treatment does not increase the intoxicating effects of acute alcohol in human volunteers. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 35, 726–734. doi: 10.1111/j.1530-0277.2010.01390.x
- Penetar, D. M., Toto, L. H., Farmer, S. L., Lee, D. Y.-W., Ma, Z., Liu, Y., et al. (2012). The isoflavone puerarin reduces alcohol intake in heavy drinkers: a pilot study. *Drug Alcohol Depend.* 126, 251–256. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2012.04.012
- Penetar, D. M., Toto, L. H., Lee, D. Y.-W., and Lukas, S. E. (2015). A single dose of kudzu extract reduces alcohol consumption in a binge drinking paradigm. *Drug Alcohol Depend.* 153, 194–200. doi: 10.1016/j.drugalcdep.2015.05.025
- Rodríguez-Morató, J., Farré, M., Pérez-Mañá, C., Papaseit, E., Martínez-Riera, R., de la Torre, R., et al. (2015). Pharmacokinetic comparison of soy isoflavone extracts in human plasma. *J. Agric. Food Chem.* 63, 6946–6953. doi: 10.1021/acs.jafc.5b02891
- Smith, L. J., Kalhan, R., Wise, R. A., Sugar, E. A., Lima, J. J., Irvin, C. G., et al. (2015). Effect of a soy isoflavone supplement on lung function and clinical

- outcomes in patients with poorly controlled asthma. *JAMA* 313, 2033–2043. doi: 10.1001/jama.2015.5024
- Soukup, S. T., Helppi, J., Müller, D. R., Zierau, O., Watzl, B., Vollmer, G., et al. (2016). Phase II metabolism of the soy isoflavones genistein and daidzein in humans, rats and mice: a cross-species and sex comparison. *Arch. Toxicol.* 90, 1335–1347. doi: 10.1007/s00204-016-1663-5
- Soyka, M., and Rösner, S. (2010). Emerging drugs to treat alcoholism. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 15, 695–711. doi: 10.1517/14728214.2010.500811
- U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service (2015). *USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods, Release 2.1. Nutrient Data Laboratory*. Available at: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/isoflav> [accessed January 4, 2019].
- Visapää, J. P., Tillonen, J. S., Kaihovaara, P. S., and Salaspuro, M. P. (2002). Lack of disulfiram-like reaction with metronidazole and ethanol. *Ann. Pharmacother.* 36, 971–974.
- Yao, L., Fan, P., Arolfo, M., Jiang, Z., Olive, M. F., Zablocki, J., et al. (2010). Inhibition of aldehyde dehydrogenase-2 suppresses cocaine seeking by generating THP, a cocaine use-dependent inhibitor of dopamine synthesis. *Nat. Med.* 16, 1024–1028. doi: 10.1038/nm.2200

Conflict of Interest Statement: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2019 Martínez-Riera, Pérez-Mañá, Papaseit, Fonseca, de la Torre, Pizarro, Torrens and Farré. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

5.3 Estudio 3: Ensayo piloto de las isoflavonas de la soja en el Trastorno por Consumo de Cocaína.

Roser Martínez-Riera, Francina Fonseca, Liliana Galindo, Rafael de la Torre, Nieves Pizarro, Marta Torrens, Magí Farré. Ensayo piloto de las isoflavonas de la soja en el Trastorno por Consumo de Cocaína. (PENDIENTE DE PUBLICACIÓN).

Ensayo piloto de las isoflavonas de la soja en el Trastorno por Consumo de Cocaína.

Autores y afiliaciones

Roser Martínez-Riera^{1,2,3}, Francina Fonseca^{1,2}, Liliana Galindo¹, Rafael de la Torre^{6,7}, Nieves Pizarro⁶, Marta Torrens^{1,2}, Magí Farré^{4,5}

¹ Institut de Neuropsiquiatria i Addiccions, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, España.

² Departament de Psiquiatria i Medicina Legal Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España.

³ Red de Salud Mental de Guipúzcoa, Osakidetza, Guipúzcoa, España.

⁴ Departament de Farmacologia, Terapèutica i Toxicologia, Universitat Autònoma de Barcelona, Cerdanyola del Vallés, España.

⁵ Unitat de Farmacologia Clínica, Hospital Universitari Germans Trias i Pujol y Institut de Recerca Germans Trias i Pujol (IGTP), Badalona, España.

⁶ Grup d'Investigació en Farmacologia integrada i Neurociència de Sistemes, Institut Hospital del Mar d'Investigacions Mèdiques (IMIM), Barcelona, España.

⁷ Departament de Ciències Experimentals i Salut (CEXS), Universitat Pompeu Fabra, Barcelona, España.

*Correspondencia: Marta Torrens, Unitat d'Addiccions. Hospital del Mar. 08003 Barcelona, Spain. Phone: +34932483175, Mtorrens@parcdesalutmar.cat

Abstract

La soja contiene diferentes isoflavonas (daidzina, genistina y glicitina; principalmente daidzina) y de ellas, principalmente daidzina, se ha descrito que actúan como inhibidores reversibles de la aldehído deshidrogenasa 2-ALDH2. Existen estudios en animales que relacionan dicha actividad con una reducción del consumo de cocaína. El objetivo de este estudio fue llevar a cabo un ensayo piloto exploratorio para evaluar la posible eficacia de un inhibidor natural de ALDH2 (daidzina-daidzeína) en pacientes con Trastorno por Consumo de Cocaína. Se incluyeron 9 sujetos diagnosticados de Trastorno por Consumo de Cocaína Severo, se realizó un estudio unicéntrico, abierto, no controlado durante 12 semanas de tratamiento y 4 semanas de seguimiento posterior. Se llevaron a cabo análisis de orina, análisis de tóxicos en cabello y diferentes escalas de gravedad del consumo. De todos los sujetos, el 77.8% (7) finalizaron el estudio, ninguno adquirió la abstinencia completa en las últimas 3 semanas de tratamiento, pero de acuerdo con el Informe de Uso de Sustancias (SUR) 3 de ellos redujeron el consumo a menos del 20% en ese período de tiempo. El análisis de los resultados de la Escala de Severidad de la Dependencia (SDS), mostró una reducción significativa de su puntuación entre las semanas 0-12 ($p=0.024$), semanas 0-16 ($p=0.002$) y una tendencia a la significación entre las semanas 12-16 (1.78 ± 2.59 , $p=0.073$); la Escala Breve de Craving a Sustancias (BSCS) y la escala de Valoración de la Gravedad Selectiva para Cocaína (CSSA) redujeron sus puntuaciones, pero no significativamente. Los análisis de isoflavonas en orina mostraron que 8 de los sujetos tomaron el tratamiento durante las semanas del estudio. Estos resultados preliminares, muestran una reducción de la severidad del consumo y una alta retención a tratamiento a pesar que los individuos no adquirieron la abstinencia; por lo que daidzina-daidzeína podría ser considerada un abordaje terapéutico potencial para el Trastorno por Consumo de Cocaína en futuros estudios

Palabras Clave:

Isoflavonas, daidzina, enzima aldehído deshidrogenasa 2, cocaína, ensayo piloto.

Introducción

El Informe Mundial de Drogas de 2019, que realiza la Oficina de las Naciones Unidas contra la Droga y el Delito (UNODC), en sus datos refleja que en 2017, 18 millones de personas entre 15 y 64 años, consumieron cocaína en el último año al menos una vez, cifra que representa un 0.4% de la población mundial en esta franja de edades. En los últimos años, las regiones a nivel mundial con mayor número de consumidores de cocaína han sido Norte América, Oceanía , Europa Occidental y Central. Según el Observatorio Europeo sobre Drogas (EMCDDA, 2019), en Europa, 3.9 millones de personas consumieron cocaína en el último año al menos una vez (el 1.2% de la población) y 33500 personas iniciaron tratamiento para esta droga por primera vez. La cocaína representa en Europa la droga estimulante que más se consume y se aprecian datos de incremento de dicho consumo en los últimos años.

El mecanismo de acción de la cocaína, se caracteriza por la inhibición de los transportadores de monoaminas de la membrana neuronal presináptica (dopamina, noradrenalina y serotonina), pero en especial de dopamina. A través de esta inhibición, se bloquea la recaptación y conlleva un incremento de las concentraciones en el espacio sináptico de dopamina y del resto de monoaminas (Camí y Farré, 2003). Los síntomas reforzadores positivos del consumo de cocaína, como pueden ser la euforia o sensación de placer entre otros, se relacionan con el incremento de los niveles de dopamina en el núcleo estriado y seguidamente una mayor ocupación de los receptores postsinápticos (Fowler et al., 2001). La cocaína produce una clínica aguda a nivel del sistema nervioso que se caracteriza por el aumento del rendimiento intelectual, incremento de la activación psicomotora, disminución de la fatiga y menos necesidad de horas de sueño, alerta, euforia y hiporexia. También se producen síntomas como el incremento de la tensión arterial y la frecuencia cardíaca por su función vasoconstrictora, midriasis y bruxismos, relacionados con incrementos de los niveles de adrenalina, cortisol, norepinefrina y factor liberador de corticotropina (Sarnyai et al., 2001). El consumo agudo de cocaína

conlleva complicaciones como la muerte, clínica psiquiátrica, neurológica, cardíaca y otras complicaciones somáticas.

Por otro lado, un consumo continuado y crónico de cocaína, produce una reducción del número de transportadores de dopamina en el sistema nervioso central y como consecuencia se reduce la sensibilidad del sistema de recompensa, produciendo el incremento del consumo repetitivo y compulsivo (atracones) (Koob and Volkow, 2010), la pérdida de control y se establece un Trastorno por Consumo de Cocaína en el que se ha descrito una reducción del volumen de materia gris y una hipofuncionalidad del córtex prefrontal (Volkow et al., 2011; Volkow et al., 2010; Hirsiger et al., 2019).

El consumo de cocaína se realiza habitualmente por la vía intranasal, produciendo un efecto máximo a los 15-30 minutos y alcanza la concentración máxima a los 30-45 minutos manteniendo su efecto durante 3-4 horas. Los principales metabolitos de la cocaína son benzoilecgonina (BE, 40%) y la ecgonina metil éster (EME, 50%), ambos inactivos. Benzoilecgonina se produce por hidrólisis espontánea y por una carboxilesterasa hepática; las esterasas plasmáticas y hepáticas (pseudocolinesterasas) producen Ecgonina metil éster O'Brien, 2019). La cocaína tiene una vida media de eliminación de 0.5-1.5 horas y sus metabolitos 6-8 horas para Benzoilecgonina y 3-8 horas para Ecgonina metil éster (Farré et al., 1993; Farré et al., 1997).

Actualmente, no disponemos de fármacos específicos para el abordaje del Trastorno por Consumo de Cocaína. Considerando el impacto de esta enfermedad a nivel epidemiológico a nivel mundial, se considera de clara importancia la búsqueda de fármacos eficaces. Existen estudios acerca del uso específico de determinados fármacos, pero sin demostrar la suficiente eficacia y evidencia, como los anticonvulsivantes (Alvarez et al., 2010; Minozzi et al., 2015), psicoestimulantes (Castells et al., 2010; Castells et al., 2016; Pérez-Mañá et al., 2011;), antidepresivos (Pani et al., 2011; Torrens et al., 2005; Torrens et al., 2011) y antipsicóticos (Álvarez et al., 2013; Indave et al., 2016, Farré et al., 2017). Las líneas de investigación se focalizan en los mecanismos de producción de las diferentes monoaminas (Kohut and Bergman, 2017).

Hasta el momento, el fármaco cuyo mecanismo de acción se ha descrito que interacciona con la dopamina, disulfiram, es el tratamiento que ha demostrado los mejores resultados (Gaval-Crux and Weinshenker., 2009; Pani et al., 2010); sin embargo, los datos aún son controvertidos, algunos estudios aportan resultados beneficiosos mientras que otros no (Carroll et al., 2016). Se ha descrito el posible mecanismo por el que disulfiram podría reducir el consumo de cocaína, y es a través de la inhibición de la enzima dopamina- β -hidroxilasa (DBH) (encargada de la metabolización de dopamina a norepinefrina), produciendo el incremento de las concentraciones de dopamina en determinadas áreas cerebrales (Schroeder et al., 2010; Weinshenker et al., 2010). Existe otro factor de controversia en el uso de disulfiram, algunos datos apuntan a su menor efectividad en las mujeres (DeVito et al., 2014). Por otro lado, el uso de disulfiram está contraindicado en el consumo activo de alcohol por sus efectos secundarios actuando como inhibidor de la aldehído deshidrogenasa-1 (ALDH1) y como se conoce, las tasas de consumo concomitante de alcohol y cocaína son muy elevadas, del 60% o superiores (Araos et al., 2017).

Diferentes estudios hablan del mecanismo de acción de los inhibidores selectivos de la aldehído deshidrogenasa-2 (ALDH2) como posible abordaje del trastorno por consumo de cocaína (Koppaka et al., 2012; Weinshenker, 2010; Yao et al., 2010). La inhibición de la ALDH2 bloquea la conversión del sustrato DOPAL hacia DOPAC aumentando los niveles de éste y como consecuencia se forma junto con la dopamina el producto de condensación tetrahidropapaverolina (THP) en el área tegmental ventral. El producto THP, reduce la biosíntesis de dopamina a través de la inhibición de la tiroxin hidroxilasa (TH) y como consecuencia se reduce la capacidad de producir el refuerzo positivo por parte de la cocaína.

Se ha descrito la existencia de inhibidores selectivos naturales de la aldehído deshidrogenasa-2 (ALDH2) en los extractos de soja, las isoflavonas (Lowe et al., 2008). Los extractos de soja contienen diferentes isoflavonas como daidzina, genistina y glicitina; sobretodo daidzina realiza la función como potente inhibidor reversible selectivo de la ALDH2. El metabolito activo de

daidzina es la daidzeína y para la genistina es a genisteína; a nivel intestinal, las bacterias transforman daidzeína en otro metabolito activo, equol.

Diferentes estudios apoyan la acción de las isoflavonas de forma selectiva en la ALDH2 y la no acción sobre ALDH1, en contraste con disulfiram; por lo que, si se consume alcohol, no se activa la vía del acetaldehído y por lo tanto, no aparecen los efectos adversos relacionados (efecto disulfiram) (Penetar et al., 2011; Martínez et al., 2019). Recientemente, Amygdala Neurosciences (<http://www.amygns.com>) ha publicado un estudio en fase 2 de ANS-6637, que se caracteriza por ser un inhibidor reversible selectivo de ALDH2, para el abordaje de los Trastornos por Consumo de Sustancias; previamente publicaron el estudio en fase 1 donde demostraban su seguridad y tolerabilidad con el consumo de alcohol.

A lo largo de tiempo, la medicina tradicional China ha usado las isoflavonas para el tratamiento del Trastorno por Consumo de Alcohol (Lu et al., 2009; Overstreet et al., 2003). Distintos estudios tanto en animales (Arolfo et al., 2009) como humanos and humanos han observado una reducción del consumo de (Lukas et al., 2013; Penetar et al., 2015).

En la actualidad, no existen estudios en humanos que valoren el posible efecto de las isoflavonas o otros inhibidores sintéticos de la ALDH2 en el consumo de la cocaína. En modelos animales, sí que se han apreciado resultados específicos con la toma de isoflavonas como la reducción de recaídas condicionadas por estímulos ambientales y la reducción de la repetición del consumo (Yao et al., 2010; Martin et al., 2013). El objetivo de este estudio es valorar el posible efecto de un inhibidor natural de ALDH2 (daidzina) en pacientes con Trastorno por Consumo de Cocaína.

Sujetos y método

Diseño del estudio

Se trata de un estudio piloto exploratorio, abierto, no controlado, unicéntrico, de 12 semanas de tratamiento y 4 de seguimiento que se desarrolló en las Centro

de Tratamiento de Adicciones – Barceloneta Instituto de Neuropsiquiatría y Adicciones del Parc de Salut Mar de Barcelona. El protocolo del estudio fue aprobado por el Comité Ético de Investigación Clínica Parc de Salut MAR (CEIC-PSMAR, ref. 2014/5580) y se llevó a cabo de acuerdo con la Declaración de Helsinki y la legislación local (Ley de Investigación Biomédica, 2008). Todos los sujetos fueron informados acerca del estudio, se comentaron sus preguntas y/o dudas y después firmaron un consentimiento informado. Para facilitar la adherencia a las visitas y el cumplimiento, los voluntarios participaban en un programa de compensación económica que recibían cada dos semanas, al completar todas las visitas.

Todos los participantes recibieron el mismo tratamiento de extracto de soja y la dosis se ajustó al contenido de daidzina-daidzeína, administrando 40mg por la mañana y 40mg por la noche. La variable principal del estudio fue la abstinencia a cocaína durante las tres últimas semanas de la fase de tratamiento (semana 10-12). Las variables secundarias fueron el porcentaje de muestras de orina negativas para los metabolitos de la cocaína (Benzoilecgonina <150ng/ml y Ecgonina Metil Éster <15ng/ml) de todas las muestras de orina programadas durante las 8 últimas semanas de la fase de tratamiento; y la gravedad del trastorno por consumo de cocaína evaluada mediante las puntuaciones de las diferentes escalas que se administraron.

Preparado de Isoflavonas

Para la realización del estudio se utilizó un preparado comercial de extracto de soja: Super-Absorbable Soy Isoflavones®, hard gelatin capsules, Life-Extension, US. Cada cápsula, de acuerdo con el fabricante, contenía un total de 54mg de isoflavonas (22mg daidzina-daidzeína, 28mg genistina-genisteína y 4mg glicitina-gliciteína). La dosis que se administró (4 cápsulas diarias), se ajustó para dar un total de 88mg de daidzina-daidzeína, el doble de la dosis recomendada como en un ensayo clínico para tratamiento del asma (Smith et al., 2015) y para los síntomas de la menopausia (según la ficha técnica de este preparado y otros comercializados).

Sujetos

Se reclutaron pacientes con trastorno por consumo de cocaína según criterios del DSM-5 (APA,2013) que cumplieran los siguientes criterios de inclusión: (i) edad igual o mayor de 18 años y menor de 60 años (ii) presentar diagnóstico actual de Trastorno por Consumo de Cocaína (criterios DSM5); (iii) estar buscando tratamiento para el Trastorno por Consumo de Cocaína; (iv) proporcionar al menos una muestra de orina positiva en un periodo de 2 semanas previo al inicio del estudio; (v) se permitió el diagnóstico actual de Trastorno por Consumo de Alcohol sin dependencia física grave (ver criterios de exclusión) y de Trastorno por Consumo de Cannabis (criterios DSM5); (vi) mujeres con potencial reproductivo en tratamiento con anticonceptivos.

Los criterios de exclusión fueron: (i) diagnóstico actual de Trastorno por Consumo de cualquier sustancia psicoactiva (criterios DSM5)(excepto nicotina, alcohol o cannabis no severo); (ii) haber recibido tratamiento con algún opiáceo sustitutivo (metadona, LAAM, buprenorfina) en los últimos 2 meses; (iii) padecer enfermedades neurológicas o psiquiátricas graves, clínicamente inestables que pudieran interferir con el desarrollo y resultados del estudio; (iv) presentar alguna enfermedad médica peligrosa para la vida o progresiva que pudiera comprometer la seguridad de los sujetos o la realización del estudio; (v) SIDA, tuberculosis, hepatitis o sífilis activa; (vi) estar obligado legalmente a realizar tratamiento; (vii) antecedentes personales de cáncer endometrial o de mama, o cualquier cáncer hormonodependiente en mujeres; (viii) hipersensibilidad a derivados de la soja; (ix) estar recibiendo tratamiento con derivados de la soja por otra causa; (xi) haber estado o estar en tratamiento con fármacos que pudieran provocar efectos secundarios con la interacción con isoflavonas o pudieran interferir con los resultados del estudio; (xii) estar embarazada o lactando; (xiii) asma o estar en tratamiento con beta-agonistas.

Evaluación clínica

Se administró un formulario específicamente diseñado para la recogida de los datos sociodemográficos, familiares y de historial previo de antecedentes médicos y de enfermedades psiquiátricas.

Evaluación psiquiátrica

El diagnóstico psiquiátrico se realizó mediante la la Versión Española de la Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders IV (PRISM-IV; Torrens et al., 2004), entrevista semiestructurada diseñada para evaluar trastornos actuales y a lo largo de la vida del DSM-IV-TR (cita APA) Además se administraron los siguientes instrumentos:

-Versión Española del Addiction Severity Index Lite/ (ASI-lite; Cacciola et al., 2007), entrevista estructurada que estima la severidad de la adicción en siete áreas distintas (médica, empleo, uso de drogas, uso de alcohol, legal, familiar/social y psicológica), se utilizó la versión corta, las puntuaciones para cada área van de 0 a 9 (cuanto mayor es la puntuación mayor es el nivel de gravedad del trastorno por consumo).

-Substance Use Report (SUR; Sobell, L.C., Sobell, M. B.falta data), cuestionario de autoinforme que mide los días de uso reciente de drogas, las dosis y las rutas de administración.

-Severity Dependence Scale en versión española/ (SDS; González-Saiz et al., 2008), escala autoaplicada de medida general de la gravedad de la adicción que consta de 5 ítems que se puntúan en una escala tipo likert con 4 puntos (0-3) y la puntuación total es la suma de las puntuaciones en cada ítem, cuanto mayor es la puntuación mayor es el nivel de trastorno por.

-Brief Substance Craving Scale (BSCS, Somoza et al., 1995), escala autoaplicada que consta de 16 ítems y evalúa en una escala tipo likert de 5 ítems, la intensidad y la frecuencia del craving para cocaína y otras sustancias en las últimas 24 horas.

-Cocaine Selective Severity Assessment versión española (CSSA; Kampan et al., 1998; Pérez de los Cobos et al., 2014), escala heteroaplicada que evalúa específicamente la severidad de la adicción a la cocaína y consta de 18 ítems que evalúan síntomas que normalmente aparecen tras cese abrupto del consumo (craving, estado de ánimo depresivo, cambios en el apetito, trastornos del sueño, letargo o bradicardia), cada ítem se puntúa en una escala de 0 a 7 y la puntuación total es la suma de las puntuaciones en cada ítem.

-Clinical Global Impression en versión española (CGI; Guy,1976), escala heteroaplicada que consta de dos subescalas que son CGI-S (mide la

severidad del trastorno) y CGI-I (valora la mejoría del trastorno entre visitas), cada una de ellas compuesta por un único ítem con 8 opciones de respuesta (0-7).

-Revised Clinical Institute Withdrawal Assessment for Alcohol Scale en versión española/ (CIWA-Ar; Sullivan et al., 1998), escala heteroaplicada que mide la gravedad del síndrome de abstinencia al alcohol y consta de 10 ítems, a mayor puntuación mayor gravedad.

-HIV Risk-Taking Behaviour Scale en versión española (HRBS; Darke et al., 1991), escala heteroaplicada de 11 ítems que valora el uso intravenoso de drogas y las conductas sexuales de riesgo.

-Versión española de la 17-item Hamilton Rating Scale for Depression (HAM-D; Bobes et al., 2003), escala heteroaplicada que valora el nivel de depresión subjetivo del paciente preguntando sobre 21 síntomas propios de la depresión.

-Versión española de la SF-36 Health Survey/ (SF-36; Alonso et al., 1995), escala autoaplicada que valora la calidad de vida relacionada con la salud y evalúa 8 dimensiones (0 a 100), a mayor puntuación mejor nivel de salud.

-Versión española de la Columbia Suicide Severity Rating Scale (C-SSRS; Al-Halabí et al., 2016), escala heteroaplicada que valora la intensidad de la tendencia suicida.

Procedimiento

En la visita de selección, a los participantes se les realizó examen físico, electrocardiograma de 12 derivaciones, análisis de sangre completo y de orina (incluyendo drogas en orina), recogida de cabello para análisis de drogas, test de embarazo. También se les administraron diferentes instrumentos: PRISM; SUR; BSCS; SDS; CSSA; HAM-D; C-SSRS y la CIWA-Ar.

Los sujetos realizaron 12 semanas de tratamiento y después 4 semanas de seguimiento. A lo largo del estudio, se recogieron muestras de orina tres veces por semana para la detección de drogas y para el análisis cuantitativo de los metabolitos de la cocaína (benzoilecgonina y ecgonina metil éster); se realizó análisis de sangre en las semanas 6, 12 y 16; test de embarazo en las semanas inicio, 6 y 12; análisis de drogas en cabello en las semanas 6, 12 y 16 y un electrocardiograma de 12 derivaciones en la semana 12. Las escalas C-

SSRS y 17-item HAM-D se administraron en las semanas inicio, 4, 8, 12 y 16; HRBS y SF-36, en las semanas inicio, 12 y 16; CGI, SUR, SDS, BSCS, CSSA y la valoración de posibles efectos secundarios, se evaluaron en las semanas inicio, 2, 4, 6, 8, 10, 12 y 16 y la escala ASI-Lite, en las semanas 0 y 12.

Análisis Estadístico

Se realizó una descripción de todas las variables de interés, para el que se calcularon porcentajes, medias y sus desviaciones estándar. Se llevó a cabo un análisis por intención de tratar para el análisis de los resultados. La comparación de las puntuaciones de las escalas a lo largo de las semanas se analizó mediante el test de t de Student para datos apareados. Todos los tests estadísticos se llevaron a cabo mediante el PASW Statistics 18.0 (SPSS, Chicago, IL, United States). Un valor de $p < 0.05$ fue considerado estadísticamente significativo.

Resultados

Características sociodemográficas de la muestra

Se incluyeron nueve sujetos (8 hombres y una mujer) con una edad media 48 ± 9.27 años, un peso medio de 84.1 ± 16.19 kg y un Índice de masa corporal de 27.3 ± 4.4 . Ninguno de los participantes precisó cuidados o tratamiento especial ni presentó efectos secundarios durante el estudio.

En cuanto a las características sociales, se observó como 6(66.7%) participantes estaban casados, 4 (44.4%) tenían estudios primarios, 5(55.6%) estudios secundarios-superiores y 4 (44.4%) trabajaban en el momento de realización del estudio.

Características clínicas de la muestra

Todos los pacientes tenían un Trastorno por Consumo de Cocaína Grave según criterios DSM5. La edad media de inicio del trastorno era de 30.44 ± 9.28 . De entre todos, 6 (66.7%) de ellos tenían historia previa de haber recibido tratamiento previamente por un Trastorno por Consumo de Sustancias En

cuanto al uso concomitante de otras sustancias, 4(44%) tenían historia previa antes del último año de Trastorno por Consumo de Alcohol y 1(11.1%) en el último año; 1 (11.1%) tenían historia previa antes del último año de Trastorno por Consumo de Cannabis y 1 (11.1%) en el último año y 1 (11.1%) tenían historia previa antes del último año de Trastorno por Consumo de Heroína y ninguno en el último año.

Los resultados obtenidos mediante la entrevista PRISM, mostraron que ningún participante fue diagnosticado de Trastorno en el Eje II y en cuanto a diagnósticos del Eje I no relacionados con sustancias, 4 (44.4%) fueron diagnosticados de Trastorno del estado de Ánimo en remisión. Del total de sujetos, 7 (77.8%) tenían historia previa de haber recibido tratamiento por un Trastorno Mental no relacionado con Sustancias.

Adherencia al tratamiento y abstinencia

Adherencia

De los 9 participantes, 7 (77.8%) finalizaron el estudio en la semana 16, 1 (11.1%) en la semana 12 y 1 (11.1%) abandonó en la semana 4. Mediante el análisis de las concentraciones en orina de daidzeína, genisteína y equol, se determinaron los pacientes que habían tomado el tratamiento a lo largo de las semanas que permanecieron en el estudio que fueron 8 (88.9%), mientras que 1 (11.1%) no tomó el tratamiento (las concentraciones de isoflavonas en orina estuvieron por debajo del límite de detección).

Abstinencia

De acuerdo con la variable principal de estudio (abstinencia a cocaína durante las 3 últimas semanas de tratamiento), ningún participante estuvo abstinentemente completamente según controles de orina, entre la semana 10 y 12. Pero según el registro de consumo diario autoadministrado por los participantes, 3(33.3%) habían consumido menos de un 20% de los días comprendidos entre la semana 10 y 12. Entre las semanas 5-12 de estudio el porcentaje medio de controles de orina negativos fue de 15.83 ± 7.5 .

Escalas

Tanto en la visita de selección como a lo largo del estudio, en ningún sujeto se apreciaron puntuaciones en la Escala para la Valoración de la Abstinencia Alcohólica-Revisada del Addiction Research Foundation Clinical Institute (CIWA-Ar), Escala de Conducta de Riesgo de adquirir el VIH (HRBS), Escala de Depresión de Hamilton de 17-items (HAM-D) y la Escala de valoración de la intensidad de la tendencia suicida de Columbia (C-SSRS), que supusieran la necesidad de retirada del estudio.

Escalas de Impresión Clínica Global(CGI)/Índice de Severidad de la Adicción Lite (ASI-Lite)/Cuestionario de salud SF-36 (SF-36)

No se encontraron diferencias significativas a lo largo del estudio en la escala CGI, tanto en la subescala de valoración de la severidad como en la subescala de mejoría. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas en las puntuaciones de las 7 áreas que valora la escala ASI-Lite.

En cuanto al cuestionario SF-36, se apreciaron incrementos de las puntuaciones en distintas áreas de las 8 que valora a lo largo de las semanas de seguimiento. La Función física entre la semana 0-12 incrementó 0.5 ± 5 sin llegar a ser estadísticamente significativo; pero entre las semanas 0-16 mostró un incremento significativo (3.3 ± 4.3 , $p=0.05$) y entre las semanas 12-16 (2.7 ± 3.6 , $p=0.05$). El área de Salud General, mejoró sus puntuaciones entre la semana 0-12 en 6.3 ± 11.9 sin ser estadísticamente significativo; pero entre las semanas 0-16 incrementó de forma significativa (14.9 ± 14.1 , $p=0.01$) y entre las semanas 12-16 tuvo una tendencia a la significación (8.5 ± 11.9 , $p=0.06$). El área de Vitalidad incrementó sus puntuaciones de forma significativa entre las semanas 0-12 (11.1 ± 12.01 , $p=0.024$) y 0-16 (15.97 ± 11.74 , $p=0.004$) y entre las semanas 12-16 mejoró en 4.9 ± 10.7 pero no de forma significativa. El área Salud Mental mejoró sus puntuaciones entre la semana 0-12 en 8.3 ± 15.6 y las semanas 12-16 en 5 ± 12.3 , pero no de forma significativa; pero entre las semanas 0-16 el incremento fue estadísticamente significativo (13.3 ± 12.9 , $p=0.015$). Las áreas de Rol físico, función social y rol emocional incrementaron sus puntuaciones pero no de forma significativa. Dolor corporal redujo sus

puntuaciones entre las semanas 0-12 y 0-16 y incrementó entre la semana 12-16, pero ninguna fue estadísticamente significativa.

Tabla 1. Diferencias en las puntuaciones para el cuestionario de salud SF-36 (n=9).

ÁREAS	PUNTUACIONES	Valor P
	Media \pm DS	
Función Física		
Semana 0-12	0.5 \pm 5	0.8
Semana 0-16	3.3 \pm 4.3	0.05
Semana 12-16	2.7 \pm 3.6	0.05
Rol Físico		
Semana 0-12	1.3 \pm 17.3	0.8
Semana 0-16	11.1 \pm 33.8	0.3
Semana 12-16	9.7 \pm 23.2	0.2
Dolor Corporal		
Semana 0-12	-12.2 \pm 33	0.3
Semana 0-16	9.8 \pm 33	0.3
Semana 12-16	2.3 \pm 25.6	0.8
Salud General		
Semana 0-12	6.3 \pm 11.9	0.1
Semana 0-16	14.9 \pm 14.1	0.01
Semana 12-16	8.5 \pm 11.9	0.06
Vitalidad		
Semana 0-12	11.1 \pm 12.01	0.024
Semana 0-16	15.97 \pm 11.74	0.004
Semana 12-16	4.9 \pm 10.7	0.2
Función social		
Semana 0-12	2.7 \pm 19.5	0.6
Semana 0-16	6.9 \pm 21.7	0.3
Semana 12-16	4.2 \pm 18.7	0.5

Rol Emocional		
Semana 0-12	0±23	1
Semana 0-16	3.7±33.4	0.7
Semana 12-16	3.7±27.7	0.6
Salud Mental		
Semana 0-12	8.3±15.6	0.1
Semana 0-16	13.3±12.9	0.015
Semana 12-16	5±12.3	0.2

Escala de Severidad de la Dependencia (SDS)/Escala Breve de Craving a Sustancias (BSCS)/ Valoración de la Gravedad Selectiva para Cocaína (CSSA)

Al analizar las puntuaciones de las escalas de gravedad de consumo (SDS, BSCS Y CSSA), observamos que la escala SDS mostró una disminución significativa de la puntuación entre las semanas 0-12 (4 ± 4.33 , $p=0.024$), entre las semanas 0-16 (5.77 ± 3.8 , $p=0.002$) y una tendencia a la significación entre las semanas 12-16 (1.78 ± 2.59 , $p=0.73$). El resto de escalas BSCS y CSSA, disminuyeron sus puntuaciones a lo largo del seguimiento, pero sin ser estadísticamente significativas las diferencias.

Tabla 2. Diferencias en las puntuaciones para las escalas de severidad del consumo (n=9). Escala de Severidad de la Dependencia (SDS), Escala Breve de Craving a Sustancias (BSCS), Valoración de la Gravedad Selectiva para Cocaína (CSSA).

ESCALAS	PUNTUACIONES	Valor P
	Media ± DS	
BSCS		
Semana 0-12	1.89±3.95	0.1
Semana 0-16	2.44±4.36	0.1
Semana 12-16	0.55±2.55	0.5
SDS		
Semana 0-12	4±4.33	0.024
Semana 0-16	5.77±3.8	0.002

Semana 12-16	1.78 \pm 2.59	0.073
CSSA		
Semana 0-12	1 \pm 15.6	0.8
Semana 0-16	1.78 \pm 17.3	0.76
Semana 12-16	0.78 \pm 15.4	0.88

Características de los pacientes según adherencia o no al tratamiento

El tamaño reducido de la muestra, no permitió hacer una comparación entre el grupo de los pacientes que tomaron el tratamiento a lo largo del estudio y los que no; pero observando los datos, el grupo con adherencia correcta al tratamiento, registró menos días de consumo entre las semanas 10-12 en el autoregistro. En el análisis de las concentraciones de cocaína en cabello, en el grupo que tomó correctamente el tratamiento, las cifras eran menores en la semana 16 respecto al grupo con mala adherencia al tratamiento.

Tabla 3. Cifras del Informe de Uso de Sustancias (SUR) y muestra de cabello de los grupos con adherencia/no adherencia al tratamiento

ADHERENCIA A TRATAMIENTO	SI (n=8)	NO (n=1)
SUR (porcentaje medio de días sin consumir entre la semana 10-12)	53.09 \pm 39.33	66.67
Concentración cocaína cabello semana 0(ng/mg)	26.05 \pm 11.43	112
Concentración cocaína cabello semana 16(ng/mg)	15,61 \pm 14,43	57,8

Se observó una disminución de las puntuaciones en las escalas de gravedad del consumo a lo largo de las semanas en el grupo con adherencia al tratamiento y un incremento de las puntuaciones de las escalas de gravedad del consumo en el grupo con mala adherencia a tratamiento.

Tabla 4. Puntuaciones en las escalas de severidad del consumo de los grupos con adherencia/no adherencia al tratamiento. Escala de Severidad de la Dependencia (SDS), Escala Breve de Craving a Sustancias (BSCS), Valoración de la Gravedad Selectiva para Cocaína (CSSA).

	SI (n=8)	NO (n=1)
BSCS semana 0	9.38 \pm 3.54	6
BSCS semana 12	7 \pm 5.01	8
BSCS semana 16	6.5 \pm 3.9	7
SDS semana 0	12 \pm 4.17	13
SDS semana 12	7.88 \pm 5.28	13
SDS semana 16	6.63 \pm 3.9	15
CSSA semana 0	27.12 \pm 18	22
CSSA semana 12	26.63 \pm 26.98	17
CSSA semana 16	23.88 \pm 18.18	32

Seguridad

A lo largo de las semanas de estudio, no se registraron acontecimientos adversos con la toma del extracto de soja, observándose una correcta tolerabilidad y seguridad.

Discusión

De acuerdo con los hallazgos que hemos encontrado en nuestro estudio y considerando que todos los participantes estaban afectados de un Trastorno por Consumo de Cocaína Grave, valoramos que las tasas de adherencia al tratamiento con isoflavonas fueron muy positivas, ya que 7(77.8%) finalizaron el estudio a la semana 16 y 1(11.1%) abandonó en la semana 12. Éstas son cifras elevadas si comparamos con los datos de la literatura que sitúan habitualmente en un 50% o menor las tasas de retención a tratamiento en esta patología (Stotts et al., 2007). También nos aportan datos positivos de buena adherencia al tratamiento con isoflavonas el análisis de las concentraciones en orina de daidzeína, genisteína y equol, que muestran cifras de correcta toma de tratamiento en 8 (88.9%) de los participantes. La buena tolerancia de las

isoflavonas a lo largo de las semanas del estudio, aporta datos que apoyan la retención a tratamiento elevada.

Por otro lado, en referencia a la variable principal de estudio ningún participante estuvo abstinerente completamente según controles de orina entre la semana 10 y 12; pero debe resaltarse que, según el autoregistro, de consumo diario 3(33.3%) habían consumido menos de un 20% de los días comprendidos entre la semana 10 y 12, datos que considerando que se trataba de pacientes afectados de un trastorno grave, podrían ser analizados como indicadores de reducción de la gravedad del consumo.

Un dato relevante que apoya a la posibilidad de que las isoflavonas reduzcan la gravedad del consumo de cocaína, tal y como los estudios en animales han indicado previamente (Yao et al., 2010; Martin et al., 2013), es la reducción de forma significativa de las puntuaciones de la escala SDS a lo largo de las semanas del estudio y la reducción, aunque sin ser significativa de las puntuaciones de las escalas BSCS y CSSA. Por otro lado, son también resultados positivos, el incremento de las puntuaciones en distintas áreas del cuestionario SF-36 de forma significativa (Función física, Salud General, Vitalidad y Salud mental) a lo largo de las semanas de seguimiento y los incrementos en otras áreas aunque no fuera estadísticamente significativos.

Consideramos que nuestro estudio tiene varias limitaciones, la más importante es que se trata de un estudio piloto, abierto, no controlado. Así mismo, la muestra incluyó un número pequeño de participantes debido a las dificultades de reclutamiento que encontramos a lo largo del ensayo, ya fuera por las propias características de los pacientes afectados de un Trastorno por Consumo de Cocaína como son el bajo cumplimiento terapéutico o por la exclusión de patología mental o somática que pudiera interferir en la realización del estudio. Por otro lado, las dosis de isoflavonas que fueron utilizadas, fueron de acuerdo a la referencia de las dosis utilizadas para los síntomas de la menopausia, pero desconocemos si dosis mayores pudieran dar mejores resultados. También tenemos que mencionar el hecho de que sólo una mujer participara en el

estudio y que a pesar de tratarse de un estudio exploratorio, el no comparar con placebo limita el poder valorar efectividad del tratamiento con isoflavonas.

Conclusiones

Nuestros datos preliminares sugieren la posible acción de las isoflavonas reduciendo la gravedad del consumo de cocaína y mejorando la retención a tratamiento, a pesar de que no se observara la adquisición de la abstinencia completa. A partir de estos resultados, se necesitan estudios con mayor tamaño muestral y comparativos con placebo para analizar si las isoflavonas pueden ser efectivas para el abordaje del Trastorno por Consumo de Cocaína.

Bibliografía

- Al-Halabí, S., Sáiz, P. A., Burón, P., Garrido, M., Benabarre, A., Jiménez, E., ... Bobes, J. (2016). Validación de la versión en español de la Columbia-Suicide Severity Rating Scale (Escala Columbia para Evaluar el Riesgo de Suicidio). *Revista de Psiquiatría y Salud Mental*, 9(3), 134–142. <https://doi.org/10.1016/j.rpsm.2016.02.002>
- Alonso, J., Prieto, L., Antó, J. M. (1995). La versión española del SF-36 Health Survey (Cuestionario de Salud SF-36): Un instrumento para la medida de los resultados clínicos. *Medicina Clínica*, 104(20), 771–776.
- Alvarez, Y., Farré, M., Fonseca, F., & Torrens, M. (2010). Anticonvulsant drugs in cocaine dependence: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 38(1), 66–73. <https://doi.org/10.1016/j.jsat.2009.07.001>
- Álvarez, Y., Pérez-Mañá, C., Torrens, M., & Farré, M. (2013). Antipsychotic drugs in cocaine dependence: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 45(1), 1–10. <https://doi.org/10.1016/j.jsat.2012.12.013>
- Araos, P., Vergara-Moragues, E., González-Saiz, F., Pedraz, M., García-Marchena, N., Romero-Sanchiz, P., ... Rodríguez De Fonseca, F. (2017). Differences in the Rates of Drug Polyconsumption and Psychiatric Comorbidity among Patients with Cocaine Use Disorders According to the Mental Health Service. *Journal of Psychoactive Drugs*, 49(4), 306–315. <https://doi.org/10.1080/02791072.2017.1342151>
- Arolfo, M. P., Overstreet, D. H., Yao, L., Fan, P., Lawrence, A. J., Tao, G., ... Diamond, I. (2009). Suppression of heavy drinking and alcohol seeking by a selective ALDH-2 inhibitor. *Alcoholism, Clinical and Experimental*

Research, 33(11), 1935–1944. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01031.x>

- Bobes, J., Bulbena, A., Luque, A., Dal-Ré, R., Ballesteros, J., Ibarra, N., & Grupo de Validacion en Espanol de Escalas Psicometricas. (2003). [A comparative psychometric study of the Spanish versions with 6, 17, and 21 items of the Hamilton Depression Rating Scale]. *Medicina Clínica*, 120(18), 693–700. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12781095>
- Cacciola, J. S., Alterman, A. I., McLellan, A. T., Lin, Y.-T., & Lynch, K. G. (2007). Initial evidence for the reliability and validity of a “Lite” version of the Addiction Severity Index. *Drug and Alcohol Dependence*, 87(2–3), 297–302. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2006.09.002>
- Camí, J., & Farré, M. (2003). Drug Addiction. *New England Journal of Medicine*, 349(10), 975–986. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023160>
- Carroll, K. M., Nich, C., Petry, N. M., Eagan, D. A., Shi, J. M., & Ball, S. A. (2016). A randomized factorial trial of disulfiram and contingency management to enhance cognitive behavioral therapy for cocaine dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 160, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.12.036>
- Castells, X., Casas, M., Pérez-Mañá, C., Roncero, C., Vidal, X., & Capellà, D. (2010). Efficacy of Psychostimulant Drugs for Cocaine Dependence. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007380.pub3>
- Castells, X., Cunill, R., Pérez-Mañá, C., Vidal, X., & Capellà, D. (2016). Psychostimulant drugs for cocaine dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007380.pub4>
- Darke, S., Hall, W., Heather, N., Ward, J., & Wodak, A. (1991). The reliability and validity of a scale to measure HIV risk-taking behaviour among intravenous drug users. *AIDS (London, England)*, 5(2), 181–185. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2031690>
- DeVito, E. E., Babuscio, T. A., Nich, C., Ball, S. A., & Carroll, K. M. (2014). Gender differences in clinical outcomes for cocaine dependence: randomized clinical trials of behavioral therapy and disulfiram. *Drug and Alcohol Dependence*, 145, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.10.007>
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2019). *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2019), European Drug Report 2019: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg*. <https://doi.org/10.2810/191370>

- Farré, M., Farré, A., Pérez de Heredia, J. L., & Torrens, M. (2017). Antipsychotic Drugs in Cocaine Use Disorder. In *The Neuroscience of Cocaine* (pp. 639–644). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803750-8.00064-6>
- Farré, M., de la Torre, R., González, M. L., Terán, M. T., Roset, P. N., Menoyo, E., & Camí, J. (1997). Cocaine and alcohol interactions in humans: neuroendocrine effects and cocaethylene metabolism. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 283(1), 164–176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336321>
- Farré, M., de la Torre, R., Llorente, M., Lamas, X., Ugena, B., Segura, J., & Camí, J. (1993). Alcohol and cocaine interactions in humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 266(3), 1364–1373. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8371143>
- Fowler, J. S., Volkow, N. D., Wang, G.-J., Gatley, S. J., & Logan, J. (2001). [11]Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. *Nuclear Medicine and Biology*, 28(5), 561–572. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(01\)00211-6](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(01)00211-6)
- Gaval-Cruz, M., & Weinshenker, D. (2009). Mechanisms of Disulfiram-induced Cocaine Abstinence: Antabuse and Cocaine Relapse. *Molecular Interventions*, 9(4), 175–187. <https://doi.org/10.1124/mi.9.4.6>
- González-Saiz, F., de Las Cuevas, C., Barrio, G., & Domingo-Salvany, A. (2008). [Spanish version of the Severity of Dependence Scale (SDS)]. *Medicina Clinica*, 131(20), 797–798. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19094885>
- Guy, W. (1976). *ECDEU Assessment Manual for Psychopharmacology*. Rockville, MD, U.S. Department of Health, Education, and Welfare.
- Hirsiger, S., Hänggi, J., Germann, J., Vonmoos, M., Preller, K. H., Engeli, E. J. E., ... Quednow, B. B. (2019). Longitudinal changes in cocaine intake and cognition are linked to cortical thickness adaptations in cocaine users. *NeuroImage. Clinical*, (December 2018), 101652. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.101652>
- Indave, B. I., Minozzi, S., Pani, P. P., & Amato, L. (2016). Antipsychotic medications for cocaine dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006306.pub3>
- Kampman, K. M., Volpicelli, J. R., McGinnis, D. E., Alterman, A. I., Weinrieb, R. M., D'Angelo, L., & Epperson, L. E. (1998). Reliability and validity of the Cocaine Selective Severity Assessment. *Addictive Behaviors*, 23(4), 449–461. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9698974>

- Kohut, S. J., & Bergman, J. (2017). Medication Strategies for the Management of Cocaine Use Disorder. In *The Neuroscience of Cocaine* (pp. 627–637). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803750-8.00063-4>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., ... Vasiliou, V. (2012). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 520–539. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005538>
- Lowe, E. D., Gao, G.-Y., Johnson, L. N., & Keung, W. M. (2008). Structure of Daidzin, a Naturally Occurring Anti-Alcohol-Addiction Agent, in Complex with Human Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase δ . *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(15), 4482–4487. <https://doi.org/10.1021/jm800488j>
- Lu, L., Liu, Y., Zhu, W., Shi, J., Liu, Y., Ling, W., & Kosten, T. R. (2009). Traditional Medicine in the Treatment of Drug Addiction. *The American Journal of Drug and Alcohol Abuse*, 35(1), 1–11. <https://doi.org/10.1080/00952990802455469>
- Lukas, S. E., Penetar, D., Su, Z., Geaghan, T., Maywalt, M., Tracy, M., ... Lee, D. Y.-W. (2013). A standardized kudzu extract (NPI-031) reduces alcohol consumption in nontreatment-seeking male heavy drinkers. *Psychopharmacology*, 226(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2884-9>
- Martin, M., Cabrera, R., Maldonado, R., Torrens, M., de la Torre, R., and F., & M. (2013). “Isoflavone administration reduces cocaine self-administration responses and cue-induced cocaine seeking behavior and relapse in mice” in Proceedings of the Dopamine 2013. *Program and Book of Abstracts, Alghero*.
- Martínez-Riera, R., Pérez-Mañá, C., Papaseit, E., Fonseca, F., de la Torre, R., Pizarro, N., ... Farré, M. (2019). Soy Isoflavone Extract Does Not Increase the Intoxicating Effects of Acute Alcohol Ingestion in Human Volunteers. *Frontiers in Pharmacology*, 10. <https://doi.org/10.3389/fphar.2019.00131>
- Minozzi, S., Cinquini, M., Amato, L., Davoli, M., Farrell, M. F., Pani, P. P., & Vecchi, S. (2015). Anticonvulsants for cocaine dependence. In S. Minozzi (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews* (pp. 3–6). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006754.pub4>
- O’Brien C. Drug Use Disorders and Addiction. In: Brunton, LL, Hilal-Dandan, R, Knollman, BC., editors. (2018). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (13th ed.). New York: McGraw-Hill Education.

- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (EDADES). (2017). *Encuesta sobre alcohol y otras drogas en España*. Retrieved from http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistemaInformacion/encuestas_EDADES.htm
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). (2017). *Estadísticas 2017 del Observatorio Español de la Drogas y Adicciones (OEDA)*.
- Overstreet, D. H., Keung, W.-M., Rezvani, A. H., Massi, M., & Lee, D. Y. W. (2003). Herbal remedies for alcoholism: promises and possible pitfalls. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 27(2), 177–185. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000051022.26489.CF>
- Pani, P. P., Trogu, E., Vacca, R., Amato, L., Vecchi, S., & Davoli, M. (2010). Disulfiram for the treatment of cocaine dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007024.pub2>
- Pani, P. P., Trogu, E., Vecchi, S., & Amato, L. (2011). Antidepressants for cocaine dependence and problematic cocaine use. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD002950.pub3>
- Penetar, D. M., Maclean, R. R., McNeil, J. F., & Lukas, S. E. (2011). Kudzu extract treatment does not increase the intoxicating effects of acute alcohol in human volunteers. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 35(4), 726–734. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01390.x>
- Penetar, D. M., Toto, L. H., Lee, D. Y.-W., & Lukas, S. E. (2015). A single dose of kudzu extract reduces alcohol consumption in a binge drinking paradigm. *Drug and Alcohol Dependence*, 153, 194–200. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.05.025>
- Pérez de los Cobos, J., Trujols, J., Siñol, N., Vasconcelos e Rego, L., Iraurgi, I., & Batlle, F. (2014). Psychometric properties of the Spanish version of the Cocaine Selective Severity Assessment to evaluate cocaine withdrawal in treatment-seeking individuals. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 47(3), 189–196. <https://doi.org/10.1016/j.jsat.2014.05.004>
- Pérez-Mañá, C., Castells, X., Vidal, X., Casas, M., & Capellà, D. (2011). Efficacy of indirect dopamine agonists for psychostimulant dependence: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 40(2), 109–122. <https://doi.org/10.1016/j.jsat.2010.08.012>
- Sarnyai, Z., Shaham, Y., & Heinrichs, S. C. (2001). The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. *Pharmacological Reviews*, 53(2), 209–243. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=11356984>

- Schroeder, J. P., Cooper, D. A., Schank, J. R., Lyle, M. A., Gaval-Cruz, M., Ogbonmwan, Y. E., ... Weinshenker, D. (2010). Disulfiram Attenuates Drug-Primed Reinstatement of Cocaine Seeking via Inhibition of Dopamine β -Hydroxylase. *Neuropsychopharmacology*, 35(12), 2440–2449. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.127>
- Smith, L. J., Kalhan, R., Wise, R. A., Sugar, E. A., Lima, J. J., Irvin, C. G., ... Holbrook, J. T. (2015). Effect of a Soy Isoflavone Supplement on Lung Function and Clinical Outcomes in Patients With Poorly Controlled Asthma. *JAMA*, 313(20), 2033. <https://doi.org/10.1001/jama.2015.5024>
- Sobell, L.C., Sobell, M. B. (1995). *Alcohol Timeline Followback Users' Manual*. Addiction research Foundation. Toronto.
- Somoza, E., Dyrenforth, S., Goldsmith, J., Mezinskis, J., & Cohen, M. (1995). In search of a universal drug craving. *Annual Meeting of the American Psychiatric Association*.
- Stotts, A. L., Mooney, M. E., Sayre, S. L., Novy, M., Schmitz, J. M., & Grabowski, J. (2007). Illusory predictors: Generalizability of findings in cocaine treatment retention research. *Addictive Behaviors*, 32(12), 2819–2836. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2007.04.020>
- Sullivan, J. T., Sykora, K., Schneiderman, J., Naranjo, C. A., & Sellers, E. M. (1989). Assessment of alcohol withdrawal: the revised clinical institute withdrawal assessment for alcohol scale (CIWA-Ar). *British Journal of Addiction*, 84(11), 1353–1357. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2597811>
- Torrens, M., Fonseca, F., Mateu, G., & Farré, M. (2005). Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression. *Drug and Alcohol Dependence*, 78(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2004.09.004>
- Torrens, M., Martínez-Sanvisens, D., Martínez-Riera, R., Bulbena, A., Szerman, N., & Ruiz, P. (2011). Dual diagnosis: Focusing on depression and recommendations for treatment. *Addictive Disorders and Their Treatment*, 10(2), 50–59. <https://doi.org/10.1097/ADT.0b013e318215f322>
- Torrens, M., Serrano, D., Astals, M., Pérez-Domínguez, G., & Martín-Santos, R. (2004). Diagnosing Comorbid Psychiatric Disorders in Substance Abusers: Validity of the Spanish Versions of the Psychiatric Research Interview for Substance and Mental Disorders and the Structured Clinical Interview for DSM-IV. *American Journal of Psychiatry*, 161(7), 1231–1237. <https://doi.org/10.1176/appi.ajp.161.7.1231>
- UNODC, U. N. O. on D. and C. (2019). *World Drug Report 2019*. 4(June). Retrieved from <https://wdr.unodc.org/wdr2019/index.html>

- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., Tomasi, D., & Telang, F. (2011). Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, *108*(37), 15037–15042. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010654108>
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G., Telang, F., Logan, J., Jayne, M., ... Swanson, J. M. (2010). Cognitive control of drug craving inhibits brain reward regions in cocaine abusers. *NeuroImage*, *49*(3), 2536–2543. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.088>
- Weinshenker, D. (2010). Cocaine sobers up. *Nature Medicine*, *16*(9), 969–970. <https://doi.org/10.1038/nm0910-969>
- Yao, L., Fan, P., Arolfo, M., Jiang, Z., Olive, M. F., Zablocki, J., ... Diamond, I. (2010). Inhibition of aldehyde dehydrogenase-2 suppresses cocaine seeking by generating THP, a cocaine use-dependent inhibitor of dopamine synthesis. *Nature Medicine*, *16*(9), 1024–1028. <https://doi.org/10.1038/nm.2200>

6. DISCUSIÓN GENERAL

A pesar del hecho que la cocaína es la tercera droga de consumo ilegal más consumida en el mundo, después del cannabis y las anfetaminas, en la actualidad no disponemos de fármacos específicos que hayan mostrado eficacia para el tratamiento del Trastorno por Consumo de Cocaína. La cocaína a nivel molecular inhibe a los transportadores de monoaminas de la membrana neuronal presináptica (especialmente la dopamina-DAT) y la investigación de posibles fármacos eficaces se dirige hacia este mecanismo de acción. Hasta la actualidad, disulfiram es el fármaco con resultados mejores, pero su mecanismo de acción como inhibidor irreversible de la aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1), limita totalmente su uso en pacientes con consumo activo de alcohol y los datos epidemiológicos reflejan cifras de más del 60% de uso concomitante de alcohol y cocaína. Algunas isoflavonas, sobretodo la daidzina-daidzeína, presentan un mecanismo de acción que se caracteriza por ser inhibidores selectivos de la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2), y como consecuencia bloquean el metabolismo de la dopamina que conlleva la disminución de su biosíntesis y liberación. No se ha descrito acción de las isoflavonas en la ALDH1, por lo que hace presuponer que no actúan sobre el metabolismo del acetaldehído y así no estarían contraindicadas si hay consumo activo de alcohol.

Esta tesis doctoral tiene como objetivo evaluar la posible eficacia de un inhibidor natural selectivo de la aldehído deshidrogenasa de tipo 2-ALDH2 (daidzina-daidzeína, contenida en el extracto de soja) en el tratamiento del Trastorno por Consumo de Cocaína y conocer si interfiere en el metabolismo del acetaldehído. Dentro del trabajo de tesis doctoral, se llevaron a cabo 3 estudios y dos de ellos ya han sido publicados.

El primer estudio tenía como objetivo específico, la selección del mejor preparado de isoflavonas para su uso posterior: comparando Super-Absorbable Soy Isoflavones® (LifeExtension,USA) o Fitoladius® (Merck, España). Se llevó a cabo un estudio randomizado, cruzado, con un período de lavado de 3 días (2 sesiones experimentales) y abierto con 12 voluntarios sanos, analizando las concentraciones plasmáticas de daidzeína y genisteína. Los resultados

obtenidos, demostraron que entre los dos preparados de extracto de soja estudiados, existían diferencias significativas en cuanto a la farmacocinética. A pesar que los dos preparados estaban comercializados, la composición de dosis de isoflavonas era diferente al ser analizada, motivo por el que se normalizaron los resultados en función de la dosis administrada analizada. Finalmente, se eligió el preparado Super-Absorbable Soy Isoflavones® (LifeExtension,USA) para la realización de los dos siguientes estudios y el motivo fue que este preparado se presenta en forma de cápsulas duras y en cambio Fitoladius son cápsulas blandas. El hecho que el elegido fuera de cápsulas duras (las cápsulas habituales), fue por una cuestión presupuestaria, ya que permitía realizar el reenvasado y en cambio las cápsulas blandas sólo lo podía realizar el fabricante. La medicación fue reenvasada para el tercer estudio.

El segundo estudio fue una evaluación de la seguridad de la combinación de dosis elevadas de isoflavonas y alcohol, debido a que muchos de los pacientes con trastorno por consumo de cocaína consumen habitualmente alcohol. Por motivos de seguridad, se decidió realizar un estudio controlado para conocer las posibles interacciones. Se llevó a cabo de forma como un ensayo clínico randomizado, cruzado y simple ciego, con 2 sesiones experimentales (etanol o daidzina+etanol a las 2 horas) incluyendo 10 voluntarios sanos. No se encontraron diferencias significativas en la concentración de etanol en sangre entre las condiciones alcohol y extracto de soja+alcohol. Los resultados globales, no mostraron diferencias en cuanto a los efectos subjetivos del alcohol y tampoco fueron encontradas diferencias significativas en las constantes vitales entre los dos grupos. Si se observó una ligera reducción significativa mayor de la presión arterial diastólica en las 2,3,4 y 8 horas, ligero incremento de la temperatura facial y cefalea, después de la administración en el grupo alcohol en comparación con el grupo extracto de soja+alcohol. Los datos obtenidos, nos indicaron que a la dosis administrada de 80 mg de daidzina-daidzeína, no hay signos clínicos de interacción de las isoflavonas con alcohol de tipo disulfiram y por ello pueden administrarse con seguridad en pacientes que consuman alcohol. Estos resultados concuerdan con estudios

previos que no relacionaban a las isoflavonas con el metabolismo del acetilaldehído (Penetar et al., 2011). Las mínimas diferencias que se encontraron en el grupo alcohol, consideramos son atribuibles al efecto placebo, pero al no incluir una sesión experimental en el que se administraran cápsulas de placebo, no podemos concluir firmemente.

Una vez realizado el estudio de seguridad, se inició el ensayo clínico piloto para evaluar la eficacia del extracto de isoflavonas en el consumo de cocaína en pacientes adictos. Se trató de un estudio no controlado, unicéntrico con 12 semanas de tratamiento con 80mg diarios de daidzina-daidzeína y 4 posteriores de seguimiento en 9 pacientes afectados de un Trastorno por Consumo de Cocaína. A pesar de no obtener resultados positivos en cuanto a la abstinencia de cocaína en las últimas 3 semanas de tratamiento, observamos datos que nos mostraban una posible función de los inhibidores de la ALDH2 reduciendo la gravedad del consumo de cocaína. Un aspecto de mejora de la gravedad, fue la alta retención a tratamiento en comparación con las tasas habituales de retención en los consumidores de cocaína, que oscila en un 50% aproximadamente (Stotts et al., 2007). Otro aspecto de mejora de gravedad fue la disminución de las puntuaciones en la escala Severity Dependence Scale (SDS) y una mejora de las puntuaciones en la escala de Salud SF-36. El tamaño reducido de la muestra y la no existencia de un grupo comparativo con placebo, no nos permite obtener mayores conclusiones en cuanto a su eficacia; pero los datos si nos indican la posibilidad de que el mecanismo descrito en anteriores estudios de las isoflavonas como inhibidores de la aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2) (Gao et al., 2001; Lowe et al., 2008; Koppaka et al., 2012), pueda ser estudiado como una posible vía de acción para el Trastorno por Consumo de Cocaína.

LIMITACIONES

La metodología llevada a cabo en los 3 estudios que componen esta tesis doctoral, tiene sus limitaciones. En primer lugar el tipo de preparado utilizado, conteniendo isoflavonas en proporciones naturales de forma que aunque la sustancia de interés fue daidzina-daidzeína, contenía cantidades apreciables

de genisteína, que es activa como estrógeno. La viabilidad del proyecto precisaba del uso de preparados naturales y comercializados. En el primer estudio para la elección de un preparado de soja, el hecho de que la composición real de cada uno de ellos no fuera exactamente la descrita por el fabricante, precisó de la corrección de los resultados según las dosis reales que fueron administradas. En el segundo estudio para la valoración de la seguridad de las isoflavonas con el uso concomitante de alcohol, no hubo sesión experimental con placebo, el tamaño muestral fue reducido, la dosis de isoflavonas podría ser baja y no se incluyeron pacientes con un Trastorno por Consumo de Sustancias. Finalmente, en el estudio piloto para valorar la posible eficacia de las isoflavonas en el Trastorno por Consumo de Cocaína, la mayor limitación fue el tamaño muestral, debido a las importantes dificultades de reclutamiento que se encontraron a lo largo del ensayo por el perfil de paciente que se requería y la no existencia de grupo control, lo cual limita las conclusiones en cuanto a la posible eficacia.

IMPLICACIONES EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

Como ya se ha comentado anteriormente, el impacto a nivel de salud que tiene el consumo de cocaína y la demanda creciente de solicitudes de tratamiento, hace necesaria la investigación de estrategias terapéuticas efectivas para el abordaje del Trastorno por Consumo de cocaína, que se alejen de la práctica clínica actual basada en el tratamiento solamente de síntomas. Como se ha podido observar en esta investigación, existen dificultades relacionadas con la propia idiosincrasia del trastorno (comorbilidades somáticas y psiquiátricas y número elevado de abandonos de tratamiento), que dificultan la realización de estudios de eficacia para los distintos fármacos.

Consideramos que este estudio aporta resultados de seguridad de administración y indicios de un posible uso terapéutico de las isoflavonas en un futuro, tras un mayor número investigaciones, para el Trastorno por Consumo de cocaína. Pero a la vez, también indica la posibilidad de estudio de la vía de la ALDH2 y consecuentemente la síntesis de fármacos que actúen como inhibidores de ésta.

IMPLICACIONES EN FUTURAS INVESTIGACIONES

Como ya se ha comentado, esta investigación se considera relevante para poder abrir nuevas vías de investigación acerca de los inhibidores selectivos de la ALDH2 como tratamiento en el Trastorno por Consumo de Cocaína.

7. CONCLUSIONES

1- La administración de dos preparados de extractos de isoflavonas de soja se acompañó de concentraciones elevadas de daidzeína y de genisteína en plasma, con un pico plasmático a las 6 horas tras su administración. Se observó un doble pico plasmático, inicial y a las 6 horas, que sugiere un fenómeno de circulación enterohepática.

2- Existen diferencias en las concentraciones de daidzeína y genisteína, entre los dos preparados de extractos de isoflavonas de soja utilizados en este trabajo. Para comparar ambos preparados fue necesario ajustar las concentraciones a las dosis administradas de cada uno de ellos.

3- Las concentraciones ajustadas de daidzeína fueron superiores con el preparado de cápsula blanda, mientras que fueron similares las de genisteína entre ambos preparados. Se escogió para los estudios siguientes el preparado de cápsula blanda por su mayor posibilidad de reencapsulación.

4- La administración de un preparado de extracto de isoflavonas de soja antes de una administración aguda de alcohol (0,5 g/kg de peso) no produjo cambios en los parámetros farmacocinéticos del alcohol.

5. La administración de isoflavonas de soja no produjo ningún cambio relevante en los efectos agudos del alcohol a nivel cardiovascular ni subjetivos. No se apreciaron signos ni síntomas adversos de tipo disulfiram que reflejen una interacción de las isoflavonas con alcohol a través de la inhibición de la enzima aldehído deshidrogenasa 1 (ALDH1).

6- Las isoflavonas de soja pueden administrarse con seguridad en pacientes que consuman alcohol a la dosis administrada.

7- Los resultados del estudio piloto exploratorio en el tratamiento del trastorno por consumo de cocaína muestran una posible actividad de los componentes de las isoflavonas con una reducción de la gravedad del consumo de cocaína y una elevada retención de los pacientes en el programa

8- La vía de acción propuesta para las isoflavonas de soja, una inhibición de la enzima aldehído deshidrogenasa 2 (ALDH2) por la daidzeína, abre nuevas vías de investigación en el Trastorno por Consumo de Cocaína.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez, Y., Farré, M., Fonseca, F., & Torrens, M. (2010). Anticonvulsant drugs in cocaine dependence: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 38(1), 66–73.
<https://doi.org/10.1016/j.jsat.2009.07.001>
- Álvarez, Y., Pérez-Mañá, C., Torrens, M., & Farré, M. (2013). Antipsychotic drugs in cocaine dependence: A systematic review and meta-analysis. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 45(1), 1–10.
<https://doi.org/10.1016/j.jsat.2012.12.013>
- Anupongsanugool, E., Teekachunhatean, S., Rojanasthien, N., Pongsatha, S., & Sangdee, C. (2005). Pharmacokinetics of isoflavones, daidzein and genistein, after ingestion of soy beverage compared with soy extract capsules in postmenopausal Thai women. *BMC Clinical Pharmacology*, 5(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1472-6904-5-2>
- Araos, P., Vergara-Moragues, E., González-Saiz, F., Pedraz, M., García-Marchena, N., Romero-Sanchiz, P., ... Rodríguez De Fonseca, F. (2017). Differences in the Rates of Drug Polyconsumption and Psychiatric Comorbidity among Patients with Cocaine Use Disorders According to the Mental Health Service. *Journal of Psychoactive Drugs*, 49(4), 306–315.
<https://doi.org/10.1080/02791072.2017.1342151>
- Arolfo, M. P., Overstreet, D. H., Yao, L., Fan, P., Lawrence, A. J., Tao, G., ... Diamond, I. (2009). Suppression of heavy drinking and alcohol seeking by a selective ALDH-2 inhibitor. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 33(11), 1935–1944. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2009.01031.x>
- Baler, R. D., & Volkow, N. D. (2006). Drug addiction: the neurobiology of disrupted self-control. *Trends in Molecular Medicine*, 12(12), 559–566.
<https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.10.005>
- Benjamin James Sadock (MD), Virginia Alcott Sadock (MD), P. R. (2015). *Sinopsis de Psiquiatría* (11th ed.; W. Kluwer, ed.). Lippincott Williams and Wilkins. Wolters Kluwer Health.
- Bhagwat, S., & Haytowitz, D. B. (2015). *U.S. Department of Agriculture, Agricultural Research Service. 2015. USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods, Release 2.1.*
<https://doi.org/10.15482/USDA.ADC/1324538>
- Bracken, B. K., Penetar, D. M., Maclean, R. R., & Lukas, S. E. (2011). Kudzu Root Extract Does Not Perturb the Sleep/Wake Cycle of Moderate Drinkers. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 17(10), 961–966. <https://doi.org/10.1089/acm.2010.0540>

- Camí, J., & Farré, M. (2003). Drug Addiction. *New England Journal of Medicine*, 349(10), 975–986. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023160>
- Carroll, K. M., Nich, C., Petry, N. M., Eagan, D. A., Shi, J. M., & Ball, S. A. (2016). A randomized factorial trial of disulfiram and contingency management to enhance cognitive behavioral therapy for cocaine dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 160, 135–142. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.12.036>
- Castells, X., Casas, M., Pérez-Mañá, C., Roncero, C., Vidal, X., & Capellà, D. (2010). Efficacy of Psychostimulant Drugs for Cocaine Dependence. In *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (2). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007380.pub3>
- Castells, X., Cunill, R., Pérez-Mañá, C., Vidal, X., & Capellà, D. (2016). Psychostimulant drugs for cocaine dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (9). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD007380.pub4>
- DeVito, E. E., Babuscio, T. A., Nich, C., Ball, S. A., & Carroll, K. M. (2014). Gender differences in clinical outcomes for cocaine dependence: randomized clinical trials of behavioral therapy and disulfiram. *Drug and Alcohol Dependence*, 145, 156–167. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2014.10.007>
- el-Guebaly, N., Carrà, G., & Galanter, M. (Eds.). (2015). *Textbook of Addiction Treatment: International Perspectives*. <https://doi.org/10.1007/978-88-470-5322-9>
- European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (EMCDDA). (2019). *European Monitoring Centre for Drugs and Drug Addiction (2019), European Drug Report 2019: Trends and Developments, Publications Office of the European Union, Luxembourg*. <https://doi.org/10.2810/191370>
- Evans, S. M., Foltin, R. W., Hicks, M. J., Rosenberg, J. B., De, B. P., Janda, K. D., ... Crystal, R. G. (2016). Efficacy of an adenovirus-based anti-cocaine vaccine to reduce cocaine self-administration and reacquisition using a choice procedure in rhesus macaques. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 150–151(5), 76–86. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2016.09.008>
- Farré, M., Farré, A., Pérez de Heredia, J. L., & Torrens, M. (2017). Antipsychotic Drugs in Cocaine Use Disorder. In *The Neuroscience of Cocaine* (pp. 639–644). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803750-8.00064-6>
- Farré, M., de la Torre, R., González, M. L., Terán, M. T., Roset, P. N., Menoyo, E., & Camí, J. (1997). Cocaine and alcohol interactions in humans: neuroendocrine effects and cocaethylene metabolism. *The Journal of*

Pharmacology and Experimental Therapeutics, 283(1), 164–176. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9336321>

- Farré, M., de la Torre, R., Llorente, M., Lamas, X., Ugena, B., Segura, J., & Camí, J. (1993). Alcohol and cocaine interactions in humans. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 266(3), 1364–1373. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8371143>
- Fowler, J. S., Volkow, N. D., Wang, G.-J., Gatley, S. J., & Logan, J. (2001). [11]Cocaine: PET studies of cocaine pharmacokinetics, dopamine transporter availability and dopamine transporter occupancy. *Nuclear Medicine and Biology*, 28(5), 561–572. [https://doi.org/10.1016/S0969-8051\(01\)00211-6](https://doi.org/10.1016/S0969-8051(01)00211-6)
- Gao, G. Y., Li, D. J., & Keung, W. M. (2003). Synthesis of daidzin analogues as potential agents for alcohol abuse. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 11(18), 4069–4081. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(03\)00397-3](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(03)00397-3)
- Gao, G.-Y., Li, D.-J., & Keung, W. M. (2001). Synthesis of Potential Antidipsotropic Isoflavones: Inhibitors of the Mitochondrial Monoamine Oxidase–Aldehyde Dehydrogenase Pathway. *Journal of Medicinal Chemistry*, 44(20), 3320–3328. <https://doi.org/10.1021/jm0101390>
- Gaval-Cruz, M., & Weinshenker, D. (2009). Mechanisms of Disulfiram-induced Cocaine Abstinence: Antabuse and Cocaine Relapse. *Molecular Interventions*, 9(4), 175–187. <https://doi.org/10.1124/mi.9.4.6>
- Gawin, F. H., & Kleber, H. D. (1986). Abstinence symptomatology and psychiatric diagnosis in cocaine abusers. Clinical observations. *Archives of General Psychiatry*, 43(2), 107–113. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3947206>
- Heil, S. H., Badger, G. J., & Higgins, S. T. (2001). Alcohol dependence among cocaine-dependent outpatients: demographics, drug use, treatment outcome and other characteristics. *Journal of Studies on Alcohol*, 62(1), 14–22. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11271960>
- Hirsiger, S., Hänggi, J., Germann, J., Vonmoos, M., Preller, K. H., Engeli, E. J. E., ... Quednow, B. B. (2019). Longitudinal changes in cocaine intake and cognition are linked to cortical thickness adaptations in cocaine users. *NeuroImage. Clinical*, (December 2018), 101652. <https://doi.org/10.1016/j.nicl.2019.101652>
- Indave, B. I., Minozzi, S., Pani, P. P., & Amato, L. (2016). Antipsychotic medications for cocaine dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (3). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006306.pub3>
- Kampman, K. M., Pettinati, H., Lynch, K. G., Dackis, C., Sparkman, T., Weigley, C., & O'Brien, C. P. (2004). A pilot trial of topiramate for the treatment of

- cocaine dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 75(3), 233–240. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2004.03.008>
- Kampman, K. M., Pettinati, H. M., Lynch, K. G., Spratt, K., Wierzbicki, M. R., & O'Brien, C. P. (2013). A double-blind, placebo-controlled trial of topiramate for the treatment of comorbid cocaine and alcohol dependence. *Drug and Alcohol Dependence*, 133(1), 94–99. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2013.05.026>
- Keung, W. M. (2003). Anti-dipsotropic isoflavones: The potential therapeutic agents for alcohol dependence. *Medicinal Research Reviews*, 23(6), 669–696. <https://doi.org/10.1002/med.10049>
- Kohut, S. J., & Bergman, J. (2017). Medication Strategies for the Management of Cocaine Use Disorder. In *The Neuroscience of Cocaine* (pp. 627–637). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803750-8.00063-4>
- Koob, G. F., & Volkow, N. D. (2010). Neurocircuitry of Addiction. *Neuropsychopharmacology*, 35(1), 217–238. <https://doi.org/10.1038/npp.2009.110>
- Koppaka, V., Thompson, D. C., Chen, Y., Ellermann, M., Nicolaou, K. C., Juvonen, R. O., ... Vasiliou, V. (2012). Aldehyde Dehydrogenase Inhibitors: a Comprehensive Review of the Pharmacology, Mechanism of Action, Substrate Specificity, and Clinical Application. *Pharmacological Reviews*, 64(3), 520–539. <https://doi.org/10.1124/pr.111.005538>
- Kosten, T., Domingo, C., Orson, F., & Kinsey, B. (2014). Vaccines against stimulants: cocaine and MA. *British Journal of Clinical Pharmacology*, 77(2), 368–374. <https://doi.org/10.1111/bcp.12115>
- Liu, Y., Williamson, V., Setlow, B., Cottler, L. B., & Knackstedt, L. A. (2018). The importance of considering polysubstance use: lessons from cocaine research. *Drug and Alcohol Dependence*, 192, 16–28. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2018.07.025>
- Lowe, E. D., Gao, G.-Y., Johnson, L. N., & Keung, W. M. (2008). Structure of Daidzin, a Naturally Occurring Anti-Alcohol-Addiction Agent, in Complex with Human Mitochondrial Aldehyde Dehydrogenase §. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51(15), 4482–4487. <https://doi.org/10.1021/jm800488j>
- Lukas, S. E., Penetar, D., Berko, J., Vicens, L., Palmer, C., Mallya, G., ... Lee, D. Y.-W. (2005). An extract of the Chinese herbal root kudzu reduces alcohol drinking by heavy drinkers in a naturalistic setting. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 29(5), 756–762. <https://doi.org/10.1097/01.ALC.0000163499.64347.92>
- Lukas, S. E., Penetar, D., Su, Z., Geaghan, T., Maywalt, M., Tracy, M., ... Lee, D. Y.-W. (2013). A standardized kudzu extract (NPI-031) reduces alcohol

consumption in nontreatment-seeking male heavy drinkers. *Psychopharmacology*, 226(1), 65–73. <https://doi.org/10.1007/s00213-012-2884-9>

- Martin, M., Cabrera, R., Maldonado, R., Torrens, M., de la Torre, R., and F., & M. (2013). "Isoflavone administration reduces cocaine self-administration responses and cue-induced cocaine seeking behavior and relapse in mice" in Proceedings of the Dopamine 2013. *Program and Book of Abstracts, Alghero*.
- Messina, M. (2014). Soy foods, isoflavones, and the health of postmenopausal women. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 100(suppl_1), 423S-430S. <https://doi.org/10.3945/ajcn.113.071464>
- Michelfelder, A. J. (2009). Soy: a complete source of protein. *American Family Physician*, 79(1), 43–47.
- Minozzi, S., Cinquini, M., Amato, L., Davoli, M., Farrell, M. F., Pani, P. P., & Vecchi, S. (2015). Anticonvulsants for cocaine dependence. In S. Minozzi (Ed.), *Cochrane Database of Systematic Reviews* (pp. 3–6). <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006754.pub4>
- O'Brien C. Drug Use Disorders and Addiction. In: Brunton, LL. Hilal-Dandan, R, Knollman, BC., editors. (2018). *Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics* (13th ed.). New York: McGraw-Hill Education.
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (EDADES). (2017). *Encuesta sobre alcohol y otras drogas en españa*. Retrieved from http://www.pnsd.msssi.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistematnformacion/encuestas_EDADES.htm
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). (2017). *Estadísticas 2017 del Observatorio Español de la Drogas y Adicciones (OEDA)*.
- Observatorio Español de las Drogas y las Adicciones (OEDA). (2018). *Encuesta Sobre Uso de Drogas en Enseñanzas Secundarias en España (ESTUDES)*. Retrieved from http://www.pnsd.mscbs.gob.es/profesionales/sistemasInformacion/sistematnformacion/pdf/ESTUDES_2018_Informe.pdf
- Overstreet, D. H., Kralic, J. E., Morrow, A. L., Ma, Z. Z., Zhang, Y. W., & Lee, D. Y. W. (2003). NPI-031G (puerarin) reduces anxiogenic effects of alcohol withdrawal or benzodiazepine inverse or 5-HT_{2C} agonists. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 75(3), 619–625. [https://doi.org/10.1016/S0091-3057\(03\)00114-X](https://doi.org/10.1016/S0091-3057(03)00114-X)
- Overstreet, D. H., Lee, Y.-W., Rezvani, A. H., Pei, Y.-H., Criswell, H. E., & Janowsky, D. S. (1996). Suppression of Alcohol Intake after Administration

- of the Chinese Herbal Medicine, NPI-028, and Its Derivatives. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 20(2), 221–227.
<https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.1996.tb01633.x>
- Pani, P. P., Trogu, E., Vacca, R., Amato, L., Vecchi, S., & Davoli, M. (2010). Disulfiram for the treatment of cocaine dependence. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (1).
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD007024.pub2>
- Pani, P. P., Trogu, E., Vecchi, S., & Amato, L. (2011). Antidepressants for cocaine dependence and problematic cocaine use. *Cochrane Database of Systematic Reviews*, (12).
<https://doi.org/10.1002/14651858.CD002950.pub3>
- Pastor Aldeguer, V., Perote Alejandro, A., Sanz Pérez, B., Herrera Castellón, E., Yuste Grijalba, F. J., Haya Palazuelos, J., Jiménez Fernández, R. (2006). *La salud y la soja*. Retrieved from http://www.infoalimenta.com/uploads/_publicaciones/id89/89_LibroSoja.pdf
- Penetar, D. M., Maclean, R. R., McNeil, J. F., & Lukas, S. E. (2011). Kudzu extract treatment does not increase the intoxicating effects of acute alcohol in human volunteers. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, 35(4), 726–734. <https://doi.org/10.1111/j.1530-0277.2010.01390.x>
- Penetar, D. M., Toto, L. H., Farmer, S. L., Lee, D. Y.-W., Ma, Z., Liu, Y., & Lukas, S. E. (2012). The isoflavone puerarin reduces alcohol intake in heavy drinkers: A pilot study. *Drug and Alcohol Dependence*, 126(1–2), 251–256. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2012.04.012>
- Penetar, D. M., Toto, L. H., Lee, D. Y.-W., & Lukas, S. E. (2015). A single dose of kudzu extract reduces alcohol consumption in a binge drinking paradigm. *Drug and Alcohol Dependence*, 153, 194–200.
<https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2015.05.025>
- Pérez-Mañá, C., Castells, X., Vidal, X., Casas, M., & Capellà, D. (2011). Efficacy of indirect dopamine agonists for psychostimulant dependence: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Substance Abuse Treatment*, 40(2), 109–122.
<https://doi.org/10.1016/j.jsat.2010.08.012>
- Rüfer, C. E., Bub, A., Möseneder, J., Winterhalter, P., Stürtz, M., & Kulling, S. E. (2008). Pharmacokinetics of the soybean isoflavone daidzein in its aglycone and glucoside form: a randomized, double-blind, crossover study. *The American Journal of Clinical Nutrition*, 87(5), 1314–1323.
<https://doi.org/10.1093/ajcn/87.5.1314>
- Sarnyai, Z., Shaham, Y., & Heinrichs, S. C. (2001). The role of corticotropin-releasing factor in drug addiction. *Pharmacological Reviews*, 53(2), 209–243. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=11356984>

- Schroeder, J. P., Cooper, D. A., Schank, J. R., Lyle, M. A., Gaval-Cruz, M., Ogbonmwan, Y. E., ... Weinshenker, D. (2010). Disulfiram Attenuates Drug-Primed Reinstatement of Cocaine Seeking via Inhibition of Dopamine β -Hydroxylase. *Neuropsychopharmacology*, 35(12), 2440–2449. <https://doi.org/10.1038/npp.2010.127>
- Singh, A. (2019). Alcohol Interaction with Cocaine, Methamphetamine, Opioids, Nicotine, Cannabis, and γ -Hydroxybutyric Acid. *Biomedicines*, 7(1), 16. <https://doi.org/10.3390/biomedicines7010016>
- Soyka, M., & Rösner, S. (2010). Emerging drugs to treat alcoholism. *Expert Opinion on Emerging Drugs*, 15(4), 695–711. <https://doi.org/10.1517/14728214.2010.500811>
- Stotts, A. L., Mooney, M. E., Sayre, S. L., Novy, M., Schmitz, J. M., & Grabowski, J. (2007). Illusory predictors: Generalizability of findings in cocaine treatment retention research. *Addictive Behaviors*, 32(12), 2819–2836. <https://doi.org/10.1016/j.addbeh.2007.04.020>
- Torrens, M., Fonseca, F., Mateu, G., & Farré, M. (2005). Efficacy of antidepressants in substance use disorders with and without comorbid depression. *Drug and Alcohol Dependence*, 78(1), 1–22. <https://doi.org/10.1016/j.drugalcdep.2004.09.004>
- Torrens, M., Martínez-Sanvisens, D., Martínez-Riera, R., Bulbena, A., Szerman, N., & Ruiz, P. (2011). Dual diagnosis: Focusing on depression and recommendations for treatment. *Addictive Disorders and Their Treatment*, 10(2), 50–59. <https://doi.org/10.1097/ADT.0b013e318215f322>
- UNODC, U. N. O. on D. and C. (2019). *World Drug Report 2019*. 4(June). Retrieved from <https://wdr.unodc.org/wdr2019/index.html>
- Verdejo-Garcia, A., Contreras-Rodríguez, O., Fonseca, F., Cuenca, A., Soriano-Mas, C., Rodríguez, J., ... de la Torre, R. (2014). Functional alteration in frontolimbic systems relevant to moral judgment in cocaine-dependent subjects. *Addiction Biology*, 19(2), 272–281. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2012.00472.x>
- Volkow, N. D., Wang, G.-J., Fowler, J. S., Tomasi, D., & Telang, F. (2011). Addiction: Beyond dopamine reward circuitry. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(37), 15037–15042. <https://doi.org/10.1073/pnas.1010654108>
- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G. J., Baler, R., & Telang, F. (2009). Imaging dopamine's role in drug abuse and addiction. *Neuropharmacology*, 56(SUPPL. 1), 3–8. <https://doi.org/10.1016/j.neuropharm.2008.05.022>
- Volkow, N. D., & Morales, M. (2015). The Brain on Drugs: From Reward to Addiction. *Cell*, 162(4), 712–725. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.07.046>

- Volkow, N. D., Fowler, J. S., Wang, G., Telang, F., Logan, J., Jayne, M., ... Swanson, J. M. (2010). Cognitive control of drug craving inhibits brain reward regions in cocaine abusers. *NeuroImage*, *49*(3), 2536–2543. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2009.10.088>
- Weinshenker, D. (2010). Cocaine sobers up. *Nature Medicine*, *16*(9), 969–970. <https://doi.org/10.1038/nm0910-969>
- Wetzel, H. N., Zhang, T., & Norman, A. B. (2017). A mathematical model of a recombinant humanized anti-cocaine monoclonal antibody's effects on cocaine pharmacokinetics in mice. *Life Sciences*, *184*, 81–86. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2017.07.006>
- Yao, L., Fan, P., Arolfo, M., Jiang, Z., Olive, M. F., Zablocki, J., ... Diamond, I. (2010). Inhibition of aldehyde dehydrogenase-2 suppresses cocaine seeking by generating THP, a cocaine use-dependent inhibitor of dopamine synthesis. *Nature Medicine*, *16*(9), 1024–1028. <https://doi.org/10.1038/nm.2200>
- Zorrilla, E. P., Wee, S., Zhao, Y., Specio, S., Boutrel, B., Koob, G. F., & Weiss, F. (2012). Extended access cocaine self-administration differentially activates dorsal raphe and amygdala corticotropin-releasing factor systems in rats. *Addiction Biology*, *17*(2), 300–308. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2011.00329.x>