

**UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA**

**Diseño y optimización *in vivo* de un sistema  
de cesión controlada de metadona para el  
tratamiento de la drogodependencia**

**Autor: Negrín Mata, Carmen Milagros**

**Directores: Carmen María Evora García,  
Araceli Delgado Hernández  
y Rosario Moratalla Villalba**

**Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica**



UNIVERSIDAD DE LA LAGUNA  
Departamento de Ingeniería Química  
y Tecnología Farmacéutica  
Facultad de Farmacia. 38200 - Tenerife (Spain)

Carmen María Evora García y Araceli Delgado Hernández, Catedrática y Profesora Titular de Universidad del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica de La Universidad de La Laguna, y Rosario Moratalla Villalba, Científico Titular del Consejo Superior de Investigación Científicas del Departamento de Plasticidad Neuronal (Instituto Cajal, Madrid).

CERTIFICAN: Que la presente memoria experimental titulada: “Diseño y optimización *in vivo* de un sistema de cesión controlada de metadona para el tratamiento de la drogodependencia”, elaborada por la Licenciada en Farmacia D<sup>a</sup> Carmen Milagros Negrín Mata, ha sido realizada bajo su dirección conjunta, en el Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica, y hallándose concluida, autorizan su presentación para ser juzgada por el Tribunal correspondiente.

Para que conste y surta los efectos oportunos, firman el presente certificado en La Laguna a doce de mayo de dos mil tres.

Esta Tesis doctoral ha sido realizada dentro del proyecto de investigación titulado “Desarrollo de nuevas formulaciones para el tratamiento de la drogodependencia” (PI1998/004) financiado por el Gobierno Autónomo de Canarias. Así mismo, este trabajo ha contado con la colaboración de la Dirección General de Atención a las Drogodependencias del Gobierno de Canarias a través de un convenio de colaboración.

La doctoranda ha sido becaria de la Consejería de Educación Cultura y Deportes del Gobierno Autónomo de Canarias (99-02).

*A mi madre*  
*A mi hermana*

*En el momento en que finaliza la realización de esta memoria, me doy cuenta que son muchas las personas que han aportado a este trabajo tanto su ayuda material como su apoyo incondicional y ese grupo de personas ha ido creciendo a lo largo de todos estos años de trabajo; gracias a ellas ha podido concluirse y gracias a este trabajo estaré vinculada a ellos para siempre. Gracias.*

*A mis directoras de tesis:*

*La Dra. Carmen M<sup>a</sup> Évora, a quien debo mi iniciación en la labor investigadora al haberme permitido formar parte de su equipo, la satisfacción del trabajo realizado y las inquietudes científicas en el mundo de la investigación.*

*La Dra. Araceli Delgado que ha contribuido a mi formación científica poniendo a mi servicio sus conocimientos. Quiero agradecerle el haberme guiado todos estos años por el camino de una investigación rigurosa.*

*La Dra. Rosario Moratalla por permitirme descubrir el mundo de la neurobiología, la fascinación que he vivido durante la realización de este apartado de la Tesis, y cómo no... haber tenido la suerte de cruzar el jardín de los magnolios.*

*Al Dr. Matías Llabrés por su colaboración en el tratamiento de los datos y ajuste del modelo farmacocinético.*

*A la Dra. Esther Sánchez, a quien he tenido la suerte de conocer como profesora, por compartir estos años de laboratorio, por su contagioso entusiasmo en el mundo de la investigación, su incansable labor, y por su amistad y afecto.*

*A la Dra. Isabel Soriano, por estar siempre dispuesta, por sus consejos y su inestimable apoyo.*

*A Ana, por su amistad y su ánimo siempre optimista, en este camino compartido.*

*A Margarita de la Rosa por su ayuda siempre inmediata y eficaz.*

*A Inma, Manolo, María Jesús, María José, Diego y a todos mis compañeros del Departamento de Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia y de la Facultad de Química por compartir conmigo todos estos años de labor. A todos gracias por cada minuto compartido aún en las tareas más cotidianas.*

*A la Dra. María Rosa Arnau, Carmelo, Antonio y demás componentes del estabulario central de la Universidad. Gracias por la ayuda prestada durante estos años.*

*Al Dr. Miguel Ángel Pérez Batista por permitirme el uso del vibrotomo y a los integrantes del departamento de Citología de la Facultad de Biología por su apoyo y amistad.*

*Al Departamento de Microbiología y al Dr. Miguel Ángel Falcón por su amabilidad y por los momentos de crítica operística que tanto nos agradan.*

*Al Servicio de Bioquímica del Laboratorio Central del Hospital Universitario de Canarias, por permitirme el uso del TDX.*

*A Cristina Grande por su admirable capacidad de trabajo, por su inestimable labor en esta tesis. Porque el trabajo a su lado no encuentra obstáculos sino soluciones acertadas...Gracias por las fotografías y por tantas horas de incubaciones. Gracias por tu compañía que está presente aún a miles de kilómetros de distancia.*

*A mis compañeros del Instituto Cajal de Madrid: Emy, Ana Belén, Israel, José Luis, Dr. Antonio Ruiz Marcos, Tati, Nieves y a todos cuantos me acogieron con entusiasmo.*

*A D. Antonio Perera Molinero por la realización del análisis histopatológico y a mis compañeros del Laboratorio González Santiago: Ángeles, Carmen, Cristina, Fran, Kati, M<sup>a</sup> Eugenia, Paco, Pilu, Rocío, Tomás, por su apoyo y amistad.*

*A los miembros de mi Familia que siempre han estado a mi lado.*

*A Landy a Eladio. Gracias por todo.*

*A la Coral Universitaria de La Laguna por perdonar mi ausencia en esta última etapa del trabajo y por haber sido fuente de enseñanzas y vivencias que me han servido para sobrellevar el trabajo. Gracias por tantos años de música.*

*Quiero dar especialmente las gracias a mi madre y a mi hermana, verdadera fuente de mis fuerzas, las que me han dado todo y enseñado todo lo que soy y de quienes hoy me siento orgullosa. Gracias.*

<b>1.- INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1.- TRATAMIENTO DE DESHABITUACIÓN A OPIÁCEOS: METADONA ...</b>	<b>1</b>
<b>1.2.- METADONA: MECANISMO DE ACCIÓN .....</b>	<b>4</b>
• <b>Receptores opioides .....</b>	<b>4</b>
• <b>Ganglios basales .....</b>	<b>7</b>
• <b>Manifestaciones de la plasticidad neuronal a largo plazo .....</b>	<b>10</b>
<b>1.3.- FARMACOCINÉTICA DE LA METADONA .....</b>	<b>14</b>
<b>1.4.-CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA/RESPUESTA AL TRATAMIENTO.....</b>	<b>18</b>
<b>1.5.-FORMULACIONES DE CESIÓN PROLONGADA CONTENIENDO METADONA .....</b>	<b>19</b>
<b>2.- OBJETIVOS .....</b>	<b>23</b>
<b>3.- MATERIALES Y MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
<b>3.1.- MATERIALES .....</b>	<b>25</b>
• <b>Principio activo: metadona base .....</b>	<b>25</b>
• <b>Material polimérico .....</b>	<b>25</b>
<b>3.2.- SISTEMAS DE CESIÓN CONTROLADA DE METADONA .....</b>	<b>28</b>
• <b>Elaboración de microesferas .....</b>	<b>28</b>
• <b>Elaboración de implantes .....</b>	<b>29</b>
<b>3.3.- ESTUDIOS <i>IN VITRO</i> .....</b>	<b>30</b>
• <b>Determinación de contenido y eficacia de incorporación .....</b>	<b>30</b>
• <b>Ensayos de cesión .....</b>	<b>30</b>
• <b>Determinación del tamaño de partícula .....</b>	<b>31</b>
• <b>Microscopía electrónica de barrido .....</b>	<b>31</b>

---

• Calorimetría diferencial de barrido .....	31
• Ensayo de degradación .....	32
• Métodos analíticos para la determinación de metadona <i>in vitro</i> .....	32
<b>3.4.- ESTUDIOS <i>IN VIVO</i> .....</b>	<b>39</b>
• Administración subcutánea de clorhidrato de metadona en disolución .....	40
• Administración de los sistemas de cesión controlada de metadona.....	42
• Tratamiento de muestras para la determinación de metadona .....	42
• Método analítico para la determinación de metadona <i>in vivo</i> .....	43
• Técnicas inmunocitoquímicas para el estudio de la respuesta neuronal.....	48
<b>3.5.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.....</b>	<b>52</b>
• Modelo Farmacocinético .....	52
• Deconvolución numérica. Análisis de cesión <i>in vivo</i> .....	53
<b>4.- RESULTADOS .....</b>	<b>57</b>
<b>4.1.- Dosis únicas: Niveles en suero y cerebro .....</b>	<b>57</b>
<b>4.2.- Dosis repetidas: Niveles séricos .....</b>	<b>63</b>
<b>4.3.- ESTUDIO DE LA RESPUESTA NEURONAL .....</b>	<b>67</b>
• Evidencia de la activación de la expresión de c-fos por metadona	67
• Patrón de distribución de c-fos en el estriado inducido por metadona.....	67
• Fenotipo de las neuronas estriatales que responden a la metadona.....	67
• Curva Tiempo - Respuesta (c-fos) .....	70



• Curva Dosis - Respuesta .....	72
4.4.- MICROESFERAS .....	73
• Elaboración y caracterización .....	73
• Ensayos de cesión <i>in vitro</i> .....	74
• Ensayos <i>in vivo</i> de microesferas .....	85
• Caracterización <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> de microesferas .....	89
4.5.- IMPLANTES .....	91
4.5.1.-IMPLANTES PARA UNA CESIÓN DE METADONA DE UNA SEMANA.	
ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	92
• Implantes de clorhidrato de metadona .....	92
• Implantes de mezclas de metadona base y clorhidrato .....	97
• Implantes de metadona base .....	106
4.5.2.- IMPLANTES PARA UNA CESIÓN DE METADONA DE UN MES.	
ENSAYOS <i>IN VITRO</i> .....	127
• Elaboración y características de implantes para un mes .....	127
• Ensayos de cesión .....	128
4.5.3.- ENSAYOS <i>IN VIVO</i> CON IMPLANTES .....	134
4.5.3.1- Ensayos <i>in vivo</i> de implantes del lote p- $G_{12}^{50}$ - $M_B^{50}$ .....	134
4.5.3.2.- Ensayos <i>in vivo</i> de implantes del lote c- $G_{12}^{50}$ - $M_B^{50}$ .....	140
4.5.3.3.- Ensayos <i>in vivo</i> de implantes del lote c- $G_{12}^{50}$ - $M_B^{50}$ ( $L_{30}^6$ ) .....	143
4.5.3.4.- Ensayos <i>in vivo</i> con implantes del lote c- $L_{30}^{35}$ - $M_B^{65}$ ( $L_{30}^{25}$ ) -70 .....	146
5.- DISCUSIÓN .....	153

<b>5.1.- Farmacocinética de la d,l-metadona en ratón .....</b>	<b>153</b>
<b>5.2.- Respuesta neuronal .....</b>	<b>156</b>
<b>5.3.- Formulaciones de cesión sostenida .....</b>	<b>161</b>
• <b>Elaboración y optimización de microesferas para una semana de     tratamiento .....</b>	<b>171</b>
• <b>Elaboración y optimización de implantes para una semana de     tratamiento .....</b>	<b>171</b>
• <b>Elaboración y optimización de implantes para un mes de     tratamiento .....</b>	<b>181</b>
• <b>Niveles en cerebro. Implantes .....</b>	<b>186</b>
• <b>Respuesta neuronal .....</b>	<b>188</b>
<b>6.- CONCLUSIONES .....</b>	<b>193</b>
<b>7.- BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>195</b>

## **INTRODUCCIÓN**

## **1.- INTRODUCCIÓN**

### **1.1.- TRATAMIENTO DE DESHABITUACIÓN A OPIÁCEOS: METADONA**

En las últimas décadas se ha demostrado la eficacia de la metadona como tratamiento de mantenimiento (TMM) para adictos a la heroína. El clorhidrato de metadona fue desarrollado en Alemania durante la Segunda Guerra Mundial y posteriormente se introdujo como tratamiento de mantenimiento piloto. En la actualidad su uso se ha extendido a la mayoría de los países, hasta el momento aproximadamente 250.000 adictos a heroína han sido tratados con este fármaco.

El clorhidrato de metadona posee un perfil farmacológico similar a la morfina si bien no produce la euforia característica de esta droga en aquellos pacientes en los que se ha desarrollado tolerancia; se metaboliza a productos inactivos y su eliminación es más lenta, permitiendo la administración de una sola dosis al día. Los pacientes que reciben metadona no experimentan los típicos episodios de subidas y bajadas en su estado emocional que se producen con el narcótico habitual (O'Brien, 1996). Los sujetos que se inyectan heroína varias veces al día oscilan entre la euforia y la depresión. En contraste, el paciente mantenido con metadona permanece en el rango normal con pequeñas fluctuaciones después de la dosis diaria, con lo que el deseo por la droga disminuye hasta desaparecer y los ritmos neuroendocrinos pueden ser restaurados. Los pacientes desarrollan tolerancia a los efectos sedantes de la metadona y recuperan la capacidad de atención.

La eficacia de la metadona en la reducción del uso de opiáceos fue documentada por primera vez en USA (Dole y Nyswander, 1965; Dole *et al.*, 1968), si bien estos tratamientos han sido ampliamente evaluados posteriormente. Muchos estudios han comparado grupos de pacientes bajo tratamiento con metadona frente a grupos control durante periodos largos, incluso superiores a un año, mostrando su superioridad para reducir, aunque

no siempre eliminar, el uso de opiodes (Sorensen, 1996). Además la metadona puede usarse diariamente sin que se produzcan efectos secundarios importantes (Cushman, 1977; Dole y Nyswander, 1965).

Evidentemente el éxito de la terapia con metadona contribuye enormemente a la reducción del uso de la heroína y de la criminalidad en la calle asociada a la adicción. Además, se reducen los riesgos de muerte, hospitalización y enfermedades como el SIDA, contribuyendo a disminuir la expansión de este síndrome debida al uso compartido de jeringuillas. En conjunto pueden lograrse la rehabilitación social y la consecución del bienestar.

La imagen de los pacientes que reciben los tratamientos es en muchas ocasiones la de personas con un estilo de vida drogodependiente y sin motivaciones para cambiar. Esta es la esencia de las críticas a los tratamientos: mientras éste dura, los pacientes son todavía adictos; viven una vida que gira en torno a las drogas y dejan de ser adictos a la heroína para serlo a la metadona. Sin embargo, los resultados no justifican la denominación de “adicción prolongada” (Bell y Zador, 2000).

Los TMM son de larga duración y requieren el deseo del paciente por rehabilitarse y cambiar el estilo de vida. Estos tratamientos atraen a una población en desventaja cuya rehabilitación es un proceso largo y difícil siendo el apoyo psicológico imprescindible. Para la mayoría de los adictos a la heroína que solicitan un tratamiento, la adicción es un problema crónico asociado a frecuentes recaídas y serios riesgos para la salud y la integración social. Las recidivas son muy frecuentes, aproximadamente el 70% de los pacientes pueden recaer transcurrido un año de la terminación de la terapia, volver a las calles y exponerse a contraer el SIDA (Zanis *et al.*, 1996).

Los TMM son caros, el coste varía en función de los tratamientos de soporte coadyuvantes, sin embargo, si se consigue que el paciente se mantenga en el programa a la larga se reduce. Tanto los riesgos como los

beneficios del tratamiento de mantenimiento con metadona dependen considerablemente de la calidad de los tratamientos.

Estos programas son gestionados generalmente por entidades estatales y varían unos de otros. En España la metadona en disolución se dispensa diariamente en centros estatales y en oficinas de farmacias incluidas en los TMM. Los pacientes, por tanto, deben acudir diariamente a los centros de dispensación lo que asegura un mejor cumplimiento del tratamiento y evita evidentemente el tráfico de esta droga (Sorensen, 1996). Sin bien, esto dificulta la integración socio-laboral de los pacientes y teniendo en cuenta que la calidad de los tratamientos puede reducir los riesgos y aumentar los beneficios, sería de gran ayuda la obtención de nuevas formas de dosificación prolongada que, junto con el apoyo de los grupos de atención, consigan que los pacientes sean más independientes de los programas de atención y les haga sentirse reinsertados.

## 1.2.- METADONA: MECANISMO DE ACCIÓN

La metadona es un agonista opiáceo y forma parte de los analgésicos opiáceos, siendo la morfina el fármaco prototipo. Se caracterizan por poseer afinidad selectiva por los receptores opioides. Como consecuencia de la activación de estos receptores, inducen analgesia de elevada intensidad, mediante sus interacciones con las vías ascendentes nociceptivas del SNC, así como otros efectos motivacionales que tienden a favorecer la instauración de una conducta de autoadministración denominada farmacodependencia, mediante su interacción con el sistema límbico.

Los fármacos opiáceos han sido muy utilizados a lo largo de muchos siglos para el control de algunos trastornos patológicos tales como dolor, diarrea y tos. Los opiáceos han sido también muy empleados por sus efectos psicoactivos o motivacionales. El abuso de estas drogas constituye un serio problema social en todo el mundo. Tanto los efectos terapéuticos como psicológicos son consecuencia de la activación de un sistema endógeno de péptidos opioides y sus receptores que se encuentran distribuidos a lo largo tanto del sistema nervioso central como del periférico (Terenius, 2000).

- **Receptores opioides**

### **Ligandos endógenos (péptidos opioides)**

La estereoselectividad de los fármacos opiáceos, la extraordinaria potencia de algunos de ellos y las técnicas de fijación estereoselectiva saturable y competitiva demostraron la existencia de receptores opioides. La búsqueda de ligandos endógenos que utilizaran fisiológicamente esos receptores dio lugar al descubrimiento de una serie de péptidos que contiene la secuencia de Met-enkefalina o Leu-enkefalina. Estos péptidos son capaces de ocupar selectivamente los receptores opioides, de inducir las acciones propias de la morfina y de ser antagonizados por el antagonista naloxona.

Estos péptidos son denominados péptidos opioides por su capacidad de imitar a los fármacos opiáceos (Matthes *et al.*, 1996; Kieffer, 1999).

### **Tipos de receptores opioides**

Se han diferenciado y clonado tres tipos básicos de receptores opioides: el mu ( $\mu$ ) activado por morfina, el kappa ( $\kappa$ ) activado por la ketociclazocina y el delta ( $\delta$ ) por el que presentan gran afinidad la Met-enkefalina y Leu-enkefalina.

Desde los primeros experimentos farmacológicos se ha intentado investigar si los efectos terapéuticos y los adversos son consecuencia de la activación de los mismos o de diferentes receptores opioides (Pasternak *et al.*, 1975; Ling *et al.*, 1984). Sin embargo, en los últimos años se ha demostrado mediante ratones mutantes de cada uno de los receptores opioides que los receptores  $\mu$  están críticamente implicados en el control de la sensación nociceptiva, en el desarrollo de tolerancia y dependencia a la morfina, así como en la expresión de múltiples signos del síndrome de abstinencia (s.d.a.) (Matthes *et al.*, 1996; Kieffer, 1999), mientras que los agonistas  $\kappa$  y  $\delta$  exhiben menor poder adictivo y también menor poder analgésico. Muy recientemente se ha demostrado también que los efectos motivacionales de los cannabinoides están mediados, en parte, por los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  (Ghozland *et al.*, 2002).

El estudio de la selectividad de la morfina, codeína, l-metadona y d-propoxifeno por los receptores opioides demuestra que las afinidades relativas de la morfina y metadona hacia los tres tipos de receptores fueron similares, de alta afinidad y en orden decreciente para  $\mu$ ,  $\kappa$  y  $\delta$  (Neil, 1984).

### **Distribución de receptores opioides**

Los diversos tipos de receptores se distribuyen de manera irregular



por los núcleos y las áreas del SNC y por los tejidos periféricos. Los tres tipos de receptores están diferencialmente distribuidos en cerebro de rata. Concretamente los receptores  $\mu$  se localizan con mayor densidad en corteza cingular, neocorteza, amígdala, hipocampo, giro dentado presubículo, núcleo accumbens, caudado-putamen, tálamo, habénula, núcleo interpeduncular, sustancia negra compacta y reticulada, colículo superior e inferior y núcleo del raphe. En cuanto a los receptores  $\kappa$ , aunque no tan extendidos como los  $\mu$ , se encuentran densamente distribuidos en amígdala, tubérculo olfatorio, núcleo accumbens, caudado-putamen, área preóptica medial, hipotálamo, eminencia media, tálamo periventricular y núcleo interpeduncular. Los receptores  $\delta$  se expresan principalmente en la corteza frontal y parietal, núcleos caudado-putamen y accumbens, tuberculos olfatorios, amígdala, sustancia negra, hipocampo y en los núcleos del puente (Mansour *et al.*, 1995).

### **Consecuencias moleculares de la activación de receptores**

El efecto de los opioides sobre las neuronas ha sido ampliamente estudiado tanto en animal entero como en cultivos celulares. La activación de los receptores opioides, que pertenecen a la familia de receptores acoplados a proteínas G (receptores-PG), activan una serie de reacciones enzimáticas en cascada y canales iónicos como son la inhibición de la adenilato-ciclasa, y la apertura de los canales de  $K^+$  y cierre de los canales de  $Ca^{2+}$ , que dan lugar a alteraciones en la excitabilidad neuronal y por tanto también en la comunicación sináptica (Massote y Kieffer, 1998).

Son numerosos los mecanismos celulares que pueden estar involucrados en el desarrollo de estos fenómenos, incluyendo activación de kinasas, endocitosis o internalización de los receptores, alteraciones de los canales iónicos, producción de óxido nítrico y formación de heterodímeros (Mansouri *et al.*, 1997; Pitcher *et al.*, 1998; Mayer *et al.*, 1999; Jordan y Devi,

1999). Recientemente se está prestando especial atención a la capacidad de los agonistas opioides para promover la endocitosis de los receptores y su relación con el desarrollo de tolerancia, sin embargo en el momento actual no existe un consenso en las distintas teorías (McConalogue *et al.*, 1999; Sternini *et al.*, 2000; Bushell *et al.*, 2002).

Actualmente se sabe que los efectos terapéuticos de los fármacos opiáceos son consecuencia de la rápida inhibición de la liberación de neurotransmisores y de la hiperpolarización neuronal desencadenada por la interacción con los receptores opioides. Sin embargo, las bases moleculares de los fenómenos observados tras la administración crónica (tolerancia, dependencia y s.d.a.) se siguen investigando hoy en día, aunque se ha demostrado que todas estas acciones disminuyen en ratones KO (del inglés *knock out*) del receptor opioide  $\mu$  (Matthes *et al.*, 1996; Kieffer, 1999). Por lo tanto estos efectos están relacionados o son consecuencia de la activación de receptores opioides (Harrison *et al.*, 1998).

- **Ganglios basales**

Los receptores opioides se encuentran ampliamente distribuidos en los ganglios basales. El núcleo caudado-putamen junto con el núcleo accumbens constituye el estriado que, con el globo pálido, la sustancia negra y los núcleos subtalámicos, conforman los principales núcleos de los ganglios basales. Todos estos núcleos se encuentran interrelacionados como integrantes de un circuito de aferencias y eferencias neuronales.

El estriado, principalmente, recibe proyecciones de la corteza, del tálamo y del tallo cerebral y sus neuronas proyectan al globo pálido y la sustancia negra, siendo estos dos últimos las principales vías de salida de los ganglios basales. El globo pálido se divide en dos segmentos: interno y externo. La sustancia negra posee a su vez dos zonas: la compacta, cuyas

neuronas son dopaminérgicas, y la reticulada. Los núcleos subtalámicos (cuyas neuronas glutamatérgicas son las únicas proyecciones excitatorias de los ganglios basales) están conectados anatómicamente con ambos segmentos de la sustancia negra y con el globo pálido. El estriado recibe, además, proyecciones serotoninérgicas procedentes de los núcleos raphe.

### **Organización topográfica del estriado**

El estriado es una estructura heterogénea. Su organización topográfica tiene lugar de manera que las áreas dorsal, medial y ventral se asocian con los sistemas motor, asociativo y límbico respectivamente. Así, las áreas de la corteza motora y premotora inervan el estriado dorsal, las cortezas cingular y agranular inervan al estriado medio y por último, el estriado ventral es inervado por áreas límbicas como el hipocampo y la amígdala (Joel y Weiner, 1994). En cuanto al sistema dopaminérgico, el estriado dorsal es inervado por la sustancia negra compacta y el estriado ventral por el área tegmental ventral (Joel y Weiner, 2000).

### **Organización compartimental del estriado**

El estriado carece de organización citoarquitectónica, sin embargo sus células están organizadas en compartimentos macroscópicos de unos 200-600  $\mu\text{m}$  denominados estriosomas que constituyen el 15-20% de la masa celular del estriado. El 80-85% restante lo ocupa el compartimento circundante denominado matriz (Walker *et al.*, 1993). En estos compartimentos se encuentran diferencialmente distribuidos los neurotransmisores, diversas sustancias neuroquímicas e incluso los receptores; por ejemplo, en la matriz se distribuyen la acetilcolinesterasa (Graybiel y Ragsdale, 1978), y la calbindina (Gerfen *et al.*, 1985) y los receptores dopaminérgicos D2 y el transportador de la dopamina (Graybiel y Moratalla, 1989) y en los estriosomas los receptores  $\mu$  opioides (Arvidson *et*

*al.*, 1995, Herkenhan y Pert, 1981) y los D1 y D3 (Xu *et al.*, 1997).

### **Tipos de neuronas estriatales**

El estriado se compone de dos tipos de neuronas: neuronas de proyección e interneuronas. Las neuronas de proyección representan el 95% del total de neuronas del estriado. Son la principal diana de proyecciones que proceden de la corteza y la única vía de salida del estriado. El 5% de las neuronas restantes lo constituyen las interneuronas que se encargan de integrar la información aferente a las neuronas de proyección.

*Neuronas de proyección:* estas neuronas se caracterizan por poseer un soma de mediano tamaño y dendritas densamente pobladas de espinas (Kubota y Kawaguchi, 1993). Pueden subdividirse en dos grupos: las que forman la vía estriatopálida o indirecta, proyectan al segmento externo del globo pálido y expresan los neuropéptidos encefalina y neurotensina, y las que forman la vía estriatonígrica o directa proyectan a la sustancia negra reticulada y al núcleo entopeduncular, y expresan los neuropéptidos sustancia P y dinorfina (Kawaguchi *et al.*, 1990).

*Interneuronas:* Su característica común es la ausencia de espinas y sus axones no proyectan fuera del estriado. Se inervan a sí mismas, a los otros tipos de interneuronas (Chang y Kita, 1992; Bolam y Bennett, 1995) y a las neuronas de proyección (Kawaguchi, 1993; Kawaguchi *et al.*, 1995). Poseen rasgos morfológicos y químicos que sugieren una subdivisión en tres poblaciones:

a) *Interneuronas colinérgicas:* son las neuronas de mayor tamaño, utilizan acetilcolina como neurotransmisor. Expresan los receptores dopaminérgicos D5 en gran cantidad (Rivera *et al.*, 2002) y su activación se ha asociado con la potenciación a largo plazo (Aosaki *et al.*, 1998).

b) *Interneuronas somatostatina:* utilizan GABA como neurotransmisor, contienen dos neuropéptidos (somatostatina y neuropéptido Y) y se considera

que producen óxido nítrico puesto que son activas para la NADPH-diaforasa (Kawaguchi, 1993) y además se activan con tratamientos crónicos con cocaína (Moratalla et al, 1996 a).

c) *Interneuronas parvoalbúmina*: expresan la proteína ligadora de calcio parvoalbúmina. Se distribuyen en la matriz y los estriosomas sin preferencia (Cowan et al., 1990) si bien atraviesan los límites entre ambos compartimentos (Chang y Kita, 1992).

- **Manifestaciones de la plasticidad neuronal a largo plazo**

**Cambios neuronales: expresión de c-fos**

Las neuronas se han definido como plásticas porque pueden mostrar cambios de corta o larga duración en su fenotipo en respuesta a diferentes estímulos. Esta respuesta al entorno puede ser inmediata o retardada y provoca alteración de la expresión génica mediante un complejo mecanismo en el que están implicados neurotransmisores, mensajeros secundarios y una familia de proteínas conocidas como factores de transcripción.

Una de las familias de factores de transcripción es la codificada por los genes de expresión temprana o IEG (del inglés *immediate early genes*). Se llaman así porque su inducción no está regulada por factores de transcripción proteicos. Los productos de estos genes son factores de transcripción que no suelen estar expresados en la célula y sólo regulan la expresión de otros genes una vez han sido transcritos y traducidos. Se han descrito más de un centenar de estos factores, aunque los más conocidos son CREB, c-Fos, Fra-1, Fra-2, Fos B, c-Jun, Jun B, etc. Una vez han sido traducidos entran en el núcleo y activan otros genes de respuesta tardía. Este tipo de actividad puede ser la base de cambios a largo plazo en la plasticidad neuronal implicada en procesos como el aprendizaje y la memoria, la tolerancia a las drogas y la sensibilización.

En el caso del CREB por ejemplo, una vez que la célula recibe un estímulo mediante la activación de un receptor, este receptor activa la adenilciclase produciendo un aumento de adenosín monofosfato cíclico (AMPC) que interviene en la fosforilación de la proteína kinasa A provocando la disociación de sus subunidades reguladora y catalítica. Esta última entra al núcleo donde fosforila a la proteína nuclear CREB que se encuentra expresada en grandes cantidades y sólo se activa tras su fosforilación. El CREB así activado se une a un dominio regulador llamado CRE (del inglés *cyclic AMP responsive element*) en la región promotora de algunos genes y favorece su transcripción. Los factores de transcripción suelen actuar en cascada. Así, CREB y otros factores de transcripción cuando son activados regulan la expresión de genes tempranos tales como c-fos y c-jun. Fos y Jun forman dímeros para unirse a la secuencia AP-1 de los genes diana alterando así la actividad transcripcional de esos genes.

Las familias Fos y Jun son las mejor caracterizadas entre las familias de IEGs. Sus productos, proteínas nucleares Fos y Jun, son sintetizadas en el citoplasma celular y transportadas al núcleo y pertenecen a la familia de factores de transcripción de leucine-zipper. La estructura leucine-zipper permite a Fos y Jun unirse para formar heterodímeros, y unirse a la región reguladora del DNA, conocida como AP-1. Cuando el dímero se une al DNA, lo torsiona facilitando el ensamblaje de los complejos de iniciación y de este modo participa en la regulación de la transcripción.

La localización y regulación de estas familias de factores de transcripción han sido estudiadas en el cerebro usando técnicas inmunohistoquímicas para la proteína c-Fos y Northern blotting o hibridación *in situ* para ARNm de c-fos. Generalmente, el nivel de expresión de los IEGs es bajo en condiciones basales, aumentando rápidamente después de la estimulación. El aumento de expresión se utiliza también como marcador de la actividad neuronal.

Debido a la inducción de c-fos por varias drogas, su expresión ha sido particularmente estudiada por los neurofarmacólogos para determinar el sustrato anatómico de los compuestos en estudio.

Se ha estudiado la inducción de Fos en determinadas regiones cerebrales por su implicación en la adicción en respuesta a anfetamina y cocaína, morfina, cafeína, nicotina y tetrahidrocannabinol, etc. Ya que la expresión del c-fos refleja cambios agudos en el estado fisiológico de las neuronas, podría ser usada para identificar poblaciones neuronales que son activadas durante el s.d.a. a la morfina.

Concretamente, el patrón de expresión de ARNm de c-fos después de la precipitación del s.d.a. a morfina se superpone con la distribución de receptores opioides. Estos receptores están acoplados negativamente a la adenil ciclasa y la precipitación del s.d.a. con naltrexona debe tener un efecto activador de las neuronas lo que provoca la inducción de c-fos. Esta superposición ocurre en estructuras fuertemente asociadas con la expresión del s.d.a. En particular, el s.d.a. a morfina induce la expresión de c-fos en las neuronas de proyección del estriado tanto en las estriatopalidales como en las estriatonigrales. La proporción de neuronas activadas es diferente en el caudado-putamen en el que se expresa mayor número de neuronas estriatopalidales (que son las que expresan encefalina) y el núcleo accumbens (donde se expresa mayor cantidad de neuronas estriatonigrales que son las que expresan dinorfina). Además, también se expresa c-fos en áreas corticales, núcleos talámicos e hipotalámicos y locus coeruleus (LC) (Georges *et al.*, 2000). Según Stornetta *et al.* (1993), el aumento en la expresión de c-fos en las áreas autonómicas cerebrales activadas durante el s.d.a. puede contribuir a los síntomas autonómicos del s.d.a.

Los animales tratados crónicamente con morfina en los que no se precipitó el s.d.a. con naltrexona expresaron niveles de c-fos más bajos que los animales control en regiones como el LC, mientras que, en otras regiones

como corteza y neocórtex, el c-fos fue expresado en respuesta al tratamiento con morfina, tanto agudo como crónico. Concretamente se han identificado cambios en respuesta al tratamiento crónico con opiáceos que incluyen incrementos en los niveles de la adenil ciclasa, proteína quinasa dependiente de AMPc y en sustratos de la proteína quinasa como la tiroxina hidroxilasa (Hayward *et al.*, 1990).

Existen estudios que emplean tratamientos agudos con morfina y que demuestran un incremento en el número de células que expresan c-fos en el estriado (Chang, 1990), concretamente en la región dorsomedial (Liu *et al.*, 1994). Este patrón de inducción de c-fos es similar al observado para cocaína y anfetamina aunque la anfetamina presenta patrones de expresión de c-fos parcheados en contraste con la cocaína, que presenta una expresión mucho más homogénea (Graybiel, 1990), y demuestran la heterogeneidad funcional que existe entre el estriado dorsolateral y la parte lateral y central del núcleo accumbens. Concretamente, sugieren que la parte lateral del núcleo accumbens es el área del complejo estriatal más reactiva al estrés y a las drogas de abuso (Barrot *et al.*, 1999).

Debido a la dificultad para discriminar la influencia del estrés de los efectos directos del s.d.a. a opiáceos en la expresión de ARNm de c-fos, se debe considerar la posibilidad de que el estrés participe en la activación neuronal observada durante el s.d.a. (Georges *et al.*, 2000) y además, se han observado diferencias entre ambos sexos en la inducción de los IEGs por la morfina sugiriendo que esas diferencias podrían estar moduladas por las hormonas gonadales (D'Souza *et al.*, 1999).

También la administración aguda de drogas de abuso como morfina (Liu *et al.*, 1994), cocaína (Graybiel, 1990; Young *et al.*, 1991; Moratalla *et al.*, 1992, 1993) y anfetamina (Graybiel, 1990), etanol y nicotina se ha visto que incrementan los niveles de dopamina en el Caudado Putamen y Núcleo accumbens (Di Chiara e Imperato, 1988). La morfina activa los receptores



opioides para liberar dopamina en el estriado (Liu *et al.*, 1994)). Se cree que los receptores serotoninérgicos (Graybiel, 1990; Frankel *et al.*, 1998), dopaminérgicos y glutamatérgicos (Graybiel, 1990; Liu *et al.*, 1994) están relacionados con la expresión de c-fos por morfina ya que la inducción de c-fos puede ser bloqueada por antagonistas de esos receptores. Entonces, si estos receptores están implicados en el efecto de recompensa a opiáceos y en la inducción de c-fos y de sus genes diana, deben producir cambios a largo plazo en los circuitos estriatales y del núcleo accumbens que contribuyan al abuso de opiáceos (Graybiel, 1990; Liu *et al.*, 1994; Moratalla *et al.*, 1996 b).

Algunas de las regiones cerebrales principalmente relacionadas con la dependencia y el s.d.a. a opiáceos son el núcleo accumbens, la corteza cingular, el caudado-putamen, la sustancia negra, el tálamo, el globo pálido y la amígdala.

### 1.3.- FARMACOCINÉTICA DE LA METADONA

La metadona es un opiáceo de carácter básico con un pKa de 9,2, elevada liposolubilidad y generalmente está disponible en forma de racemato (d,l-metadona). Se considera que la l-metadona es la forma activa.

Se administra usualmente por vía oral absorbiéndose de forma rápida, el  $t_{max}$  se encuentra entre 2,5 y 3 horas para disolución y comprimidos respectivamente, su biodisponibilidad varía entre 0,67 (Kristensen *et al.*, 1996) y 0,95 (Rostami-Hodjegan *et al.*, 1999).

La metadona se distribuye ampliamente, debido a su gran lipofilia. Gabrielsson *et al.* (1985), en un trabajo realizado con ratas preñadas, ponen de manifiesto que la metadona se distribuye al menos en pulmón, riñón, hígado, intestino, músculo y cerebro con coeficientes de reparto tejido/plasma

de 156,3, 76,6, 44,2, 37,2, 14,7 y 4,6 respectivamente. Esta gran afinidad a tejidos justifica el elevado volumen de distribución en humanos. El volumen de distribución, al igual que otros parámetros farmacocinéticos de la metadona, presenta una gran variabilidad; se han publicado valores de  $V_{eq}$  de 4,2-9,2 l/kg en adictos a opiáceos (Wolf *et al.*, 1993) y de 1,71- 5,34 l/kg en pacientes con dolor crónico (Inturrisi *et al.*, 1987).

La unión de la metadona a proteínas plasmáticas es elevada, del 86% (Inturrisi *et al.*, 1987), y similar a la encontrada por otros autores en ratas (Garrido *et al.*, 1996; Gómez *et al.*, 1995). Debido a su carácter básico se une fundamentalmente a las  $\alpha_1$ -glicoproteínas (AAG) (Romanch *et al.*, 1981; Wilkins *et al.*, 1997). Los niveles de AAG varían dependiendo de las condiciones fisiológicas o patológicas, es bien conocido el aumento de estas proteínas en situaciones de estrés; así, la fracción libre en plasma ( $f_u$ ) es menor en adictos a opiáceos y en pacientes con cáncer que en individuos sanos (Abramson, 1982; Calvo *et al.*, 1996).

Además, hay que indicar que se han encontrado diferencias en el valor del volumen de distribución de los dos enantiómeros. Kristensen *et al.* (1996) estiman valores de 496,6 l y 289,1 l para l y d-metadona respectivamente, también se ha publicado que la fracción libre puede ser diferente, siendo la unión de l-metadona significativamente mayor que la d-metadona (Eap *et al.*, 1990; Foster *et al.*, 2000). Todo ello contribuye a la variabilidad farmacocinética de este fármaco.

La metadona se elimina principalmente por metabolismo hepático y aproximadamente un 24% se excreta por vía renal inalterado (Benet *et al.*, 1996). La excreción renal es pH dependiente, siendo el aclaramiento renal inversamente proporcional al pH de la orina. Las variaciones del pH urinario

son en parte responsables de la variabilidad interindividual del aclaramiento plasmático (Rostami-Hodjegan *et al.*, 1999).

En lo que respecta a la eliminación hepática, el aclaramiento hepático en humanos es restrictivo con valores de razón de extracción (ER) de 0,16 y 0,08 para adictos y pacientes con dolor crónico respectivamente. Por tanto, variará en función de  $f_u$  y del aclaramiento intrínseco, además de la variabilidad en los niveles de AAG, ya mencionada, tanto en pacientes con dolor crónico como en toxicómanos, por lo que cabe esperar una gran variabilidad en este parámetro.

La metadona es extensamente metabolizada, el principal metabolito 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidona (EDDP) es inactivo y en su biotransformación están implicados los enzimas del citocromo P450. La metadona se metaboliza principalmente vía CYP3A4 y, en menor extensión, a través de CYP2C9 y CYP2C19 (Foster *et al.*, 1999). La variabilidad interindividual en el aclaramiento de la metadona es principalmente debida a variaciones interindividuales en la expresión del CYP3A4. Además, se puede producir una inducción de este enzima tanto por otros fármacos como por la propia metadona; así, se ha publicado que el aclaramiento de la metadona puede incrementarse hasta 3,5 veces con su uso crónico (Rostami-Hodjegan *et al.*, 1999; Wolf *et al.*, 2000). Esta característica contribuye enormemente a la dificultad en la predicción del aclaramiento. Además, de acuerdo con la reciente publicación de Boulton *et al.* (2001), la metadona actúa como inhibidor del CYP3A después de la administración de una dosis oral.

Por otro lado hay que tener en cuenta que la variabilidad farmacocinética de la metadona puede estar también aumentada por diferencias en los parámetros de los dos enantiómeros. Algunos autores han encontrado diferencias en el aclaramiento, Kristensen *et al.* (1996) dan valores ligeramente más elevados para el aclaramiento de l-metadona (0,158 l/min) que de d-metadona (0,129 l/min). Estas ligeras diferencias también se

han encontrado en perros (Schmidt *et al.*, 1994) aunque recientemente Foster *et al.* (1999) publican que no hay estereoselectividad en el metabolismo en microsomas humanos. Por tanto, pudiera ser que las diferencias en el aclaramiento sean debidas a diferencias en fu.

La farmacocinética de la metadona es estereoselectiva afectando fundamentalmente a la unión a las proteínas plasmáticas; además, hay que considerar las grandes variaciones interindividuales consecuencia de la variabilidad en la expresión del CYP3A4. Esta estereoselectividad puede tener repercusiones a la hora del desarrollo de modelos farmacocinético-farmacodinámicos pero no se supone que tenga importancia en la monitorización para controlar el cumplimiento del tratamiento. Así, mientras algunos autores consideran que esta variabilidad no enmascara la fuerte relación entre la dosis y las concentraciones plasmáticas, siendo esta relación lineal en un amplio intervalo de dosis tanto para el racemato como para cada uno de los enantiómeros (Wolf *et al.*, 1991; Foster *et al.*, 2000), Eap *et al.* (2000) muestran que las variaciones de la concentración de l-metadona sólo se explican en un 42% por variaciones en la dosificación.

### **Modelo farmacocinético**

Tras la administración de dosis únicas la mayoría de los autores ajustan la curva de niveles plasmáticos-tiempo a un modelo bicompartimental. Sin embargo, Inturrisi *et al.* (1987) usan un modelo tricompartmental para ajustar la curva plasmática en pacientes con dolor crónico. A pesar de emplear distintos modelos, la vida media terminal es muy similar, de 26,8 horas (Wolf *et al.*, 1993) y 23 horas (Inturrisi *et al.*, 1987). Además, Rostami-Hodjegan *et al.* (1999) reseñan que la vida media es tiempo dependiente debido al proceso de autoinducción metabólica que sufre la metadona. Negrín

*et al.* (2001) también apuntan la presencia de un proceso de autoinducción en ratones indicando que se produce un aumento del aclaramiento.

#### **1.4.- CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA/RESPUESTA AL TRATAMIENTO**

Como hemos comentado anteriormente la metadona es eficaz para el tratamiento de la dependencia a opiáceos si se administra a dosis adecuadas (Bertschy, 1995). Existe una clara relación inversa entre la dosis y el riesgo de abandono de los TMM (Caplehorn y Bell, 1991). Debido a la gran variabilidad interindividual en la farmacocinética de la metadona se ha intentado repetidas veces establecer una concentración mínima eficaz, desdichadamente estos estudios se han realizado con un pequeño número de pacientes (Eap *et al.*, 2000). En algunos de estos estudios no fue posible establecer una concentración umbral (Bell *et al.*, 1990; Torrens *et al.*, 1998; Dyer *et al.*, 1999), mientras que en otros estudios se encontraron valores que varían en un amplio intervalo, de 50 a 600 ng/ml (Holmstrand *et al.*, 1978; Bell *et al.*, 1988; Cha y Pitt, 1988; Dole, 1988; Loimer y Schmid, 1992; Wolf *et al.*, 1992; Kell, 1995). La tendencia general es establecer las concentraciones en el equilibrio alrededor de 400 ng/ml, si bien, tal y como indican Eap *et al.* 2000, no hay ningún estudio que avale esta decisión. De acuerdo con un amplio estudio realizado por estos autores, la eficacia del tratamiento está relacionada con los niveles de l-metadona en sangre y por supuesto con los del racemato; las concentraciones de l-metadona deben mantenerse entre 200-300 ng/ml, si bien los mejores resultados se encuentran alrededor de 250 ng/ml. Sólo el 7% de los pacientes con niveles de l-metadona de aproximadamente 250 ng/ml no responden al tratamiento frente a un 19% cuando el nivel umbral se fija en 400 ng/ml de racemato. De hecho el 75 y 68% de los pacientes que respondieron al tratamiento presentan concentraciones de l-metadona y d,l-metadona inferiores a los respectivos niveles umbrales (Eap *et al.*, 2000). Lo que refleja el hecho contrastado de

que pacientes en TMM pueden responder a terapias de dosis bajas o concentraciones bajas. La respuesta al tratamiento puede variar debido a la variabilidad interindividual de los parámetros farmacocinéticos (variabilidad en metabolismo) y también a diferencias en parámetros farmacodinámicos (variabilidad en receptores). Además, hay que tener en cuenta que otros factores pueden contribuir de forma importante a la eficacia de la terapia tales como factores psicológicos o sociales.

#### **1.5.- FORMULACIONES DE CESIÓN PROLONGADA CONTENIENDO METADONA.**

El principal obstáculo para el éxito de los programas de mantenimiento con metadona es la propia cooperación del individuo, puesto que las formas de dosificación disponibles actualmente, suministran únicamente una dosis por día o en algunos casos las dosis semanales con el resultado de las repetidas visitas al centro de dispensación, lo que con frecuencia produce el desánimo y abandono del tratamiento por parte del paciente.

La posibilidad del uso de una forma de dosificación de cesión prolongada de metadona para el tratamiento de la adicción a opiáceos, podría ofrecer una solución al problema. Podría disminuir la frecuencia de visitas a los centros de tratamiento y también el efecto frustrante y de desaliento del paciente pero sin dejar a su cargo la dosificación.

Si bien, dentro de esta línea, muy pocos investigadores se han interesado en el tema, podemos citar a De Leede *et al.* (1979), que teniendo en cuenta el tipo de pacientes al que iba dirigido este tratamiento, elaboraron comprimidos de administración oral compuestos por metadona unida a una resina con el objeto de prevenir o al menos disminuir el uso abusivo de metadona durante el programa de mantenimiento de adictos a la heroína. Esta resina permitía una cesión más continua del fármaco, dependiendo de la

concentración de cationes en el tracto gastrointestinal, resultando así unos niveles plasmáticos más constantes.

Choulis y Abellana-Intaphan (1977), preparan comprimidos de metadona a base de tres capas erosionables empleando carbopol® 934 y acetofalato de celulosa en distintas proporciones y consiguen prolongar la cesión *in vitro* durante al menos 60 horas, aunque no parece muy justificable prolongar la cesión para una formulación destinada a la administración oral de un fármaco más de lo que fisiológicamente puede permanecer en el intestino. Los ensayos *in vivo* también estaban orientados a determinar la duración de la analgesia y según los autores lo consiguen durante periodos de más de 60 horas, si bien algunos animales murieron y otros presentaban graves efectos tóxicos. Los autores concluyen que es necesario hacer un seguimiento de niveles de metadona en sangre. La posible causa de toxicidad desde nuestro punto de vista es el uso de dosis excesivas de metadona ya que administran unos 160 mg/Kg y aunque las ratas presentan una  $t_{1/2}$  mucho más corta que los humanos, es una dosis 80 veces superior a la administrada por Gabrielsson *et al.* (1985, 1988), para estudiar la farmacocinética de la metadona en ratas, por lo tanto sólo podría justificarse dicha dosis si se pretendiera conseguir una cesión sostenida durante días, hecho bastante improbable por vía oral.

Los trabajos que acabamos de comentar estaban orientados a una reducción de las fluctuaciones plasmáticas entre dosis, pero se mantiene el requerimiento de dosis repetidas, mientras que los trabajos que vamos a comentar a continuación están orientados al mantenimiento de niveles de metadona durante periodos relativamente prolongados.

Cha y Pitt (1988) obtuvieron una cesión orden cero de l-metadona *in vitro*, en una semana aproximadamente, empleando mezclas de microesferas elaboradas con tres polímeros biodegradables, en concreto L-poliláctico

(PLLA) y poli- $\epsilon$ -caprolactona-co-L-láctico (PCL-LA) con un 85% de ácido láctico y PCL-LA con un 95% de láctico, en la proporción 41:11:48 y un tamaño de partícula de 50-500  $\mu\text{m}$ .

Destacar por último el trabajo de Delgado *et al.* (1996), que diseñaron y optimizaron una formulación de cesión sostenida de metadona base *in vitro*, para su liberación durante siete días, consistente en microesferas biodegradables usando un sólo polímero (DL-PLA) y d,l-metadona con el fin de simplificar el proceso de manufactura y limitar la cantidad de polímero a un máximo de 85% para mantener dentro de límites razonables la cantidad de microesferas a administrar. Las variables estudiadas fueron el peso molecular del polímero y el contenido en metadona. Los resultados del diseño indicaron que la cesión óptima se consigue con alto peso molecular y bajo contenido en metadona. Dos de los lotes se aproximan a la cesión ideal, ambos se elaboraron con PLA de alto peso molecular ( $M_w$ : 144 y 196 kDa) y un contenido medio de  $18,3\% \pm 1,3\%$  de metadona base. Además, el tamaño de las microesferas presenta una estrecha distribución y se encuentra en el intervalo de 5 a 35  $\mu\text{m}$  siendo, por tanto, adecuado para su administración parenteral. Posteriormente, este grupo de investigación estudió la cesión de estas microesferas *in vivo* en ratones y, tal y como se presentará en el desarrollo de esta memoria, la cesión de la metadona desde las micropartículas no permite mantener niveles adecuados (Negrín *et al.*, 2001).



## **OBJETIVOS**

## 2.- OBJETIVOS

El objetivo de este trabajo de investigación fue la elaboración y optimización de un sistema de cesión prolongada de metadona potencialmente aplicable al tratamiento de deshabituación de adictos a opiáceos.

Los objetivos a cubrir fueron:

- Establecimiento de un modelo farmacocinético para el ajuste simultáneo de las curvas de niveles séricos y en cerebro. Estimación de los parámetros farmacocinéticos de la metadona en ratones.
- Estudio de la respuesta neuronal, a través de la expresión del c-fos, tras la administración de dosis únicas. Establecimiento de la curva tiempo - respuesta y dosis - respuesta.
- Elaboración y caracterización de distintos sistemas de cesión sostenida de metadona que comprende:
  - Microesferas e implantes.
  - Optimización de la cesión *in vitro* e *in vivo*.
  - Estudio de la respuesta neuronal.
  - Estudio de las posibles correlaciones.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

### 3.- MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1.- MATERIALES

- **Principio activo: metadona base**

La metadona base fue obtenida a partir del correspondiente clorhidrato (Laboratorios Dr. Esteve S. A) mediante la adición de una base. Para ello, se disolvieron 50 g de clorhidrato de metadona en 500 ml de agua desionizada por el sistema MILLI-Q<sup>®</sup> y se alcalinizó con aproximadamente 160 ml de OHNa 1 N hasta un pH de 12 y posteriormente se dejó que la metadona base precipitara a 5°C. El sólido resultante fue separado en una placa filtrante y lavado con abundante agua fría. Para verificar el correcto lavado del producto, se realizó la prueba de los cloruros: a unos ml de agua del último lavado, se añaden unas gotas de AgNO<sub>3</sub> en medio ácido y se comprueba que no se produce ningún precipitado blanco. El producto perfectamente lavado es secado en estufa (46°C) durante 3 días. El rendimiento de obtención fue del 98%.

La solubilidad de la metadona base en agua y en tampón fosfato 0,066 M de pH 7,4, a 37°C, previamente determinada por Delgado (1995), fue de 17,7 µg/ml y 0,9 mg/ml respectivamente.

- **Material polimérico**

En la elaboración de los sistemas de cesión controlada de metadona se han utilizado polímeros derivados del ácido láctico, tanto comerciales como sintetizados en nuestro laboratorio.

Los polímeros comerciales suministrados por la casa Boehringer Ingelheim han sido: ácido poli-DL-láctico con una viscosidad intrínseca ( $v_i$ ) declarada de 0,3 dl/g (Resomer<sup>®</sup> R-203), (Resomer<sup>®</sup> R-207) de  $v_i = 1,5$  dl/g y (Resomer<sup>®</sup> R-104) de  $v_i = 0,1-0,2$  dl/g y ácido poli-DL-láctico-co-glicólico

(50:50) (Resomer<sup>®</sup> RG-502) de  $v_i = 0,2$  dl/g y (Resomer<sup>®</sup> RG-506) de  $v_i = 0,8$  dl/g.

### a) Síntesis de polímeros

El método de síntesis utilizado para la obtención de DL-PLA de diferentes pesos moleculares es el descrito por Kulkarni *et al.*, (1966), que consiste en una polimerización por apertura del anillo del correspondiente diéster cíclico: la dl-lactida (3,6-dimetil 1,4-dioxano 2,5-diona) (Aldrich).

- Síntesis de DL-PLA: el PLA de peso molecular medio en peso 122 kDa fue obtenido fijando las siguientes condiciones de reacción (Murguía *et al.*, 1992): temperatura 160°C, 0,1% de tetrafenilo de estaño (Merck) y tiempo de reacción de 2,5 horas.
- Síntesis del PEG-PLGA de 34 kDa: se sigue el método descrito por Gref *et al.* (1994). Se parte de un 70% de lactida cristalizada, 20% de glicolida y 10% de polietilenglicol 6000 (Sigma). La reacción de polimerización se lleva a cabo a una temperatura de 114°C durante 2 horas, siendo la concentración del catalizador (octanoato de estaño), de 0.2%. La composición del polímero se determina por Resonancia Magnética Nuclear de Protón (<sup>1</sup>H-RMN).

En ambos casos, los polímeros se extraen con dioxano (Merck) y se recuperan nuevamente precipitándolos con agua destilada. Se secan a vacío durante al menos 48 horas y se conservan a una temperatura de 4°C.

- Metilación de DLPLA: el método utilizado para metilar los grupos carboxílicos finales del dl-PLA (Resomer R-104) consistió en la adición de una disolución de diazometano en éter a una cierta cantidad de polímero,

dejándolo reaccionar a temperatura ambiente. Finalmente el polímero se precipita con agua y se seca a vacío.

### **b) Caracterización de los polímeros**

Los polímeros fueron caracterizados mediante la determinación de sus pesos moleculares medios y polidispersividad por cromatografía de permeación en gel (GPC) relativa a patrones de poliestireno monodisperso. Se utilizó un equipo Waters Millipore compuesto por: una bomba (Modelo 510), inyector manual (Rheodyne<sup>®</sup>), detector de índice de refracción (Modelo 410), horno calefactor para el control de temperatura de las tres columnas colocadas en serie y que permiten la resolución de pesos moleculares entre 100 y 500.000 y el programa Maxima 820 v 3.30 para la adquisición y tratamiento de datos. Las condiciones de trabajo fueron las siguientes:

- Temperatura: 31°C (detector y columnas).
- Columnas: Waters Styragel<sup>®</sup> HR 4, HR 3 y HR 1.
- Fase móvil: tetrahidrofurano (Merck) filtrado (filtros PTFE, 0,45 µm, PALL-Gelman<sup>®</sup>) y desgasificado con helio.
- Flujo: 1 ml/minuto.
- Tiempo de análisis: 45 minutos.
- Volumen de inyección: 20 µl.
- Concentración: 0,04% (m/v) patrones y 0,5% (m/v) muestras a analizar en THF.

Tanto los patrones como las muestras son filtrados (Filtros Acrodisc GHP, 0,45 µm, PALL-Gelman<sup>®</sup>) previamente a la inyección. Para calibrar el sistema se emplearon patrones monodispersos de poliestireno con pesos moleculares de: 2.800, 10.300, 102.000, 190.000, 355.000 y 710.000 (Tokio Soda, Ltd.).

### 3.2.- SISTEMAS DE CESIÓN CONTROLADA DE METADONA

- **Elaboración de microesferas**

Los diferentes lotes de microesferas fueron elaborados utilizando uno de los siguientes métodos:

- Evaporación del disolvente: Para la elaboración de microesferas conteniendo metadona base. Para ello, una solución de polímero y d,l-metadona base en diclorometano (7-20 ml) (Merck) se deja gotear sobre 800 ml de una solución acuosa al 0,1% de alcohol polivinílico (PVA, peso molecular de 30000-70000 Da, Sigma), contenida en un vaso de disolución de la USP, XXIII Rev., agitada a 8000 rpm con un homogeneizador de turbina (IKA modelo Ultraturrax T-25, cabezal tipo KR) durante 2 minutos y se continúa la agitación a 250 rpm en el aparato de disolución de la USP, XXIII Rev., a presión atmosférica y temperatura ambiente hasta evaporación total del diclorometano (4-6 horas). Dos lotes fueron preparados añadiendo una determinada cantidad de aceite (Labrafil M, 1944 CS, Cattefossè) al principio activo sobre el que se añade la disolución de polímero en diclorometano, se agita en vortex, lo que constituye la fase orgánica, y se continúa con el procedimiento anterior.

- Doble emulsión w/o/w: La primera emulsión (w/o) se obtuvo emulsificando (Sonicator<sup>®</sup> MODEL XL 2020) durante 15-20 segundos una disolución acuosa de PVA 0,5% (2 ml) conteniendo metadona base (250 mg) y dextrosa (10 mg), con la disolución del polímero (350 mg PLA 122 kDa) en diclorometano (3 ml). Esta primera emulsión es vertida gota a gota sobre 200 ml de una disolución acuosa de PVA al 0,1% bajo agitación continua con un homogeneizador (IKA modelo Ultraturrax T-25, cabezal tipo KR) durante

2 minutos a 8000 rpm, obteniéndose una segunda emulsión (w/o)/w, que es agitada a 600 rpm durante 2 horas a temperatura ambiente para evaporar el disolvente orgánico.

Las microesferas obtenidas por ambos métodos se separan por centrifugación (8000 rpm, 4°C, durante 10 minutos) y posteriormente son congeladas a -80°C y liofilizadas bajo las siguientes condiciones: temperatura del sistema: -40°C, temperatura del condensador: -54°C, vacío:  $108 \cdot 10^{-3}$  mBar durante aproximadamente 72 horas. Posteriormente se lleva a cabo una desecación secundaria durante 24 horas a 20°C. Los pesos de los lotes de microesferas oscilaron entre 1 y 3 gramos.

- **Elaboración de implantes**

Los implantes fueron preparados por compresión directa de mezclas de polímero y metadona aplicando una determinada fuerza durante 5 minutos a temperatura ambiente mediante una prensa hidráulica Carver.

- a) Implantes paralelepípedos de 3 x 2 x 1 mm: se comprimen 500 mg de mezcla con un punzón de 12 mm aplicando 5 t. Estos comprimidos fueron posteriormente cortados para obtener los implantes.
- b) Implantes cilíndricos de 6 mm: se comprimen mezclas de 26 a 70 mg aplicando 1 t de fuerza con un punzón de 6 mm.

Algunos de los lotes elaborados fueron recubiertos con una capa de polímero (PLA o PLGA) al 6%, 12% ó 25% en diclorometano y posteriormente secados.



### 3.3.- ESTUDIOS IN VITRO

- **Determinación de contenido y eficacia de incorporación**

Para la valoración del contenido de metadona en los sistemas elaborados se toman tres muestras de 30 mg de microesferas ó 3 implantes de cada uno de los lotes y se disuelven en diclorometano para posteriormente ser analizadas por espectrofotometría.

- **Ensayos de cesión**

Los ensayos de cesión in vitro se llevan a cabo en tampón fosfato 0,066 M,  $\mu=0,264$  mol/Kg, pH 7,4 y conteniendo 0,001% de Tween<sup>®</sup>80, a 37°C de temperatura.

Para ello, 40 mg de microesferas se suspenden en 100 ml de medio de cesión y con agitación magnética a 50 rpm (longitud de barra  $\approx$  2 cm), mientras que los implantes se suspenden en 50-500 ml y se mantienen sin agitación.

Los ensayos de cesión se realizan por triplicado para cada uno de los lotes elaborados. A tiempos previamente establecidos se toma una alícuota, se filtra y se repone con medio fresco, manteniéndose condiciones sumidero durante todo el ensayo.

La metadona cedida se valora por espectrofotometría tal y como se detalla más adelante.

- **Determinación del tamaño de partícula**

La caracterización granulométrica de los diferentes lotes de microesferas se realizó mediante difracción de luz láser utilizando un equipo Coulter<sup>®</sup> LS100. Una pequeña cantidad de microesferas se suspende en una disolución de PVA 0,1% y se introduce en un baño de ultrasonidos durante 30

segundos para favorecer la desagregación. El tiempo de análisis fue de 90 segundos.

- **Microscopía electrónica de barrido**

La morfología y características superficiales de las microesferas antes y después de los ensayos de cesión *in vitro* e *in vivo*, fueron estudiadas mediante microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un microscopio electrónico de barrido JEOL JSM-6300, Tokyo. Las muestras fueron recubiertas con oro/paladio bajo atmósfera de argón. Se realizan microfotografías de los campos más representativos.

- **Calorimetría diferencial de barrido**

Para caracterizar el comportamiento térmico de los polímeros así como la solubilidad de la metadona base en los mismos, se empleó la técnica de calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se obtuvieron los termogramas correspondientes a la metadona base, los polímeros y las microesferas depositando las muestras (polvo) exactamente pesadas en cápsulas de alúmina. El equipo empleado fue un calorímetro diferencial de barrido Mettler (DSC 821<sup>e</sup> Mettler Toledo). Las medidas se realizaron en atmósfera de nitrógeno empleando una cápsula vacía de referencia.

Las condiciones de análisis fueron:

- Temperatura inicial: 30°C
- Temperatura final: 200°C
- Velocidad de calentamiento: 10°C/min.
- Caudal de nitrógeno: 100 ml/min
- Resolución: < 7  $\mu$ W

- **Ensayo de degradación**

La degradación de los polímeros (DL-PLA y PLGA) de las microesferas durante los ensayos de cesión *in vitro* se llevó a cabo suspendiendo muestras de 40 mg de microesferas en el medio de cesión. Cada cierto intervalo de tiempo la muestra es retirada, filtrada y secada durante al menos 24 horas en desecador y a vacío. Las muestras desecadas fueron disueltas en tetrahidrofurano y determinado el peso molecular medio mediante GPC.

- **Métodos analíticos para la determinación de metadona *in vitro*.**

Todas las valoraciones de metadona llevadas a cabo en los ensayos *in vitro* se realizaron por espectrofotometría.

#### Determinación del contenido en metadona de los sistemas de cesión

Se realiza en diclorometano a una  $\lambda$  de 290 nm. Para obtener la recta de calibrado de metadona base en diclorometano, se utilizaron disoluciones patrones de concentraciones comprendidas entre 0,1 y 0,5 mg/ml. Las absorbancias obtenidas para las distintas concentraciones, así como los resultados del análisis de la varianza de la regresión, se recogen en las tablas 3.1 y 3.2 respectivamente. En la figura 3.1 se representa la recta de calibrado obtenida.

La ecuación de la recta de regresión obtenida es:

$$\text{Absorbancia} = 1,3821 \cdot C \text{ (mg/ml)} \quad r = 0,999$$

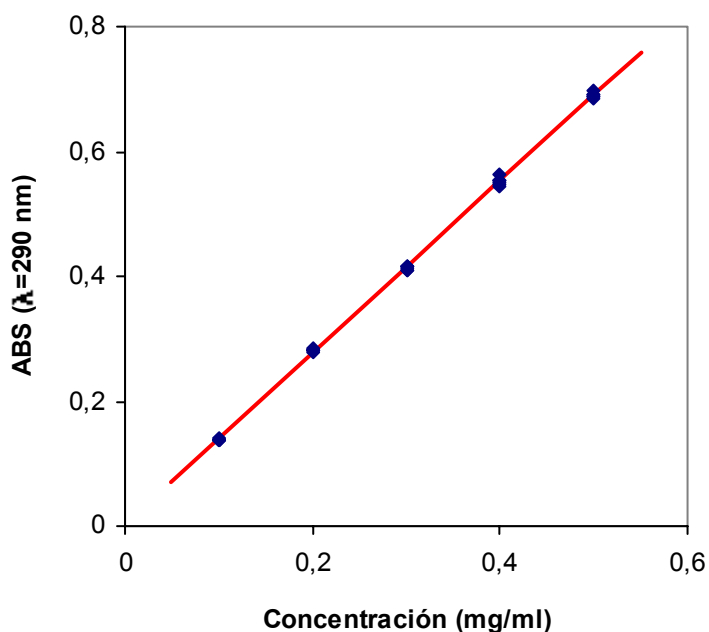
Con un coeficiente de variación (C.V.) de 1,03%.

C (mg/ml)	Absorbancias ( $\lambda=290$ nm)					
0,1	0,137	0,140	0,139	0,138	0,138	0,137
0,2	0,281	0,285	0,280	0,280	0,279	0,282
0,3	0,416	0,416	0,415	0,410	0,413	0,410
0,4	0,555	0,552	0,564	0,545	0,551	0,548
0,5	0,689	0,691	0,698	0,684	0,688	0,691

**Tabla 3.1.-** Absorbancias obtenidas con las disoluciones patrones de metadona base en diclorometano.

Origen de la variación	S.C.	g.l.	C.M.	F
Total	1,1354	29		
Regresión	1,1349	1	1,1349	
Residual	$5,18 \cdot 10^{-4}$	28	$1,82 \cdot 10^{-5} (s^2)$	
D.L.	$1,17 \cdot 10^{-4}$	3	$3,91 \cdot 10^{-5}$	2,49
Error	$3,9 \cdot 10^{-4}$	25	$1,57 \cdot 10^{-5}$	

**Tabla 3.2.-** Resultados del análisis de la varianza de la regresión de la recta de calibrado de metadona base en diclorometano.



**Figura 3.1.-** Recta de calibrado, obtenida por regresión lineal, de metadona base en diclorometano.

#### Determinación de la metadona cedida *in vitro* desde los distintos sistemas de cesión sostenida

La metadona, tanto base como clorhidrato, cedida desde los sistemas elaborados se determina en HCl 0,1 N a una  $\lambda$  de 207 nm, excepto en los lotes de microesferas elaborados incorporando labrafil, en los que la metadona base fue valorada en el medio de cesión a  $\lambda = 207$  nm.

Las absorbancias obtenidas para las distintas disoluciones patrones así como los resultados de los análisis de la varianza de la regresión para clorhidrato de metadona y metadona base en HCl 0,1 N y metadona base en medio de cesión se recogen en las tablas 3.3 - 3.8 y la representación gráfica de las distintas rectas de calibrado en las figuras 3.2-3.4.

Las ecuaciones de las rectas de regresión obtenidas son las siguientes:

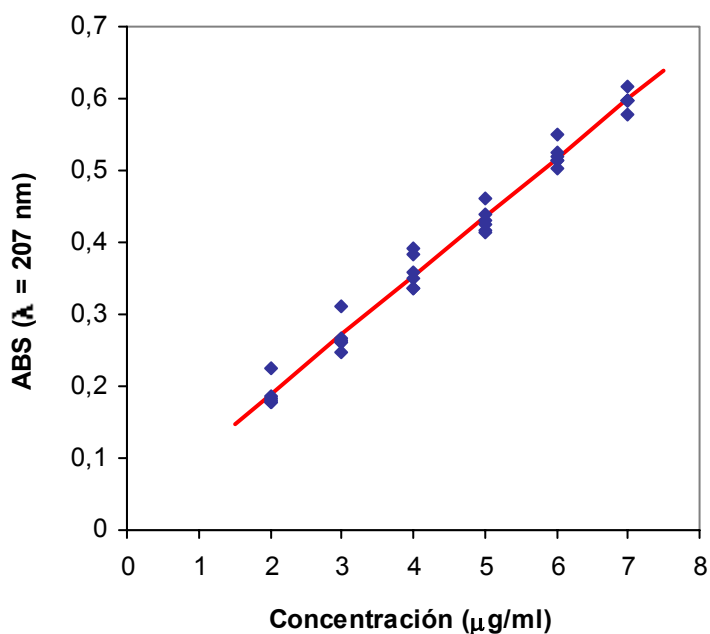
- Metadona base en HCl 0,1 N. C.V. = 4,53 %  
Absorbancia =  $0,0249 + 0,0820 \cdot C$  ( $\mu\text{g/ml}$ )  $r = 0,992$
- Clorhidrato de metadona en HCl 0,1 N. C.V. = 2,97%  
Absorbancia =  $0,0381 + 0,0733 \cdot C$  ( $\mu\text{g/ml}$ )  $r = 0,998$
- Metadona base en medio de cesión. C.V. = 3,89 %  
Absorbancia =  $0,0856 + 0,0200 \cdot C$  ( $\mu\text{g/ml}$ )  $r = 0,995$

C ( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancias ( $\lambda=207$ nm)					
2	0,226	0,177	0,180	0,183	0,185	0,177
3	0,311	0,262	0,260	0,264	0,268	0,248
4	0,391	0,383	0,337	0,357	0,349	0,337
5	0,462	0,425	0,417	0,438	0,430	0,414
6	0,549	0,514	0,514	0,524	0,520	0,502
7	0,617	0,596	0,598	0,596	0,597	0,577

**Tabla 3.3.- Absorbancias obtenidas con las disoluciones patrones de metadona base en HCl 0,1 N.**

Origen de la variación	S.C.	g.l.	C.M.	F
Total	0,7174	35		
Regresión	0,7066	1	0,7066	
Residual	$1,08 \cdot 10^{-2}$	34	$3,19 \cdot 10^{-4}(\text{s}^2)$	
D.L.	$4,48 \cdot 10^{-4}$	4	$1,12 \cdot 10^{-4}$	0,32
Error	$1,04 \cdot 10^{-2}$	30	$3,47 \cdot 10^{-4}$	

**Tabla 3.4.- Resultados del análisis de la varianza de la regresión de la recta de calibrado de metadona base en HCl 0,1N.**



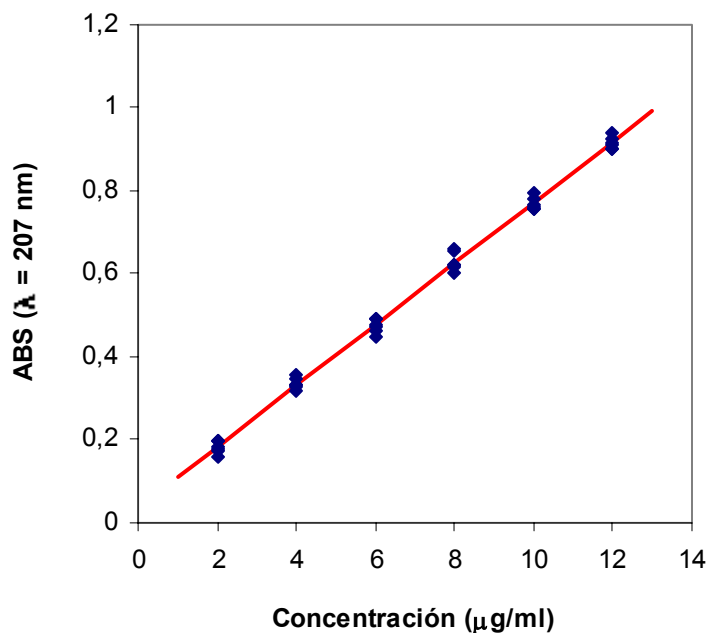
**Figura 3.2.-** Recta de calibrado, obtenida por regresión lineal, de metadona base en HCl 0,1N.

C(µg/ml)	Absorbancias ( $\lambda=207\text{nm}$ )					
2	0,197	0,183	0,175	0,161	0,197	0,179
4	0,356	0,332	0,331	0,317	0,348	0,328
6	0,478	0,493	0,463	0,470	0,493	0,447
8	0,620	0,654	0,602	0,615	0,660	0,621
10	0,757	0,781	0,763	0,765	0,797	0,757
12	0,910	0,927	0,903	0,916	0,942	0,899

**Tabla 3.5.-** Absorbancias obtenidas con las disoluciones patrones de clorhidrato de metadona en HCl 0,1 N.

Origen de la variación	S.C.	g.l.	C.M.	F
Total	2,2644	35		
Regresión	2,2553	1	2,2553	
Residual	$9,13 \cdot 10^{-3}$	34	$2,68 \cdot 10^{-4} (s^2)$	
D.L.	$3,57 \cdot 10^{-4}$	4	$8,92 \cdot 10^{-5}$	0,30
Error	$8,77 \cdot 10^{-3}$	30	$2,92 \cdot 10^{-4}$	

**Tabla 3.6.-** Resultados del análisis de la varianza de la regresión de la recta de calibrado de clorhidrato de metadona en HCl 0,1N.



**Figura 3.3.-** Recta de calibrado, obtenida por regresión lineal, de clorhidrato de metadona en HCl 0,1N.

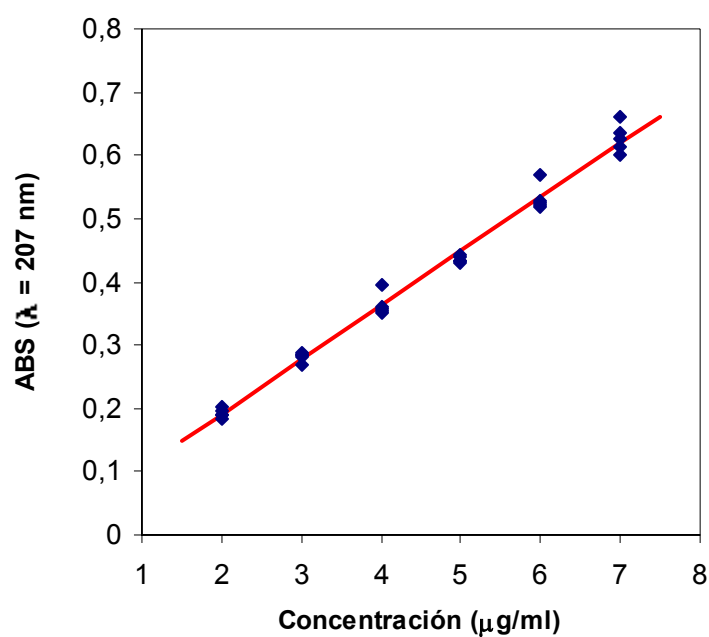


C( $\mu\text{g/ml}$ )	Absorbancias ( $\lambda=207\text{nm}$ )				
2	0,196	0,190	0,1191	0,182	0,202
3	0,289	0,285	0,268	0,282	0,285
4	0,394	0,362	0,354	0,357	0,350
5	0,442	0,430	0,432	0,440	0,432
6	0,568	0,524	0,517	0,528	0,521
7	0,660	0,613	0,600	0,627	0,636

**Tabla 3.7.-** Absorbancias obtenidas con las disoluciones patrones de metadona base en medio de cesión.

Origen de la variación	S.C.	g.l.	C.M.	F
Total	0,6482	29		
Regresión	0,6412	1	0,6412	
Residual	$6,96 \cdot 10^{-3}$	28	$2,48 \cdot 10^{-4}(\text{s}^2)$	
D.L.	$1,29 \cdot 10^{-3}$	4	$3,23 \cdot 10^{-4}$	1,37
Error	$5,66 \cdot 10^{-3}$	24	$2,36 \cdot 10^{-4}$	

**Tabla 3.8.-** Resultados del análisis de la varianza de la regresión de la recta de calibrado de metadona base en medio de cesión.



**Figura 3.4.-** Recta de calibrado, obtenida por regresión lineal, de metadona base en medio de cesión.

### 3.4.- ESTUDIOS *IN VIVO*

Los ensayos *in vivo*, que se describen a continuación, fueron previamente aprobados por el Comité de Ética de La Universidad de La Laguna.

Los experimentos fueron llevados a cabo en ratones Swiss machos (28-32 g) suministrados por el Estabulario Central de la Universidad. Los animales tuvieron libre acceso a agua y alimentos antes y durante el período experimental.

El total de ratones se subdividió en cinco grupos en función de la forma de dosificación de la metadona:

- Grupo 1: dosis única de clorhidrato de metadona en disolución para determinación de niveles en suero y cerebro.
- Grupo 2: dosis únicas de clorhidrato de metadona para el estudio de la respuesta neuronal.
- Grupo 3: dosis repetidas de clorhidrato de metadona en disolución para la determinación de niveles en suero.
- Grupo 4: microesferas de metadona base para la determinación de niveles en suero.
- Grupo 5: implantes de metadona base para la determinación de niveles en suero y cerebro así como para el estudio de la respuesta neuronal.

- **Administración subcutánea de clorhidrato de metadona en disolución**

a) **Protocolo Dosis única**: 50  $\mu$ l de una disolución de clorhidrato de metadona en cloruro sódico al 0,9% equivalente a dosis de 6 y 12 mg/kg de metadona base fueron inyectados por vía subcutánea en el lomo de los ratones del grupo 1. A tiempos preestablecidos, por cada punto de muestreo 3 animales fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de pentobarbital sódico (Normon) (200 mg/kg) y sacrificados por rotura del diafragma, procediéndose a la toma de sangre por punción cardíaca y extracción del cerebro.

b) **Protocolo para el estudio de la respuesta**: 50  $\mu$ l de una disolución de clorhidrato de metadona en cloruro sódico al 0,9% fueron inyectados por vía subcutánea en el lomo de los ratones del grupo 2, los cuales se subdividieron en dos según la dosis y experimento a realizar:

- Grupo 2.1: se administraron dosis equivalentes a 12 mg/kg, siendo los tiempos de muestreo de 0,5, 1, 2, 4, 8, 10,5 y 24 horas, para determinar el tiempo de respuesta máxima.
- Grupo 2.2: se administraron dosis equivalentes de 1, 2, 4, 8, 12 y 16 mg/kg para obtener la curva de dosis-respuesta.

Previamente a la toma de muestras, los animales (5 ratones por punto de muestreo) fueron anestesiados por inyección intraperitoneal de 200 mg/kg de pentobarbital sódico. Se accede al corazón, se extrae la sangre por punción del ventrículo izquierdo y se pasa una disolución de heparina al 10% a través del mismo. A continuación, tras practicar una incisión en la aurícula derecha, se hace pasar a través de una jeringa insertada en el mismo ventrículo izquierdo la solución fijadora de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato 0,1 M, pH 7,4 (PB), durante 5 minutos, tras lo cual se extraen los cerebros.

- c) **Protocolo Dosis repetidas**: se administran 50  $\mu$ l, por vía sc en el lomo de los ratones del grupo 3, de una disolución de clorhidrato de metadona en cloruro sódico al 0,9% equivalente a 12 mg/kg de metadona base dos veces al día durante 4 días. Tras este protocolo de administración se procedió a la inyección sc de 50  $\mu$ l de una disolución conteniendo dosis equivalentes a 6 ó 12 mg/kg de metadona base procediéndose a la toma de muestras de sangre (n=3) según se describió anteriormente.

- **Administración de los sistemas de cesión controlada de metadona**

- a) **Protocolo Microesferas:** fueron inyectadas en forma de suspensión en 50  $\mu$ l de Pluronic<sup>®</sup> al 1%, por vía subcutánea o bien por vía intraperitoneal a los ratones del grupo 4. A tiempos preestablecidos, por cada punto de muestreo, 4 animales fueron anestesiados y sacrificados, procediéndose a la toma de sangre y recogida de las microesferas remanentes en el lugar de administración.
- b) **Protocolo Implantes:** se procede al afeitado y limpieza de una pequeña zona del lomo de los animales del grupo 5 (7 por punto de muestreo), previamente anestesiados con éter dietílico (Merck), donde se inserta el implante mediante un corte que es posteriormente suturado y tratado con povidona yodada. A los tiempos de muestreo establecidos se sacrifican 3 ratones para la toma de muestras de sangre, extracción de cerebros y de implantes. Los 4 ratones restantes fueron tratados de igual forma que los del grupo 2 para el estudio de la respuesta.

- **Tratamiento de muestras para la determinación de metadona**

- a) **Sangre:** la sangre es extraída sin heparinizar, se centrifuga durante 10 minutos a 8000 rpm y 20°C y se separa el suero, que se congela a -80°C en tubos eppendorf, en espera de su posterior análisis por inmunofluorescencia de luz polarizada (FPIA).
- b) **Cerebro:** una vez extraídos se elimina el cerebelo y su posterior tratamiento dependerá del estudio a realizar.

Determinación de niveles de metadona: los cerebros son pesados, liofilizados y pulverizados. La metadona se extrae con 4 ml de PB 0,1 M bajo agitación a temperatura ambiente durante 24 horas. El sobrenadante se separa por centrifugación, se liofiliza y se resuspende

en 1 ml de agua destilada para su análisis por FPIA. El proceso descrito se repite hasta la total extracción del fármaco.

Valoración de la respuesta: Los cerebros extraídos se mantienen en la misma solución fijadora utilizada en la perfusión durante 20 horas a 4°C y posteriormente en una solución de sacarosa al 30% en PBS a 4°C hasta ser cortados en secciones coronales de 30  $\mu\text{m}$  de grosor utilizando un vibrotomo (Leica VT-1000 M). Las secciones se recogen en tampón PBS con azida sódica al 0,02% conservándose a 4°C hasta su posterior procesamiento inmunocitoquímico.

- c) **Microesferas:** las microesferas recuperadas del tejido subcutáneo son liofilizadas y posteriormente disueltas en tetrahidrofurano para determinar su peso molecular medio mediante GPC.
- d) **Implantes:** fueron retirados del tejido subcutáneo, desecados a vacío y disueltos en diclorometano para determinar el contenido de metadona remanente mediante espectrofotometría UV a 290 nm.

- **Método analítico para la determinación de metadona *in vivo***

La determinación de las concentraciones séricas y cerebrales de metadona fue llevada a cabo mediante el método de inmunoensayo de polarización de luz fluorescente utilizando un analizador TDX.

El sistema TDX utiliza una metodología de inmunoensayo de enlace competitivo en la cual el fármaco marcado con fluoresceína y el fármaco presente en la muestra compiten en su unión con el anticuerpo. Tras la excitación con luz polarizada, el sistema óptico sólo podrá medir la fluorescencia polarizada emitida por el trazador que no haya sido desplazado por el fármaco, existiendo por tanto una relación inversa entre la

concentración de fármaco en la muestra y la intensidad de la luz detectada que, además, debido a la cinética de fijación del fármaco al anticuerpo, es una relación no lineal.

El analizador TDX relaciona la polarización de muestras desconocidas con su concentración a través de una curva de calibrado que elabora automáticamente a partir de patrones de concentración conocida.

Actualmente se encuentra comercializado el Kit de reactivos (TDX<sup>®</sup> ABBOTT) para la determinación de metadona en orina, por lo que hubo que adaptar y poner a punto el método para la determinación de metadona en suero y extractos de tejido cerebral. La adaptación realizada fue una modificación del método utilizado por Dessalles *et al.* (1996). En la tabla 3.9 se muestran los parámetros utilizados en la calibración.

1.	SPL VOL	4,0	13.	UNITS	1
2.	SPL REP*	1	14.	CRV FIT	2
3.	BKG FAC	100,00	15.	MX DEV	7,0
4.	THRSHLD	200,00	16.	MN POLA*	145,0
5.	CAL VOL	4,0	17.	MN SPAN	70,0
6.	CAL REP*	3	18.	MODE	26
7.	CON A	0,00	19.	GAIN*	20
8.	CONC B	50,00	20.	MX BKG	65530
9.	CONC C	100,00	21.	MN TR*	2125
10.	CONC D	200,00	22.	C DATE	---
11.	CONC E	400,00	23.	C TIME	---
12.	CONC F	800,00			

**Tabla 3.9.-** Parámetros utilizados en la calibración. Los parámetros señalados con\* fueron modificados respecto de los utilizados por Dessalles *et al.*, (1996)

Los patrones para la realización de las curvas de calibrado se prepararon por triplicado a partir de disoluciones patrones de clorhidrato de metadona en HCl  $10^{-2}$  M diluidas (1:5) con suero de ratón, de manera que las concentraciones finales de los patrones de metadona base en suero fueran de 0, 50, 100, 200, 400 y 800 ng/ml. Para realizar las curvas de calibrado, además de los patrones, se utilizaron los reactivos incluidos en el kit TDX<sup>®</sup>.

Se realizó una curva de calibrado para cada kit de reactivos utilizado y en cada análisis de muestras fueron incluidos dos patrones de concentración media y baja como control rutinario. El volumen de muestra inyectado fue de 4  $\mu$ l.

Los criterios para considerar una curva de calibración aceptable son:

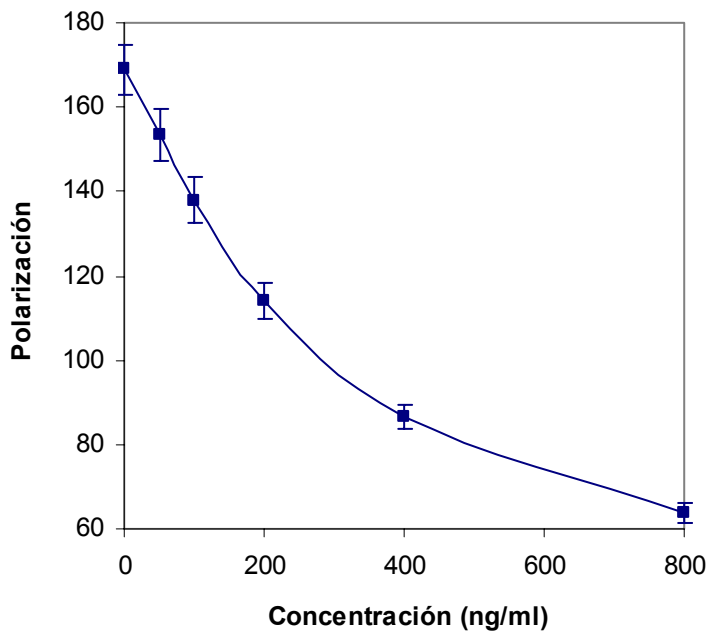
- a) Error de polarización (PERR)  $\leq \pm 2,0$  para todos los calibradores.
- b) Error cuadrático medio (RMSE)  $\leq 1,0$ .

En la figura 3.5 se representa el valor medio y la desviación típica de los patrones empleados en las curvas de calibrado realizadas con los distintos kits. Así mismo, la tabla 3.10 recoge los valores de los errores de polarización para cada patrón, estando los errores cuadráticos medios estimados entre 0,07- 0,95.

Patrón (ng/ml)	PERR
0	0
50	-1,87 – 1,14
100	-1,26 – 1,96
200	-0,81 – 1,78
400	-1,93 – 0,32
800	-0,04 – 0,63

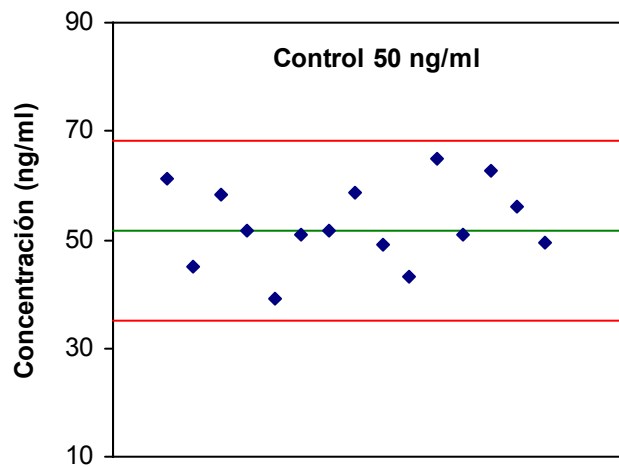
**Tabla 3.10.- Errores de polarización estimados para cada patrón.**



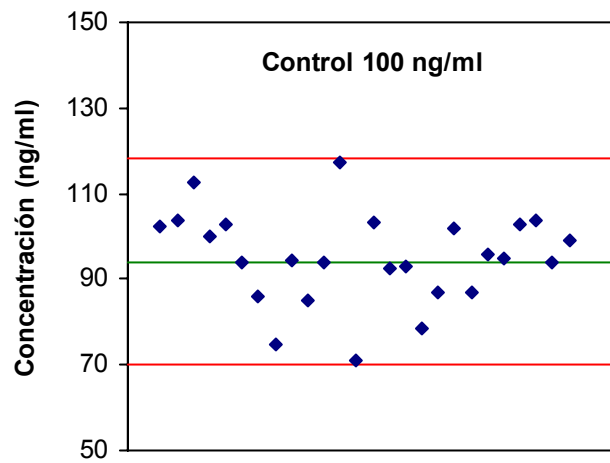


**Figura 3.5.-** Curva de calibrado de metadona en suero, representando los valores medios y desviaciones típicas de cada patrón.

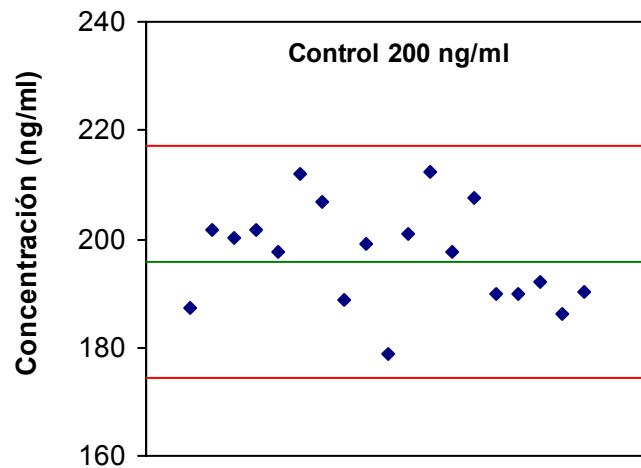
El control del método analítico se llevó a cabo introduciendo un patrón de 50, 100 ó 200 ng/ml en cada serie de muestras a analizar. En las figuras 3.6 – 3.8 se recogen las cartas de control correspondientes a estos patrones para los distintos kits de TDX empleados a lo largo de este trabajo. Los límites superior e inferior de la carta de control se establecieron en  $\pm 2$  desviaciones típicas del valor medio estimado para cada patrón.



**Figura 3.6.-** Carta de control para el patrón de 50 ng/ml.  
Media =  $52,8 \pm 2$  desviaciones típicas.



**Figura 3.7.-** Carta de control para el patrón de 100 ng/ml.  
Media =  $95,0 \pm 2$  desviaciones típicas.



**Figura 3.8.-** Carta de control para el patrón de 200 ng/ml.  
Media = 196,9  $\pm$  2 desviaciones típicas.

- **Técnicas inmunocitoquímicas para el estudio de la respuesta neuronal.**

Los estudios inmunocitoquímicos se llevaron a cabo procesando series rostrocaudales completas de secciones coronales flotantes de 30  $\mu$ m de grosor de cerebro de ratón.

Las áreas elegidas para el muestreo fueron: núcleo accumbens (rostral), corteza cingular (rostral y caudal) y caudado putamen (rostral y caudal).

**a) Técnica inmunocitoquímica para microscopía óptica**

Se realizó según el método convencional de la avidina-biotina (Hsu *et al.*, 1981).

Los pasos a seguir fueron:

- 1.- Lavar las secciones, para eliminar los restos de sacarosa, 3 veces (10 min/lavado) con una disolución de Tritón X-100 al 0,2% en PBS 0,1 M (PBS-Tx).
- 2.- Incubar 10 minutos en H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 3% en PBS-Tx, para inactivar la peroxidasa endógena del tejido y lavar 3 veces (10 min.) con PBS-Tx.
- 3.- Incubar 1 hora a temperatura ambiente (T<sup>a</sup> ambiente), en suero normal de cabra (NGS) al 5% en PBS-Tx, para bloquear los sitios de unión inespecíficos del primer anticuerpo y lavar con PBS-Tx.
- 4.- Incubar con antisuero policlonal de conejo (anticuerpo primario) contra c-Fos (1:15000 v/v) en PBS-Tx, azida sódica al 0,1% y NGS al 1% durante 16-22 horas y lavar 3 veces (10 min.) con PBS-Tx.
- 5.- Incubar (1 hora a T<sup>a</sup> ambiente) con un anti-IgG (anticuerpo secundario) de conejo biotinilado desarrollado en cabra (Vector), diluido 1:500 (v/v) en NGS al 1% en PBS-Tx y lavar 3 veces (10 min.) con PBS-Tx.
- 6.- Incubar (1 hora, T<sup>a</sup> ambiente) en estreptavidina acoplada a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Zymed Laboratories Incorporated) diluida 1:5000 (v/v) en NGS al 1% en PBS-Tx y lavar 3 veces con PB 0,1 M.
- 7.- Revelado de la actividad peroxidasa: tratar con 3-3' diamino benzidina (DAB) (Sigma) al 0,05%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,002% y sulfato amónico de níquel (Carlo Erba) (Adams, 1981), para intensificar la reacción, al 0,08% en PB al 0,1 M. Lavar con PB 0,1 M.
- 8.- Montar las secciones sobre portaobjetos gelatinizados, secar al aire, deshidratar con alcoholes de 50°, 70°, 96° y 100°, aclarar con xileno y montar con DPX (BDH).

Una vez realizado el montaje de las secciones inmunoteñidas se procedió al estudio y elección de áreas a fotografiar.

**b) Dobles marcajes inmunocitoquímicos para microscopía óptica.**

Se realizaron dobles marcajes para poner de manifiesto sobre la misma sección las siguientes parejas de antígenos:

- 1) c-fos/MOR1
- 2) c-fos/enc
- 3) c-fos/din

La detección de los antígenos se llevó a cabo según el protocolo descrito por Moratalla *et al.* (1996 a), que consistió en seguir las etapas 1 - 7 del protocolo anteriormente descrito, si bien hay que destacar que en el protocolo de la encefalina se sustituyó el uso del PBS-Tx por PBS-0,1 M y en el procedimiento para c-fos/din se invierten los pasos 4 y 12 (c).

9.- Incubar con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,6% en PBS-Tx (45 minutos) y lavar 3 veces con PBS 0,1 M y otras 3 con PBS-Tx.

10.- Incubar con disoluciones del Kit Avidin-Biotin (Vector) (30 min/incubación) al 6:1000 (v/v) en PBS-Tx para bloquear los restos de avidina y biotina. Lavar 3 veces con PBS-Tx antes y después de la segunda incubación.

11.- Repetir pasos 2 y 3.

12.- Incubar 72 horas con los siguientes anticuerpos primarios en NGS al 1% y azida sódica al 0,1% en PBS-Tx y lavar 3 veces con PBS-Tx.

- a) MOR1, anticuerpo policlonal de conejo contra el receptor  $\mu$  opioide (MOR), (cedido por el Dr. Elde) (1:15000 v/v).
- b) enc, anticuerpo policlonal de conejo contra el neuropéptido metencefalina (ENC), (cedido por el Dr. Elde) (1:2000 v/v)
- c) din, anticuerpo policlonal de conejo contra el neuropéptido dinorfina b (DIN), (cedido por el Dr. Watson) (1:10000 v/v). El uso de este anticuerpo fue invertido con el del paso 4.

13.- Repetir el paso 5.

14.- Repetir el paso 6 utilizando la estreptavidina con dilución 1:6000.

15.- Repetir el paso 7 utilizando únicamente 3-3' diamino benzidina DAB (Sigma) al 0,05% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,002%.

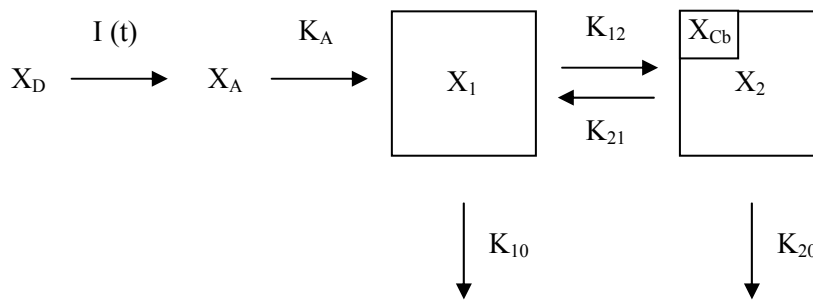
**c) Dobles marcajes inmunocitoquímicos para microscopía confocal.**

Se desarrolló un protocolo de doble marcaje inmunohistoquímico en flotación para la detección de núcleos positivos a c-Fos y células que expresan parvoalbúmina (pvb) en secciones coronales de ratón de 30 micras de grosor. Para ello se comenzó lavando el tejido con PBS-Tx y bloqueando la peroxidasa interna y los sitios no específicos según el procedimiento descrito anteriormente. En este protocolo la incubación de los anticuerpos primarios: c-fos (1:5000) y PVB (monoclonal de ratón, 1:2000) se llevó a cabo durante 48 horas a 4° C. Las secciones, previamente lavadas con PBS-Tx durante 5 minutos seis veces consecutivas, se incubaron (1 hora a T<sup>a</sup> ambiente) con anti-IgG de conejo biotilado (1:500) en NGS al 1% en PBS-Tx y se lavaron tres veces durante 5 minutos en PBS-Tx. Seguidamente se incubaron (1 hora en oscuridad) con CY2 al 1:200 (Anticuerpo secundario anti-rata, desarrollado en cabra de Pharmacia) y estreptavidina roja al 1:2000 (Molecular Probes Eugene, Oregon USA) en PBS 0,1 M. Se lavaron con PBS y se montaron en portaobjetos gelatinizados con ayuda de PBS-Glicerol (1:1) y DABCO (2%) (Sigma).

### 3.5.- ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.

- **Modelo farmacocinética**

El modelo farmacocinético propuesto consta de dos compartimentos como se muestra en el siguiente esquema:



Esquema 1

donde,  $X_D$ ,  $X_A$  y  $X_{Cb}$  son las cantidades de fármaco en el sistema de cesión, en el lugar de absorción y en el cerebro respectivamente.

El modelo para la administración por vía subcutánea de una disolución de metadona viene dado por la siguiente ecuación:

$$C_p(t) = \frac{FX_0k_a}{V_1} \left( \frac{k_{22}-k_a}{(k_a-\alpha)(k_a-\beta)} e^{-k_a t} + \frac{\alpha-k_{22}}{(k_a-\alpha)(\alpha-\beta)} e^{-\alpha t} + \frac{k_{22}-\beta}{(k_a-\beta)(\alpha-\beta)} e^{-\beta t} \right)$$

No obstante, al no disponerse de información tras la administración IV, los términos exponenciales  $k_a$ ,  $\alpha$  y  $\beta$  son indistinguibles por lo que el modelo fue expresado por la ecuación:

$$c_p = \sum_{i=1}^3 A_i e^{-\lambda_i t}$$

Puesto que  $A_1 + A_2 + A_3 = 0$  y

$$\left. \begin{aligned} \lambda_1 + \lambda_2 + \lambda_3 &= k_{11} + k_{22} + k_a \\ \lambda_1 \lambda_2 + \lambda_1 \lambda_3 + \lambda_2 \lambda_3 &= k_a (k_{11} + k_{22}) + k_{11} k_{22} - \gamma_2 \\ \lambda_1 \lambda_2 \lambda_3 &= k_a (k_{11} k_{22} - \gamma_2) \end{aligned} \right\}$$

Las combinaciones de parámetros identificables para el modelo bicompartimental con administración IV bolus son:

$$k_{11} = k_{10} + k_{12}$$

$$k_{22} = k_{20} + k_{21}$$

$$\gamma_2 = k_{12} k_{21}$$

- **Deconvolución numérica. Análisis de cesión *in vivo***

Las condiciones necesarias y suficientes para poder llevar a cabo el análisis de la absorción y de la cesión son la de linealidad, invarianza con el tiempo y convolución; es este caso podemos escribir:

$$c(s) = i(s) h(s)$$

donde  $c(s) = L\{C_p(t)\}$  es la transformada de Laplace de la respuesta, que en lo sucesivo consideraremos igual a la concentración sérica de fármaco,  $i(s)$  y  $h(s)$  las transformadas de las funciones correspondientes a la velocidad de entrada (cesión), y de la respuesta característica del sistema respectivamente (absorción – disposición).



Dividiendo ambos miembros por  $s$  y reordenando,

$$\frac{1}{s}i(s) = c(s) \frac{1}{sh(s)}$$

y tomando la antitransformada de Laplace,

$$\int_0^t i(\tau) d\tau = \int_0^t c_p(\tau) G(t-\tau) d\tau$$

siendo  $G(t) = L^{-1}\{1/(sh(s))\}$ . Vemos por lo tanto que el problema inicial, la estimación de la función de entrada mediante deconvolución, puede abordarse mediante la convolución numérica de las funciones  $c_p(t)$  y  $G(t)$  una vez obtenida esta última.

Si tenemos en cuenta que  $k_a$  no es identificable (solamente lo sería si se conociese  $F$  y  $V_1$ ), la función  $g(s)$  se debe expresar en la forma:

$$g(s) = \frac{V_1}{F K_a} \frac{\prod_{i=1}^{n+1} (\lambda_i + s)}{s \prod_{j=2}^n (k_{jj} + s)}$$

$$g(s) = \frac{V_1}{F K_a} \frac{\prod_{i=1}^{n+1} (\lambda_i + s)}{s \prod_{j=2}^n (k_{jj} + s)}$$

$g(s)$  es el cociente de dos polinomios, de grados  $n + 1$  y  $n$  numerados y denominador respectivamente. Por lo tanto lo podemos expresar como la suma de un término en  $s$  más otro término independiente más una función racional impropia, esta última expresable en forma de fracciones parciales utilizando el teorema de Heaviside.

La solución para  $G(t)$  es:

$$G(t) = \frac{V_1}{Fk_a} \left( \delta'(t) + \left( \sum_{i=1}^{n+1} \lambda_i - \sum_{j=2}^n K_{jj} + \frac{\prod_{i=1}^{n+1} \lambda_i}{\prod_{j=2}^n K_{jj}} \right) \delta(t) + \sum_{j=2}^n C_j e^{K_{jj} \cdot t} \right)$$

y por tanto,

$$\int_0^t I(\tau) d\tau = \frac{V_1}{Fk_a} \left( \left. \frac{dc_p}{d\tau} \right|_{\tau=t} + \left( \sum_{i=1}^{n+1} \lambda_i - \sum_{j=2}^n K_{jj} + \frac{\prod_{i=1}^{n+1} \lambda_i}{\prod_{j=2}^n K_{jj}} \right) c_p(t) + \sum_{j=2}^n C_j e^{-K_{jj} \cdot t} \int_0^t e^{K_{jj} \cdot \tau} c_p(\tau) d\tau \right)$$

siendo

$$C_j = \frac{R(-K_{jj})}{Q'(-K_{jj})}$$

y  $R$  y  $Q$  el resto y divisor de la función racional impropia transformada en fracciones parciales evaluada para  $-K_{jj}$ .

La función para  $G(t)$  se ha obtenido mediante programación simbólica siguiendo los pasos propuestos por Lladrés (2001) utilizando el Matemática 4.0 (Wolfran, 1988).

## **RESULTADOS**

## 4.- RESULTADOS

### 4.1.- Dosis únicas: Niveles en suero y cerebro

En las tablas 4.1 y 4.2 se recogen los niveles séricos con sus correspondientes desviaciones típicas obtenidos tras la administración subcutánea, a ratones swiss de aproximadamente 30 g de peso, de una disolución de clorhidrato de metadona equivalente a 6 y 12 mg/kg de metadona base respectivamente.

Tiempo (horas)	Concentración en suero (ng/ml)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,1	227,3	275,9	498,9	334,0	144,9
0,25	369,3	409,0	318,8	365,7	45,2
0,36	382,2	392,4	426,3	400,3	23,1
0,50	343,0	275,6	311,0	309,9	33,7
0,75	310,7	216,7	260,2	262,5	47,0
1	179,0	249,4	217,7	215,4	35,3
1,25	181,8	149,9	96,9	142,9	42,9
1,5	218,5	102,5	131,4	150,8	60,4
1,75	84,4	92,3	98,9	91,9	7,3
2	101,3	117,8	99,1	106,0	10,2
2,5	60,9	29,8	66,2	52,3	19,7
3	42,4	49,3	88,1	59,9	24,6
3,5	31,4	45,7	25,8	34,3	10,3
4	28,2	27,2	nd	18,5	16,0

nd: no detectable

**Tabla 4.1.-** Concentraciones séricas y desviaciones típicas obtenidas tras la administración subcutánea de 6 mg/kg de metadona base a ratones de 30 g.

Tiempo (horas)	Concentración en suero (ng/ml)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,25	988,6	1100,9	456,8	848,8	344,1
0,5	798,9	764,7	800,0	787,9	20,1
0,75	446,3	633,5	634,3	571,4	108,3
1	328,0	327,7	283,4	313,0	25,6
2	283,9	271,0	198,4	251,1	46,1
3	162,9	161,5	151,8	158,7	6,0
4	116,5	162,9	107,1	128,8	29,9
5	52,6	39,1	40,1	43,9	7,5
6	30,8	69,2	38,9	46,3	20,2

**Tabla 4.2.-** Concentraciones séricas y desviaciones típicas obtenidas tras la administración subcutánea de 12 mg/kg de metadona a ratones de 30 g.

Los datos obtenidos se ajustaron por regresión no lineal a una función triexponencial empleando el programa Matemática 4.0 quedando definida su cinética en suero por la siguiente expresión:

$$C_s = -(A_2 + A_3) e^{-\lambda_1 t} + A_2 e^{-\lambda_2 t} + A_3 e^{-\lambda_3 t}$$

Las curvas ajustadas a esta función triexponencial para ambas dosis se muestran en la figura 4.1. y en las tablas 4.3 y 4.4 se recogen las estimadas de los parámetros y los resultados del análisis de la varianza de la regresión, respectivamente, para la dosis de 6 mg/kg. Estos mismos resultados se recogen en las tablas 4.5 y 4.6 para la dosis de 12 mg/kg.

Parámetro	Estimadas	límites de confianza (95%)	
A <sub>2</sub> (ng/ml)	326,9	-235,1	888,9
A <sub>3</sub> (ng/ml)	276,8	-597,7	1151,3
λ <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	9,772	1,826	17,72
λ <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	1,948	-4,346	8,24
λ <sub>3</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,558	-0,45	1,57

**Tabla 4.3.-** Estimadas de los parámetros de la curva de concentración sérica - tiempo tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de metadona.

Origen de variación	S.C.	g.l.	C.M.	F
Modelo	2,288 · 10 <sup>6</sup>	5	45758	21,81
Error	90235,4	43	2098,5	
Total	787093	47		

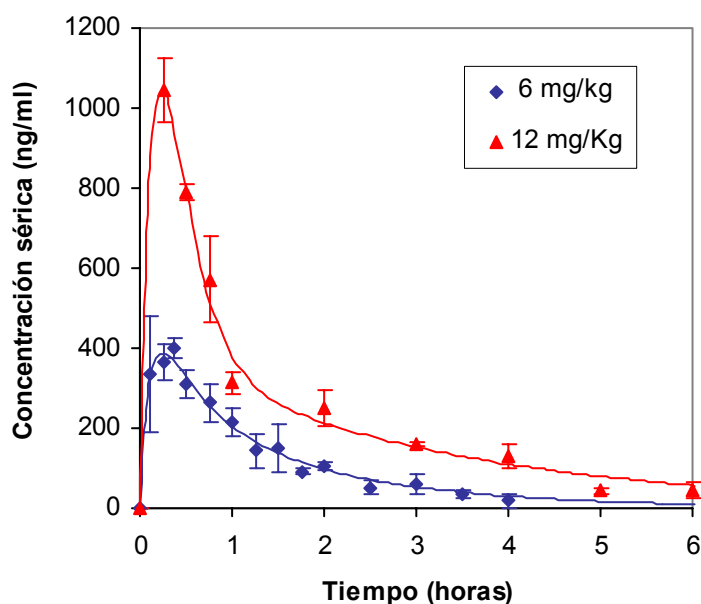
**Tabla 4.4.-** Análisis de la varianza de la regresión de la curva concentración sérica de metadona-tiempo tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de metadona.

Parámetro	Estimadas	límites de confianza (95%)	
A <sub>2</sub> (ng/ml)	7689,1	-170606	185984
A <sub>3</sub> (ng/ml)	407,9	118,4	697,5
λ <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	5,501	-12,04	23,04
λ <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	4,160	-9,308	17,63
λ <sub>3</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,3288	0,1080	0,5496

**Tabla 4.5.-** Estimadas de los parámetros de la curva de concentración sérica - tiempo tras la administración subcutánea de una dosis de 12 mg/kg de metadona.

Origen de variación	S.C.	g.l.	C.M.	F
Modelo	$5,616 \cdot 10^6$	5	$1,123 \cdot 10^6$	347,0
Error	67959,1	21	3236,2	
Total	$2,574 \cdot 10^6$	25		

**Tabla 4.6.-** Análisis de la varianza de la regresión de la curva concentración sérica de metadona-tiempo tras la administración subcutánea de una dosis de 12 mg/kg de metadona.



**Figura 4.1.-** Perfiles de las curvas ajustadas al modelo bicompartimental propuesto y las concentraciones medias con sus desviaciones típicas obtenidas tras la administración de dosis únicas de 6 y 12 mg/kg.

En las tablas 4.7 y 4.8 se muestran las concentraciones de metadona en suero y cerebro, determinadas simultáneamente, tras la administración de una dosis de 6mg/kg por vía subcutánea, respectivamente. En las tablas 4.9 y 4.10 se recogen los parámetros estimados y el análisis de la varianza

respectivamente, correspondientes al ajuste simultáneo de ambas curvas al modelo bicompartimental propuesto.

Tiempo (horas)	Concentración en suero (ng/ml)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,25	489,1	406,5	386,2	427,3	54,5
0,5	341,1	328,5	340,3	336,6	7,05
1	269,1	134,9	181,7	195,2	67,9
2	58,8	110,9	85,5	85,0	26,1
3	63,6	70,2	53,8	62,5	8,50
4	43,1	42,2	20,2	35,2	13,0
5	16,9	19,5	nd	18,2	1,80

nd: no detectable

**Tabla 4.7.-** Concentraciones séricas y desviaciones típicas obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de metadona a ratones de 30 g.

Tiempo (horas)	Concentración en cerebro (ng/g)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,25	1547,5	1150,9	929,8	1209,4	313,0
0,5	893,4	1022,8	1237,9	1051,3	174,0
1	613,7	513,8	710,3	612,6	98,3
2	158,9	297,6	160,6	205,7	79,6
3	74,4	81,6	61,8	72,6	10,0
4	96,4	93,5	34,0	74,6	35,3
5	18,9	20,7	nd	13,2	11,4

nd: no detectable

**Tabla 4.8.-** Concentraciones en cerebro y desviaciones típicas obtenidas tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de metadona a ratones de 30 g.



Parámetro	Estimadas	límites de confianza (95%)	
A <sub>2</sub> (ng/ml)	615,2	158,7	1071,7
A <sub>3</sub> (ng/ml)	31,78	-373,5	437,8
A <sub>4</sub> (ng/g)	1873,3	1188,5	2558,1
A <sub>5</sub> (ng/g)	36,94	-522,9	596,8
λ <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	8,776	1,415	16,14
λ <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	1,186	0,211	2,161
λ <sub>3</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,0550	-3,064	3,174

**Tabla 4.9.-** Estimadas de los parámetros de las curva de concentración en suero y cerebro tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de metadona.

Origen de variación	S.C.	g.l.	C.M.	F
Modelo	9,726. 10 <sup>6</sup>	7	1,389. 10 <sup>6</sup>	124,4
Error	312701	28	11167,9	
Total	5,854. 10 <sup>6</sup>	34		

**Tabla 4.10.-** Análisis de la varianza de la regresión correspondiente al ajuste simultáneo de las curva de concentraciones en suero y cerebro tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de metadona.

#### 4.2.- Dosis repetidas: Niveles séricos

En las tablas 4.11 y 4.12 se recogen los niveles séricos con sus correspondientes desviaciones típicas obtenidos tras la administración subcutánea de una disolución de clorhidrato de metadona equivalente a 6 ó 12 mg/kg de metadona base a ratones swiss de aproximadamente 30 g de peso que han sido previamente sometidos a un tratamiento de 12 mg/kg de metadona cada 12 horas durante cuatro días consecutivos.

Tiempo (horas)	Concentración en suero (ng/ml)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,1	454,3	341,3	675,5	490,4	170,0
0,25	484,0	421,1	463,7	456,3	32,1
0,36	364,7	278,9	315,7	319,8	43,1
0,5	274,0	307,7	254,4	278,7	27,0
0,75	157,5	164,8	121,4	147,9	23,2
1	88,3	100,0	148,9	112,4	32,1
1,25	100,2	101,7	351,3	184,4	144,5
1,5	82,3	113,7	48,3	81,4	32,7
1,75	70,0	79,3	59,5	69,6	9,90
2	59,7	36,4	64,8	53,6	15,1
2,5	24,1	44,1	55,4	41,2	15,8
3	32,5	38,5	26,9	32,6	5,8

**Tabla 4.11.-** Concentraciones séricas y desviaciones típicas obtenidas tras la administración subcutánea de 6 mg/kg de metadona a ratones de 30 g tras la administración durante cuatro días consecutivos de 12 mg/kg de metadona cada 12 horas.

Tiempo (horas)	Concentración sérica (ng/ml)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,1	767,0	756,7	655,4	726,4	61,7
0,25	799,5	714,1	887,0	800,2	86,5
0,36	721,9	1004,5	766,3	830,9	152,0
0,5	585,3	739,9	555,1	626,8	99,1
0,75	391,9	399,6	487,9	426,5	53,3
1	246,0	290,6	287,9	274,8	25,0
1,25	302,2	220,4	214,0	245,5	49,2
1,5	195,4	176,7	172,4	181,5	12,3
1,75	134,1	120,2	132,9	129,1	7,7
2	91,6	100,2	80,1	90,6	10,1
2,5	63,4	92,9	63,9	73,4	16,9
3	34,2	59,1	50,5	47,9	12,7
3,5	26,0	36,4	20,7	27,7	8,0
4	32,1	30,1	24,8	29,0	3,7
4,5	nd	nd	0,39	0,13	0,23
5	21,2	19,6	10,0	17,0	6,0
5,5	35,7	nd	nd	11,9	20,6
6	nd	nd	nd	-	-

nd: no detectable

**Tabla 4.12.-** Concentraciones séricas y desviaciones típicas obtenidas tras la administración subcutánea de 12 mg/kg de metadona a ratones de 30 g tras la administración durante cuatro días consecutivos de 12 mg/kg de metadona cada 12 horas.

Las curvas ajustadas a la función triexponencial para ambas dosis se muestran en la figura 4.2, y en las tablas 4.13 y 4.14 se recogen las estimadas de los parámetros y los resultados del análisis de la varianza de la regresión, respectivamente, para la dosis de 6 mg/kg. Estos mismos resultados se recogen en las tablas 4.15 y 4.16 para la dosis de 12 mg/kg.

Parámetro	Estimadas	límites de confianza (95%)	
A <sub>2</sub> (ng/ml)	13637,2	-6,38·10 <sup>6</sup>	6,41·10 <sup>6</sup>
A <sub>3</sub> (ng/ml)	223,1	-135,0	581,3
λ <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	7,565	-126,5	141,6
λ <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	7,003	-120,9	134,9
λ <sub>3</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,7051	-0,2630	1,673

**Tabla 4.13.-** Estimadas de los parámetros de la curva de concentración sérica - tiempo tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de metadona a ratones previamente tratados con 12mg/kg cada 12 horas durante 4 días.

Origen de variación	S.C.	g.l.	C.M.	F
Modelo	2,145·10 <sup>6</sup>	5	428956	158,7
Error	81093,1	30	2703,1	
Total	999074	34		

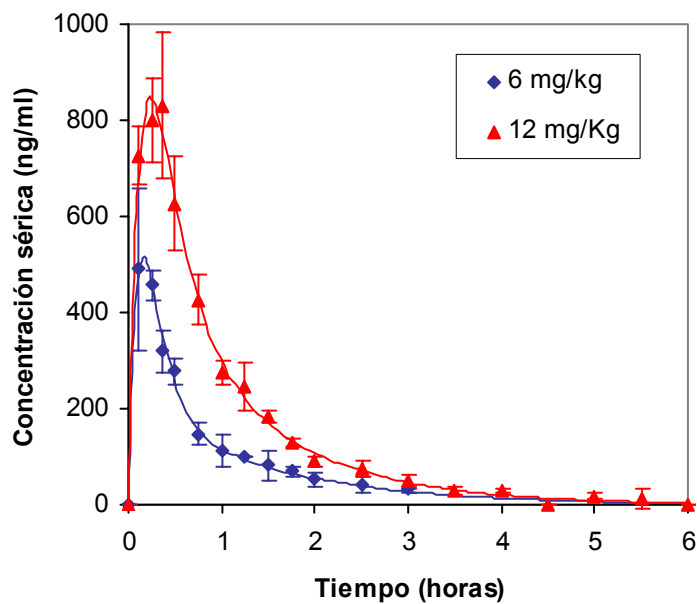
**Tabla 4.14.-** Análisis de la varianza de la regresión de la curva concentración sérica de metadona-tiempo tras la administración subcutánea de una dosis de 6 mg/kg de metadona a ratones previamente tratados con 12mg/kg cada 12 horas durante 4 días.

Parámetro	Estimadas	límites de confianza (95%)	
A <sub>2</sub> (ng/ml)	2546,2	-12306,9	17399,3
A <sub>3</sub> (ng/ml)	567,0	-184,2	1318,2
λ <sub>1</sub> (h <sup>-1</sup> )	6,615	-1,994	15,22
λ <sub>2</sub> (h <sup>-1</sup> )	3,802	-4,144	11,75
λ <sub>3</sub> (h <sup>-1</sup> )	0,8366	0,2340	1,439

**Tabla 4.15.-** Estimadas de los parámetros de la curva de concentración sérica - tiempo tras la administración subcutánea de una dosis de 12 mg/kg de metadona a ratones previamente tratados con 12mg/kg cada 12 horas durante 4 días.

Origen de variación	S.C.	g.l.	C.M.	F
Modelo	$7,888 \cdot 10^6$	5	$1,578 \cdot 10^6$	581,26
Error	124879,0	46	2714,8	
Total	$4,376 \cdot 10^6$	50		

**Tabla 4.16.-** Análisis de la varianza de la regresión de la curva concentración sérica de metadona-tiempo tras la administración subcutánea de una dosis de 12 mg/kg de metadona a ratones previamente tratados con 12mg/kg cada 12 horas durante 4 días.



**Figura 4.2.-** Perfiles de las curvas ajustadas al modelo triexponencial propuesto y las concentraciones medias con sus desviaciones típicas obtenidas tras la administración de 6 y 12 mg/kg a ratones previamente tratados con 12mg/kg cada 12 horas durante 4 días.

### 4.3.- ESTUDIO DE LA RESPUESTA NEURONAL

- **Evidencia de la activación de la expresión de c-fos por metadona**

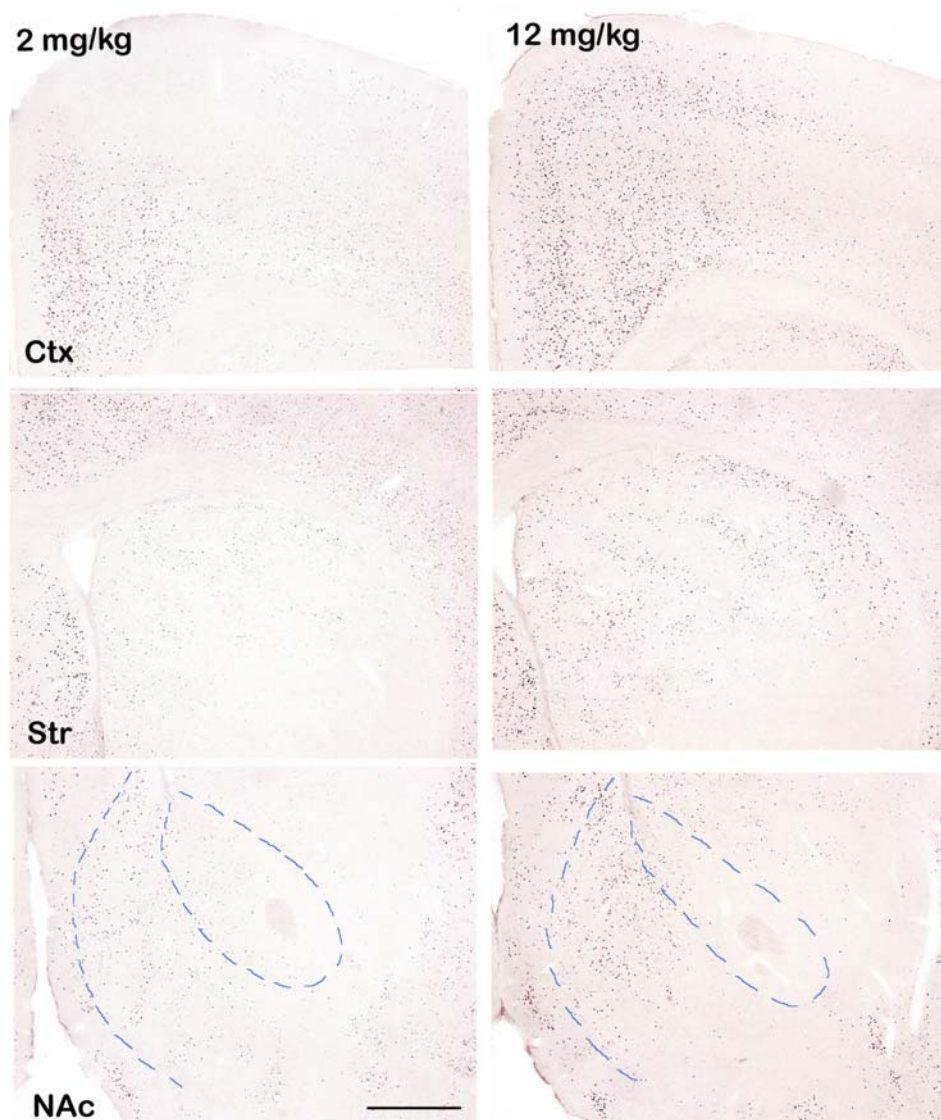
En la figura 4.3 se muestran las imágenes obtenidas de cortes coronales de cerebro de ratón (30 $\mu$ m de espesor) correspondientes a las regiones: corteza cingular, estriado y núcleo accumbens, tras la administración de dosis únicas de clorhidrato de metadona por vía subcutánea.

- **Patrón de distribución de c-fos en el estriado inducido por metadona**

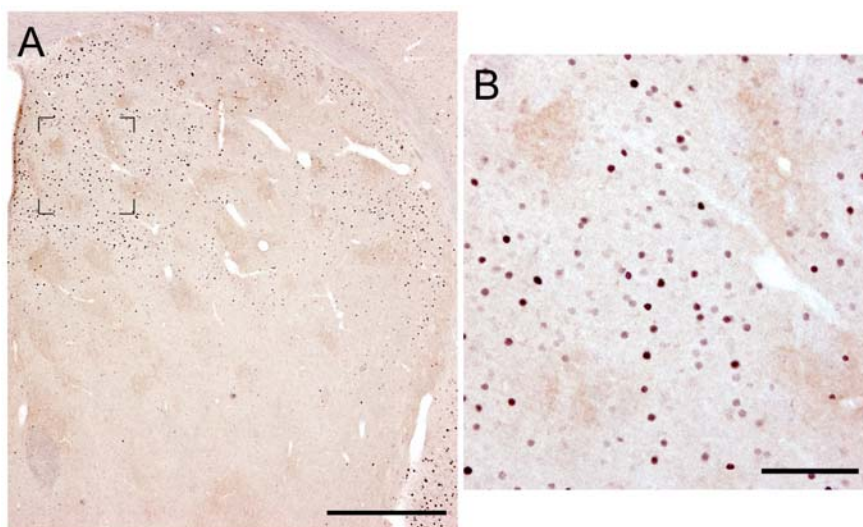
La figura 4.4 muestra las imágenes resultantes de la reacción de doble marcaje para c-fos / MOR1 en estriado para estudiar la distribución anatómica del c-fos inducido por metadona en los distintos compartimentos del estriado (estriosomas y matriz). El c-fos se reveló en negro y se ilustra aquí mediante puntos, indicativos de su localización nuclear. El receptor MOR1 se reveló en marrón y se utilizó como marcador de los estriosomas. Como podemos observar el c-fos se induce fuera de los estriosomas.

- **Fenotipo de las neuronas estriatales que responden a la metadona**

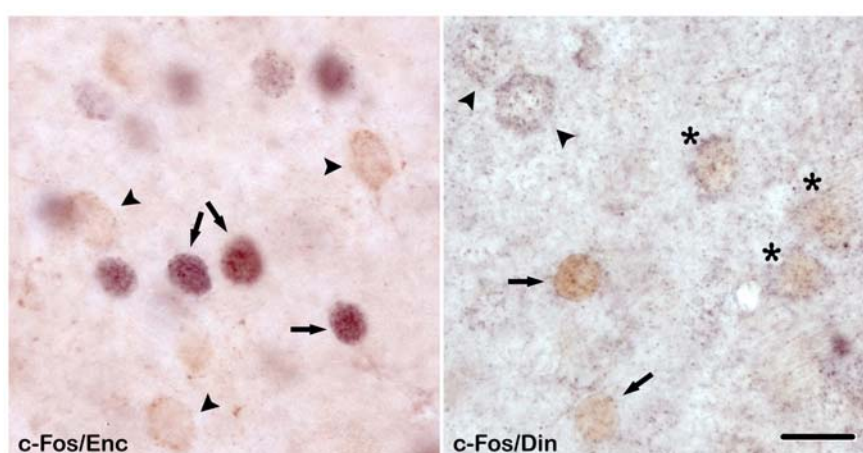
En la figura 4.5 se muestran las imágenes obtenidas con dobles marcajes para microscopía óptica para las parejas de antígenos c-fos / enc y c-fos / din. Nótese que c-fos se induce preferentemente en las neuronas que expresan dinorfina, que además son las neuronas que forman la vía directa o estriónígrica. En ninguna ocasión se detectó c-fos en células positivas para encefalina (marcador de las neuronas de la vía indirecta).



**Figura 4.3.-** Microfotografías de la inmunotinción con c-Fos de rodajas cerebrales de ratón mostrando corteza cingular, estriado y núcleo accumbens. Cortes (30  $\mu\text{m}$  de grosor) de cerebro de ratón la expresión de c-fos se indujo con dosis de 2 y 12 mg/kg de metadona base. Barra de calibrado = 500  $\mu\text{m}$ .



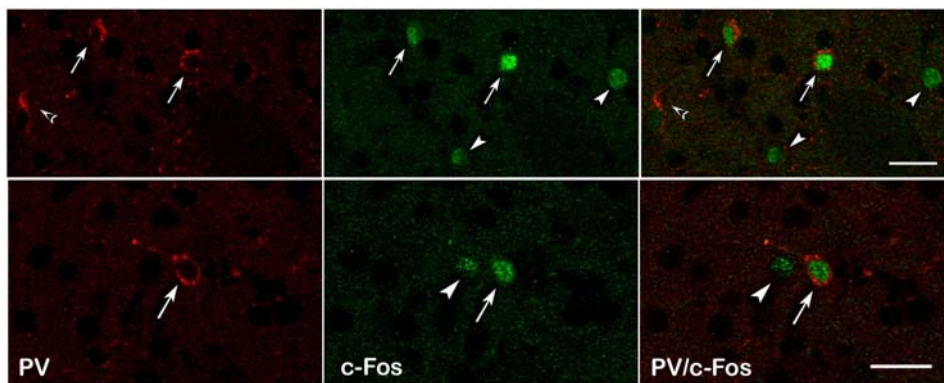
**Figura 4.4.-** Microfotografías a gran aumento que ilustran la distribución simultánea de c-fos inducido por metadona y de los estriosomes, en el estriado de ratón. Doble inmunotinción con c-fos (revelado en negro) y con MOR1 (marcador de los estriosomes, revelado en marrón). En B se muestra un detalle de A. Barras de calibrado: A = 500 µm, B = 100 µm.



**Figura 4.5.-** Microfotografías a gran aumento que ilustran la inducción de c-fos en las neuronas dinorfinérgicas. Imágenes de dobles marcajes inmunocitoquímicos con c-fos y encefalina (marcador de las neuronas estriatopalidales) o con c-fos y dinorfina (marcador de las neuronas estriatonigrales). Barra de calibrado = 20 µm.



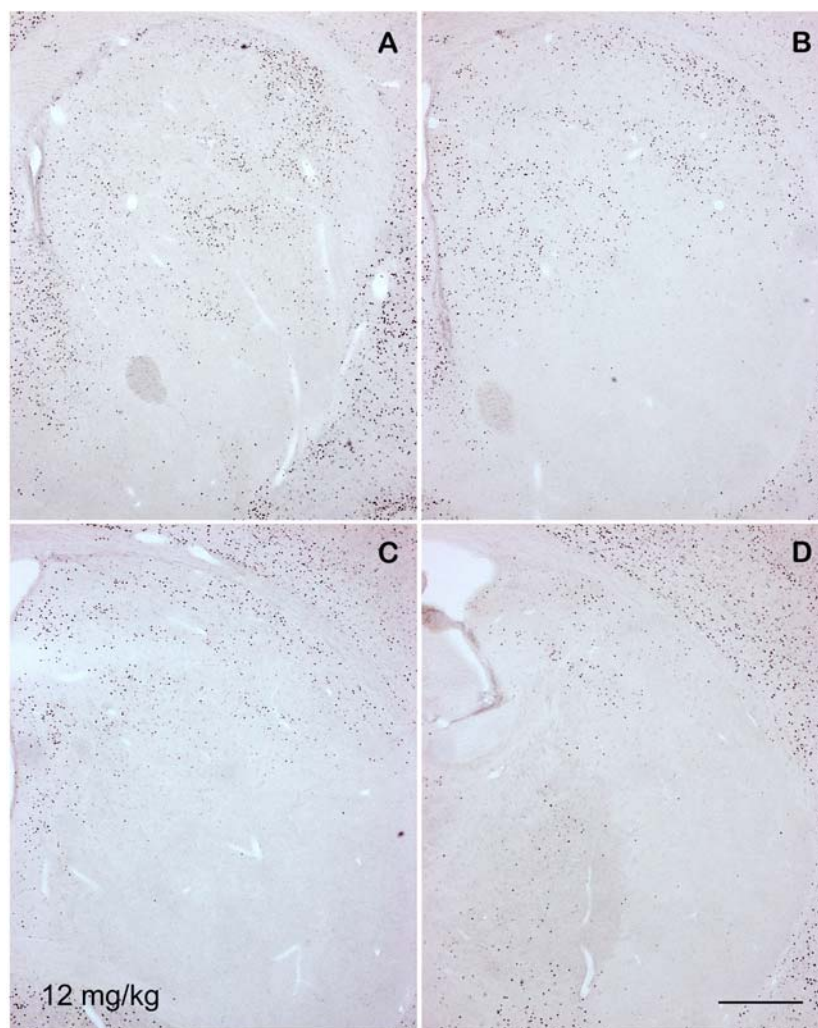
La figura 4.6 recoge las imágenes obtenidas con dobles marcajes para microscopía confocal correspondiente a la pareja c-fos / pbv. La parvoalbúmina es un marcador de una clase de interneuronas. Nuestros resultados indican que algunos núcleos de c-fos están en estas neuronas.



**Figura 4.6.-** Microfotografías a gran aumento obtenidas con un microscopio confocal donde se ilustran diversos ejemplos de colocalización de c-fos en neuronas pavoalbúmina positivas. Obsérvese que no todas las neuronas PV colocalizan con c-fos y viceversa. En todos los casos la PV se muestra en rojo y c-fos en verde. Barra de calibrado = 25  $\mu$ m.

- **Curva Tiempo - Respuesta (c-fos)**

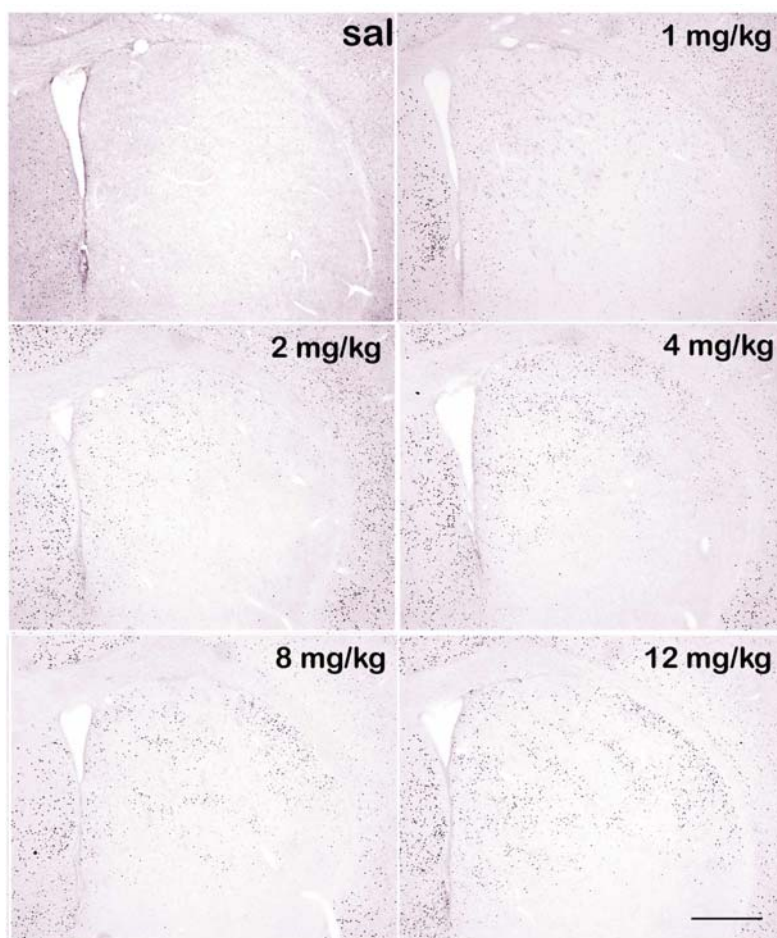
En la figura 4.7 se muestran los resultados de la reacción inmunohistoquímica para c-fos en estriado después de 1 hora de la inyección subcutánea de 12 mg/kg de metadona base.



**Figura 4.7.-** Distribución estriatal de la expresión de *c-fos* inducida por metadona. Imágenes del estriado en avance rostrocaudal teñidas con un anticuerpo contra *c-Fos*. Cortes (30 $\mu$ m de grosor) de cerebro de ratón. Cada punto negro muestra el núcleo de una neurona que responde al tratamiento con metadona mediante la inducción de *c-fos*. Dosis de 12 mg/kg de metadona base. Barra de calibrado = 500  $\mu$ m.

- **Curva Dosis - Respuesta**

En la figura 4.8 se muestran los resultados de la reacción inmunohistoquímica obtenidos para c-fos en estriado tras la administración de distintas dosis de clorhidrato de metadona equivalentes a dosis de metadona base en el intervalo de 1 a 12 mg/kg para un tiempo prefijado de una hora.



**Figura 4.8.-** Incremento de la expresión de c-fos con la dosis de metadona. Microfotografías que ilustran tinciones inmunohistoquímicas con el anticuerpo c-Fos en rodajas estriatales de ratones tratados con diferentes dosis de metadona. Cortes (30  $\mu$ m de grosor). Barra de calibrado = 500  $\mu$ m.

#### 4.4.- MICROESFERAS

La nomenclatura elegida para denominar a los diferentes lotes de microesferas incluye letras minúsculas, mayúsculas, superíndices y subíndices. De izquierda a derecha la primera es la letra “m” minúscula que indica “microesferas”, a continuación se designa al polímero empleando una “L” (si se trata de PLA), “G” (si se trata de PLGA) o “PEG-G” (si se trata de PEG-PLGA), indicando el superíndice el porcentaje empleado y el subíndice el peso molecular medio en peso. A continuación, y seguido de un guión, se emplea la “M” de metadona, el superíndice indica el porcentaje empleado y el subíndice “B” indica metadona base, seguido de un guión, el nombre de cualquier aditivo extra empleado en la elaboración con superíndice para designar la cantidad en volumen ( $\mu\text{l}$ ) del aditivo empleado. A modo de ejemplo el lote  $m\text{-L}_{230}\text{-M}_{\text{B}}^{50}\text{-labrafil}^{400}$  sería microesferas elaboradas con PLA 230 kDa y metadona base al 50% incorporando 400  $\mu\text{l}$  de aceite Labrafil®.

- **Elaboración y caracterización**

Se elaboraron 11 lotes de microesferas con distintos polímeros derivados del ácido poliláctico. El método de elaboración fue el de evaporación del disolvente excepto para uno de los lotes en el que fue empleado el método de doble emulsión. Los aspectos diferenciales en la elaboración de los lotes, así como las características de las microesferas obtenidas incorporando, metadona base se recogen en la tabla 4.17.

Lote	Polímero	Mw (kDa)	polímero (mg/ml)	Met. base %	R.I. (%)	dmv ( $\mu$ m)
m-L <sub>230</sub> - M <sub>B</sub> <sup>24,4</sup>	PLA	230	120	24,4	96,7	22,9
m-L <sub>230</sub> - M <sub>B</sub> <sup>30</sup>	PLA	230	120	30	98,7	21,7
m-L <sub>230</sub> - M <sub>B</sub> <sup>40</sup>	PLA	230	180	40	90,1	34,1
m-L <sub>230</sub> - M <sub>B</sub> <sup>50</sup>	PLA	230	180	50	100	20,0
m-L <sub>5,9</sub> - M <sub>B</sub> <sup>30</sup>	PLA	5,9	200	30	80,3	6,32
m-G <sub>96</sub> - M <sub>B</sub> <sup>30</sup>	PLGA	96	105	30	99,0	14,8
m-PEG - G <sub>34</sub> - M <sub>B</sub> <sup>30</sup>	PEG-PLGA	34	120	30	38,9	6,77
m-L <sub>122</sub> - M <sub>B</sub> <sup>41</sup> - dextrosa *	PLA	122	117	41	83,8	32,8
m-H <sub>3</sub> COOC - L <sub>5,9</sub> - M <sub>B</sub> <sup>30</sup>	PLA-COOCH <sub>3</sub>	5,9	300	30	9,57	----
m-L <sub>230</sub> - M <sub>B</sub> <sup>50</sup> - labrafil <sup>400</sup>	PLA	230	100	50	87,4	22,9
m-L <sub>230</sub> - M <sub>B</sub> <sup>24,4</sup> - labrafil <sup>200</sup>	PLA	230	100	24,4	83,4	26,1

\* Elaboradas por el método de doble emulsión.

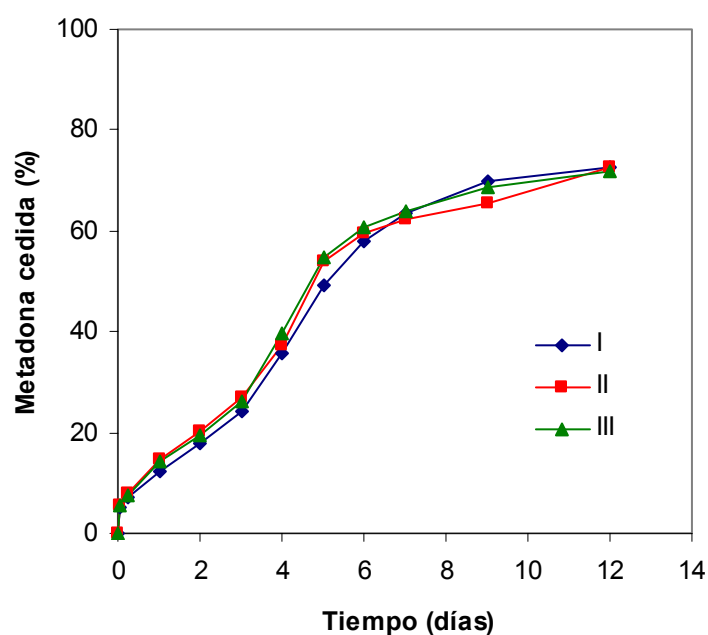
**Tabla 4.17.-** Características de los lotes de microesferas elaborados por el método de evaporación del disolvente: tipo de polímero, peso molecular medio en peso, concentración en la fase orgánica, porcentaje teórico de metadona base (Met. base), rendimiento de incorporación (R.I.) y diámetro medio en volumen (dmv).

- **Ensayos de cesión in vitro**

Las cantidades y el porcentaje de metadona cedidos desde estos lotes de microesferas se muestran en las tablas 4.18-4.27 y figuras 4.9-4.18 respectivamente exceptuando el lote m-H<sub>3</sub>COOC - L<sub>5,9</sub> - M<sub>B</sub><sup>30</sup> que no fue ensayado *in vitro* debido al bajo rendimiento de incorporación obtenido.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,48	0,54	0,55	0,52	0,04
0,25	0,67	0,76	0,74	0,73	0,05
1	1,20	1,40	1,38	1,32	0,11
2	1,70	1,93	1,89	1,84	0,12
3	2,34	2,59	2,53	2,49	0,13
4	3,46	3,58	3,83	3,62	0,19
5	4,74	5,19	5,27	5,07	0,28
6	5,60	5,73	5,86	5,73	0,13
7	6,12	6,02	6,16	6,10	0,07
9	6,73	6,30	6,63	6,56	0,22
12	6,99	7,00	6,92	6,97	0,04

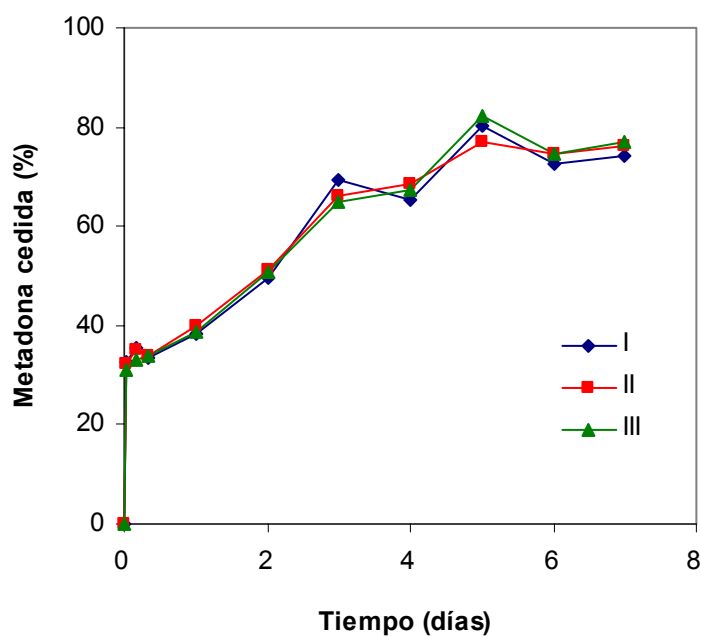
**Tabla 4.18.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{24,4}$  (PLA 230 kDa, 24,11% de incorporación, 9,64 mg de metadona en la muestra).



**Figura 4.9.-** Cesión *in vitro* de metadona desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{24,4}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , agitación 50 rpm, 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	3,87	3,81	3,66	3,78	0,11
0,17	4,20	4,16	3,91	4,09	0,15
0,333	3,96	4,01	3,99	3,99	0,02
1	4,55	4,72	4,60	4,62	0,09
2	5,86	6,08	6,03	5,99	0,12
3	8,23	7,83	7,70	7,92	0,27
4	7,75	8,12	7,99	7,95	0,19
5	9,51	9,10	9,74	9,45	0,32
6	8,61	8,81	8,83	8,75	0,12
7	8,78	9,00	9,11	8,97	0,17

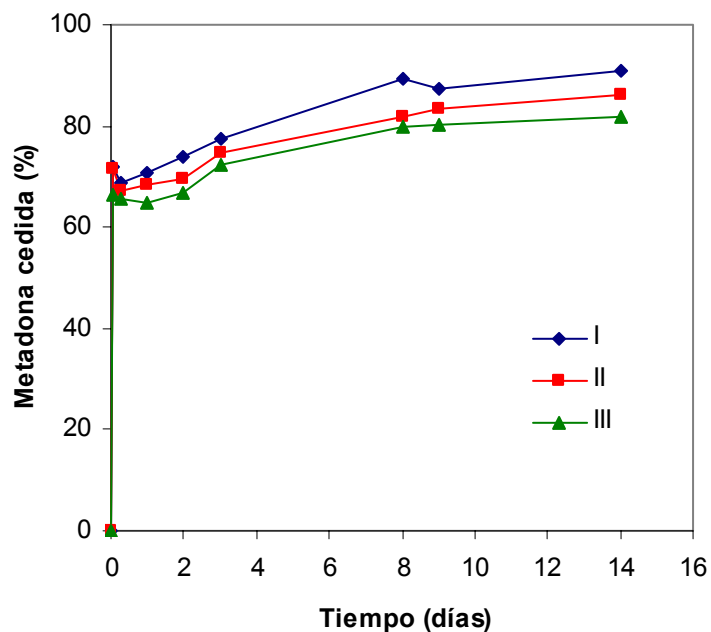
**Tabla 4.19.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{30}$  (PLA 230 kDa, 29,6% de incorporación, 11,84 mg de metadona en la muestra).



**Figura 4.10.-** Cesión *in vitro* de metadona desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{30}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween®80,  $\mu=0,264$ , agitación 50 rpm, 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	10,39	10,28	9,59	10,09	0,44
0,25	9,91	9,69	9,44	9,68	0,24
1	10,21	9,87	9,37	9,81	0,42
2	10,67	10,02	9,61	10,10	0,53
3	11,17	10,76	10,44	10,79	0,37
8	12,89	11,81	11,51	12,07	0,73
9	12,56	12,01	11,56	12,05	0,50
14	13,11	12,40	11,77	12,43	0,67

**Tabla 4.20.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{40}$  (PLA 230 kDa, 36,03% de incorporación, 14,41 mg de metadona en la muestra).

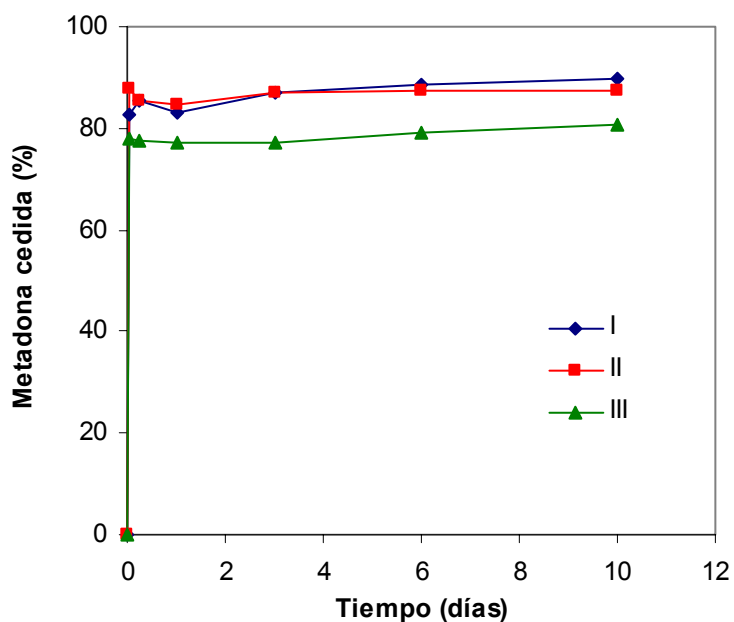


**Figura 4.11.-** Cesión *in vitro* de metadona desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{40}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , agitación 50 rpm, 37°C.



Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	16,74	17,71	15,72	16,72	1,00
0,25	17,26	17,30	15,64	16,73	0,95
1	16,78	17,10	15,63	16,51	0,77
3	17,62	17,58	15,58	16,92	1,16
6	17,89	17,70	15,99	17,19	1,05
10	18,11	17,66	16,29	17,36	0,95

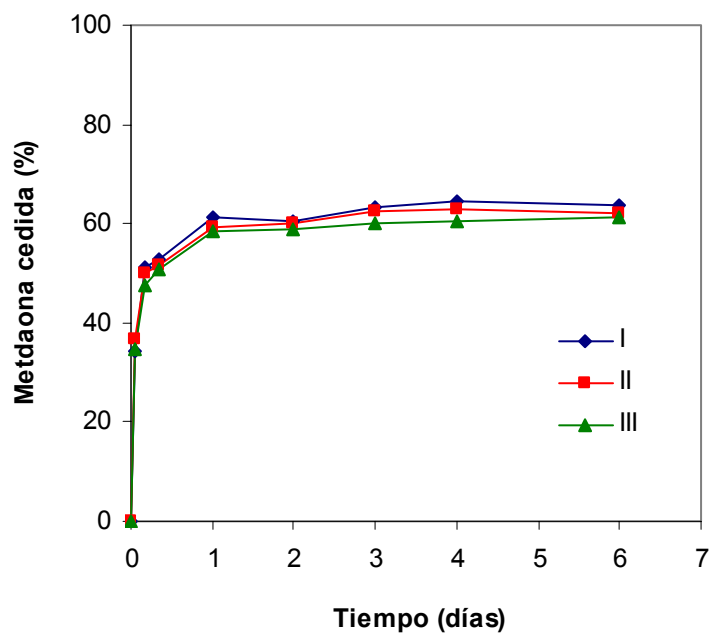
**Tabla 4.21.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{50}$  (PLA 230 kDa, 50% de incorporación, 20 mg de metadona en la muestra).



**Figura 4.12.-** Cesión *in vitro* de metadona desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{50}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , agitación 50 rpm, 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	3,32	3,52	3,36	3,40	0,11
0,17	4,93	4,83	4,58	4,78	0,18
0,333	5,11	4,97	4,89	4,99	0,11
1	5,91	5,71	5,65	5,76	0,14
2	5,85	5,80	5,69	5,78	0,08
3	6,10	6,01	5,80	5,97	0,15
4	6,23	6,06	5,83	6,04	0,20
6	6,14	5,98	5,89	6,01	0,13

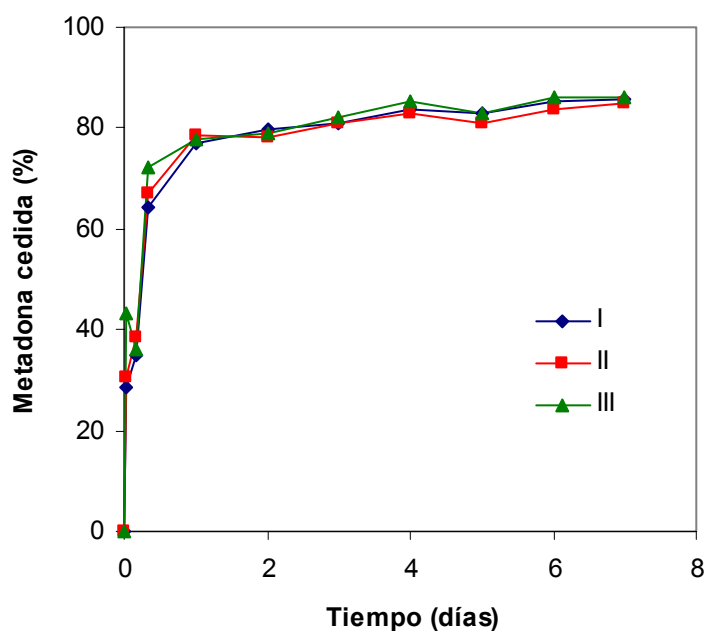
**Tabla 4.22.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote m-L<sub>5,9</sub> - M<sub>B</sub><sup>30</sup> (PLA 5,9 kDa, 24,1 % de incorporación, 9,64 mg de metadona en la muestra).



**Figura 4.13.-** Cesión *in vitro* de metadona desde microesferas lote m-L<sub>5,9</sub> - M<sub>B</sub><sup>30</sup> en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , agitación 50 rpm, 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	3,49	3,71	5,27	4,16	0,97
0,17	4,26	4,68	4,37	4,44	0,22
0,333	7,82	8,17	8,76	8,25	0,47
1	9,35	9,52	9,46	9,44	0,09
2	9,69	9,52	9,60	9,61	0,08
3	9,83	9,81	9,99	9,88	0,10
4	10,17	10,08	10,36	10,21	0,14
5	10,08	9,84	10,09	10,00	0,14
6	10,35	10,18	10,48	10,34	0,15
7	10,42	10,33	10,46	10,40	0,07

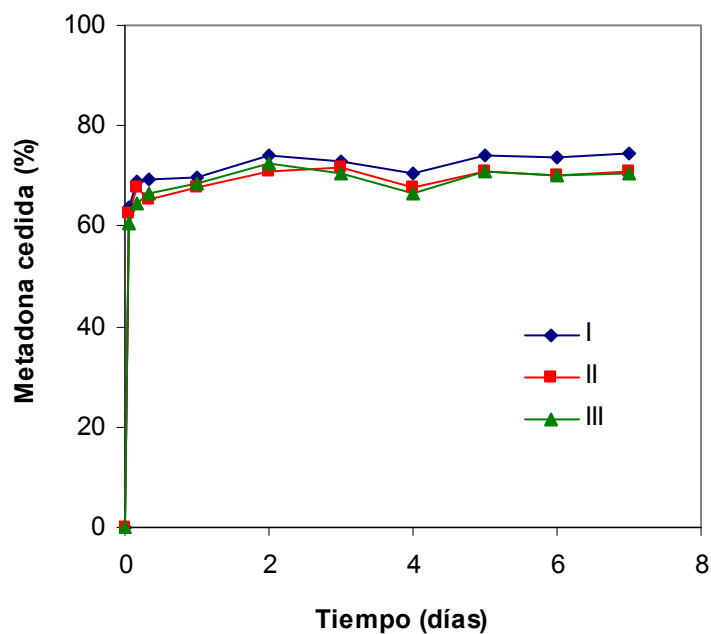
**Tabla 4.23.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote  $m-G_{96} - M_B^{30}$  (PLGA 96 kDa, 30,38% de incorporación, 12,15 mg de metadona en la muestra).



**Figura 4.14.-** Cesión *in vitro* de metadona desde microesferas lote  $m-G_{96} - M_B^{30}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , agitación 50 rpm, 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	2,97	2,93	2,83	2,91	0,07
0,17	3,22	3,15	3,02	3,13	0,10
0,333	3,24	3,06	3,11	3,14	0,10
1	3,27	3,16	3,20	3,21	0,05
2	3,45	3,31	3,38	3,38	0,07
3	3,40	3,35	3,29	3,35	0,06
4	3,29	3,16	3,10	3,19	0,10
5	3,46	3,32	3,32	3,37	0,08
6	3,44	3,27	3,27	3,33	0,10
7	3,48	3,31	3,30	3,36	0,10

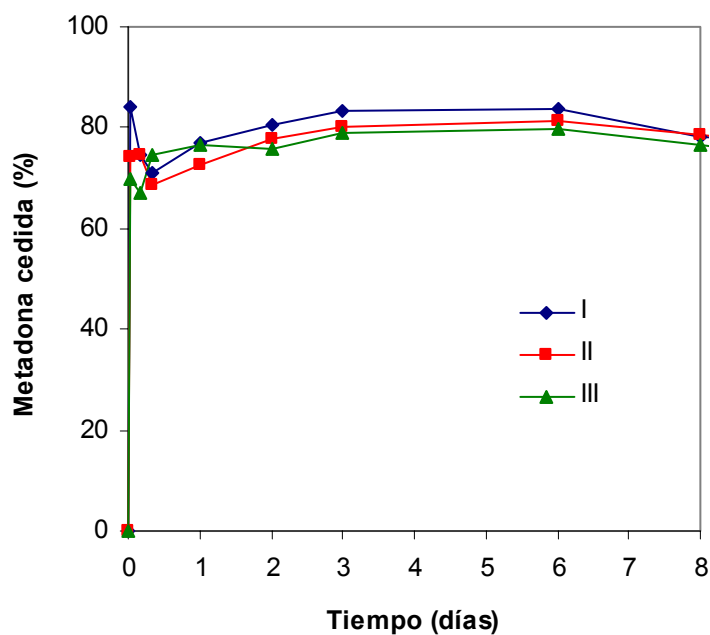
**Tabla 4.24.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote  $m\text{-PEG-G}_{34}\text{-M}_B^{30}$  (PEG-PLGA 34 kDa, 11,67% de incorporación, 4,67 mg de metadona en la muestra).



**Figura 4.15.-** Cesión *in vitro* de metadona desde microesferas lote  $m\text{-PEG-G}_{34}\text{-M}_B^{30}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , agitación 50 rpm, 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	5,77	5,09	4,79	5,22	0,50
0,17	5,12	5,11	4,61	4,95	0,29
0,333	4,86	4,70	5,12	4,89	0,22
1	5,28	4,97	5,25	5,16	0,17
2	5,52	5,32	5,20	5,35	0,16
3	5,72	5,50	5,43	5,55	0,15
6	5,75	5,57	5,47	5,60	0,14
8	5,37	5,38	5,25	5,33	0,08

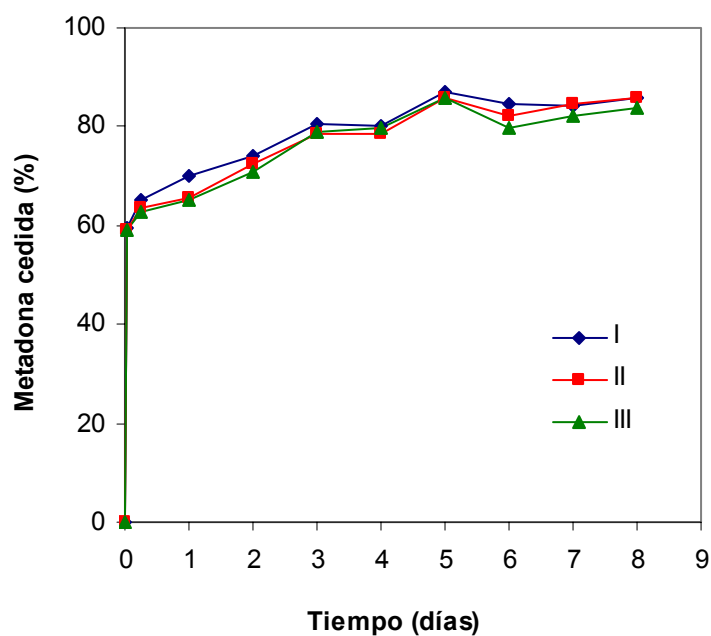
**Tabla 4.25.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote  $m-L_{122} - M_B^{41}$  - dextrosa (PLA 122 kDa, 34,29% de incorporación, 6,86 mg de metadona en la muestra).



**Figura 4.16.-** Cesión *in vitro* de metadona del lote  $m-L_{122} - M_B^{41}$  - dextrosa en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , agitación 50 rpm, 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	10,43	10,33	10,36	10,37	0,05
0,25	11,38	11,08	10,98	11,15	0,21
1	12,27	11,47	11,37	11,70	0,49
2	12,92	12,69	12,36	12,66	0,29
3	14,06	13,70	13,77	13,84	0,19
4	13,98	13,69	13,94	13,87	0,16
5	15,18	15,00	14,98	15,05	0,11
7	14,68	14,78	14,33	14,60	0,24
8	15,02	14,98	14,61	14,87	0,22

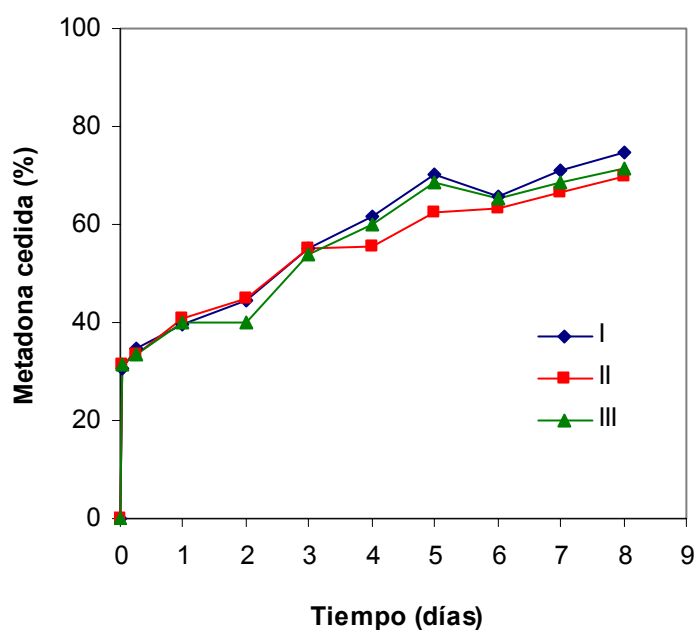
**Tabla 4.26.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{50} - labrafil^{400}$  (PLA 230 kDa, 43,67% de incorporación, 17,46 mg de metadona en la muestra).



**Figura 4.17.-** Cesión *in vitro* de metadona del lote  $m-L_{230} - M_B^{50} - labrafil^{400}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , agitación 50 rpm, 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	2,49	2,54	2,56	2,53	0,04
0,25	2,83	2,73	2,74	2,77	0,06
1	3,24	3,34	3,26	3,28	0,05
2	3,64	3,65	3,24	3,51	0,23
3	4,48	4,49	4,39	4,45	0,05
4	5,00	4,52	4,90	4,81	0,25
5	5,71	5,09	5,57	5,46	0,32
6	5,35	5,15	5,32	5,27	0,11
7	5,78	5,42	5,58	5,60	0,18
8	6,07	5,69	5,81	5,86	0,19

**Tabla 4.27.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{24,4} - labrafil^{200}$  (PLA 230 kDa, 20,36% de incorporación, 8,14 mg de metadona en la muestra).



**Figura 4.18.-** Cantidad de metadona cedida desde microesferas lote  $m-L_{230} - M_B^{24,4} - labrafil^{200}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , agitación 50 rpm, 37°C.

- **Ensayos in vivo de microesferas**

**a) Niveles séricos**

En las tablas 4.28 y 4.29 se muestran los niveles séricos de metadona alcanzados tras la administración, a ratones swiss de 30 g, de las microesferas del lote m-L<sub>230</sub> - M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> por vía subcutánea e intraperitoneal respectivamente. En la tabla 4.30 se muestran las correspondientes concentraciones obtenidas con el lote m-G<sub>96</sub> - M<sub>B</sub><sup>30</sup> por vía subcutánea.

Tiempo (días)	Concentración en suero (ng/ml)				Media	Desviación típica
	I	II	III	IV		
0,042	381,6	298,8	329,8	401,7	353,0	47,1
0,17	94,8	169,7	303,1	250,4	204,5	91,4
0,42	48,0	125,8	149,2	116,6	109,9	43,5
1	50,7	81,0	68,5	74,6	68,7	13,0
2	41,8	36,4	26,8	43,0	37,0	7,4
3	56,6	70,9	33,0	97,9	64,6	27,2
4	36,8	52,7	41,9	47,1	44,6	6,9
5	13,9	28,1	9,2	22,4	18,4	8,5
6	nd	15,9	18,7	35,0	17,4	14,3
8	nd	12,9	14,3	nd	6,8	7,9

nd: no detectable

**Tabla 4.28.-** Niveles séricos medios y desviación típica obtenidos tras la administración s.c. de 20 mg de microesferas del lote m-L<sub>230</sub> - M<sub>B</sub><sup>24,4</sup>, conteniendo una dosis de metadona base de 5 mg, a ratones de 30 g, (n = 4).



Tiempo (días)	Concentración en suero (ng/ml)				Media	Desviación típica
	I	II	III	IV		
0,042	418,5	528,7	290,7	445,6	420,9	98,6
0,17	229,9	222,7	222,3	352,7	256,9	64,0
1	49,0	81,4	58,3	30,5	54,8	21,2
2	28,8	31,4	-----	11,4	23,9	10,9
3	57,7	63,7	33,8	-----	51,7	15,9
4	32,4	29,6	58,3	46,8	41,8	13,4
5	18,7	34,9	41,9	83,2	44,6	27,5
6	22,5	nd	41,4	18,1	20,5	17,0
8	nd	nd	nd	nd	nd	Nd

nd: no detectable

**Tabla 4.29.-** Niveles séricos medios y desviación típica obtenidos tras la administración i.p. de 20 mg de microesferas del lote m-L<sub>230</sub> - M<sub>B</sub><sup>24,4</sup>, conteniendo una dosis de metadona base de 5 mg, a ratones de 30 g, (n = 4).

Tiempo (días)	Concentración (ng/ml)				Media	Desviación típica
	I	II	III	IV		
0,042	1695,3	2015,2	2962,0	3150,5	2455,8	709,8
0,17	1356,1	548,1	687,9	582,9	793,7	379,6
0,42	1031,1	702,9	1060,1	770,4	891,1	180,8
1	65,2	56,7	27,0	21,5	42,6	21,6
2	8,2	9,9	nd	nd	4,5	5,3
3	nd	nd	nd	nd	nd	nd

nd: no detectable

**Tabla 4.30.-** Niveles séricos y desviación típica obtenidos tras la administración s.c. de 10 mg de microesferas del lote m-G<sub>96</sub> - M<sub>B</sub><sup>30</sup>, conteniendo una dosis de metadona base de 3 mg, a ratones de 30 g (n = 4).

### b) Cantidades cedidas

Para el cálculo de las cantidades cedidas *in vivo* desde las microesferas ensayadas se empleó el método de deconvolución previamente descrito utilizando la función característica obtenida tras la administración de 6 y 12 mg/kg en dosis única y dosis múltiples. Los resultados obtenidos para el lote m-L<sub>230</sub> -M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> administrado por vía subcutánea e intraperitoneal se recogen en la tabla 4.31 y 4.32 respectivamente. En la tabla 4.33 se recogen estos mismos resultados para el lote m-G<sub>96</sub> -M<sub>B</sub><sup>30</sup> administrado por vía subcutánea

t (horas)	Cantidades cedidas por vía sc (mg)			
	6 mg/kg		12 mg/kg	
	Dosis única	Dosis repetidas	Dosis única	Dosis repetidas
1	0,067	0,112	0,040	0,092
4	0,331	0,478	0,230	0,448
10	0,602	0,849	0,440	0,824
24	0,968	1,35	0,717	1,33
48	1,34	1,88	0,999	1,85
72	1,71	2,39	1,27	2,35
96	2,10	2,93	1,56	2,89
120	2,32	3,24	1,73	3,19
144	2,45	3,42	1,83	3,37
192	2,62	3,66	1,96	3,61

**Tabla 4.31.-** Cantidades cedidas estimadas por deconvolución tras la administración subcutánea de 20 mg de microesferas del lote m-L<sub>230</sub> -M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> empleando la función característica obtenida para 6 y 12 mg/kg en dosis única y dosis repetidas.

t (horas)	Cantidades cedidas por vía ip (mg)			
	6 mg/kg		12 mg/kg	
	Dosis única	Dosis repetidas	Dosis única	Dosis repetidas
1	0,080	0,134	0,047	0,110
4	0,401	0,581	0,279	0,544
24	1,31	1,83	0,970	1,80
48	1,59	2,22	1,18	2,18
72	1,86	2,60	1,38	2,55
96	2,19	3,06	1,63	3,01
120	2,50	3,50	1,86	3,44
144	2,73	3,82	2,04	3,76

**Tabla 4.32.-** Cantidades cedidas estimadas por deconvolución tras la administración intraperitoneal de 20 mg microesferas del lote  $m-L_{230} - M_B^{24,4}$  empleando la función característica obtenida para 6 y 12 mg/kg en dosis única y dosis repetidas.

t (horas)	Cantidades cedidas por vía sc (mg)			
	6 mg/kg		12 mg/kg	
	Dosis única	Dosis repetidas	Dosis única	Dosis repetidas
1	0,468	0,781	0,276	0,641
4	1,97	2,82	1,39	2,67
10	3,45	4,88	2,51	4,72
24	5,32	7,43	3,96	7,31
48	5,48	7,65	4,08	7,53

**Tabla 4.33.-** Cantidades cedidas estimadas por deconvolución tras la administración subcutánea de 10 mg de microesferas del lote  $m-G_{96} - M_B^{30}$  empleando la función característica obtenida para 6 y 12 mg/kg en dosis única y dosis repetidas.

- **Caracterización *in vitro* e *in vivo* de microesferas**

**a) Ensayos de degradación *in vitro* e *in vivo* de microesferas**

En la tabla 4.34 se muestra la evolución del peso molecular medio en peso (Mw) a lo largo de los ensayos *in vivo* e *in vitro* de los lotes de microesferas m-L<sub>230</sub> - M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> y m-G<sub>96</sub> - M<sub>B</sub><sup>30</sup>.

t (días)	PLA 230 kDa		PLGA 96 kDa	
	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>	<i>in vivo</i>	<i>in vitro</i>
0	64215	64215	37832	37832
0,042	59980	59980	30171	30217
0,17	52717	52717	16828	20464
0,333	34460	34460	14466	12748
1	23852	23852	11316	12787
2	14103	14103	16195	13053
3	11532	11532	-	-
4	10723	10723	-	-
5	8671	8671	-	-
6	9915	9915	-	-

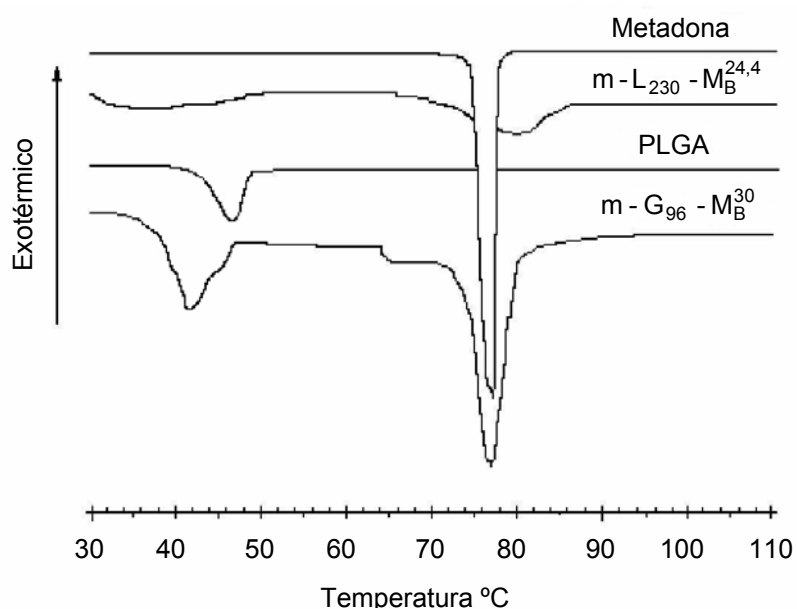
**Tabla 4.34.-** Evolución del Mw de los polímeros durante los ensayos de degradación *in vitro* e *in vivo* de los lotes m-L<sub>230</sub> - M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> y m-G<sub>96</sub> - M<sub>B</sub><sup>30</sup>.

**b) Ensayos de calorimetría diferencial de barrido en microesferas**

En la tabla 4.35 se muestran los valores de los parámetros estudiados por DSC correspondientes a la metadona base, PLGA y las formulaciones m-L<sub>230</sub> - M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> y m-G<sub>96</sub> - M<sub>B</sub><sup>30</sup> de microesferas, así como el porcentaje de metadona no disuelta en cada una de ellos. La figura 4.19 recoge los correspondientes termogramas.

Muestra	Pico (°C)	Área (J/g)	Pico (°C)	Área (J/g)	Metadona no disuelta (%)
Metadona			78,7	87,3	
PLA + Metadona			77,4	85,8	98,2
m-L <sub>230</sub> - M <sub>B</sub> <sup>24,4</sup>			84,0	9,1	10,4
PLGA	47,4	4,8			
m-G <sub>96</sub> - M <sub>B</sub> <sup>30</sup>	42,1	6,7	77,0	42,1	48,2

**Tabla 4.35.-** Valores de los parámetros estudiados por DSC correspondientes a la metadona base, el polímero PLGA y las formulaciones m-L<sub>230</sub> - M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> y m-G<sub>96</sub> - M<sub>B</sub><sup>30</sup>.



**Figura 4.19.-** Termogramas correspondientes a la metadona base, el polímero PLGA y las formulaciones m-L<sub>230</sub> - M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> y m-G<sub>96</sub> - M<sub>B</sub><sup>30</sup>.

#### 4.5.- IMPLANTES

La nomenclatura elegida para denominar a los diferentes lotes de implantes incluye letras minúsculas, mayúsculas, superíndices y subíndices. De izquierda a derecha la primera indica la forma geométrica del implante, la letra “p” minúscula designa “paralelepípedos” y la “c” “cilindros”. A continuación se designa al polímero empleando una G (si se trata de PLGA) ó L (si se trata de PLA) indicando el superíndice el porcentaje empleado y el subíndice el peso molecular medio en peso. A continuación, y seguido de un guión, se emplea la M de metadona, el superíndice indica también la proporción empleada y el subíndice el tipo de metadona empleado (base B o clorhidrato H). A continuación, entre paréntesis, y en caso de requerirlo, se muestran los datos del recubrimiento nombrando con mayúscula el tipo de polímero empleado. Como subíndice el peso molecular y como superíndice el porcentaje empleado. A modo de ejemplo, el lote p-G<sub>12</sub><sup>25</sup> - M<sub>B/H</sub><sup>25/50</sup> (L<sub>230</sub><sup>12</sup>) serían implantes paralelepípedos elaborados con PLGA 12 kDa al 25% y una mezcla de metadona base y clorhidrato al 25% y 50% respectivamente, recubiertos con PLA 230 kDa al 12%.

#### 4.5.1.-IMPLANTES PARA UNA CESIÓN DE METADONA DE UNA SEMANA. ENSAYOS *IN VITRO*

- **Implantes de clorhidrato de metadona**

En la tabla 4.36 se recogen las características de los 4 lotes de implantes elaborados con clorhidrato de metadona. Estos implantes se prepararon con PLGA de 12 kDa (50:50) aplicando una fuerza de compresión de 5 t. Los comprimidos obtenidos fueron posteriormente cortados en paralelepípedos de  $10 \pm 0,1$  mg. Tres lotes fueron recubiertos con 1 capa de polímero al 12% en diclorometano.

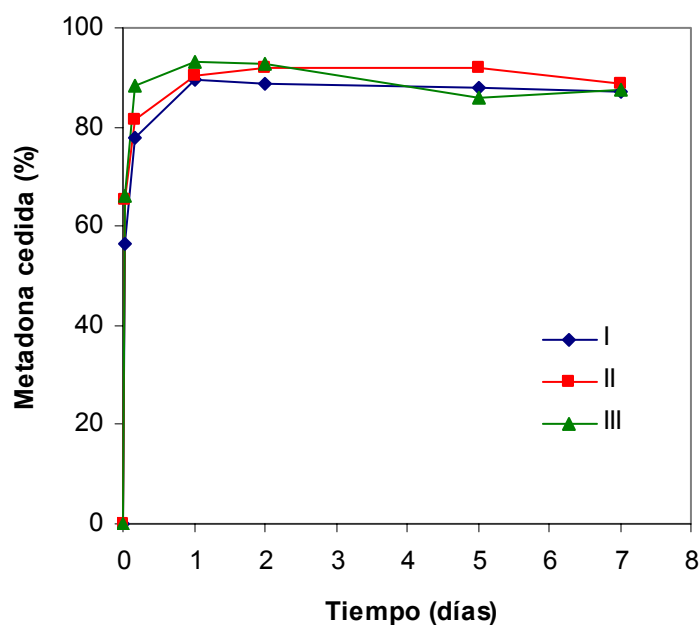
Lote	PLGA 12 kDa (%)	Metadona Clorhidrato (%)	Recubrimiento		
			Polímero	Mw (kDa)	(%)
p-G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>H</sub> <sup>50</sup>	50	50	-----	-----	-----
p-G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>H</sub> <sup>50</sup> (L <sub>5,9</sub> <sup>12</sup> )	50	50	PLA	5,9	12
p-G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>H</sub> <sup>50</sup> (L <sub>230</sub> <sup>12</sup> )	50	50	PLA	230	12
p-G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>H</sub> <sup>50</sup> (G <sub>12</sub> <sup>12</sup> )	50	50	PLGA	12	12

**Tabla 4.36.-** Composición de los implantes paralelepípedos de 10 mg elaborados con clorhidrato de metadona y PLGA 12 kDa (50:50) a 5 t de presión.

Las cantidades y porcentajes de metadona cedidos desde estos lotes de implantes se muestran en las tablas 4.37-4.40 y figuras 4.20-4.23 respectivamente.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	2,81	3,30	3,37	3,16	0,30
0,17	3,88	4,10	4,49	4,16	0,31
1	4,46	4,56	4,74	4,58	0,14
2	4,44	4,64	4,72	4,60	0,14
5	4,39	4,64	4,37	4,47	0,15
7	4,36	4,47	4,45	4,43	0,06

**Tabla 4.37.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{50} - M_H^{50}$  (implantes de 10 mg con un contenido en metadona de 5 mg).

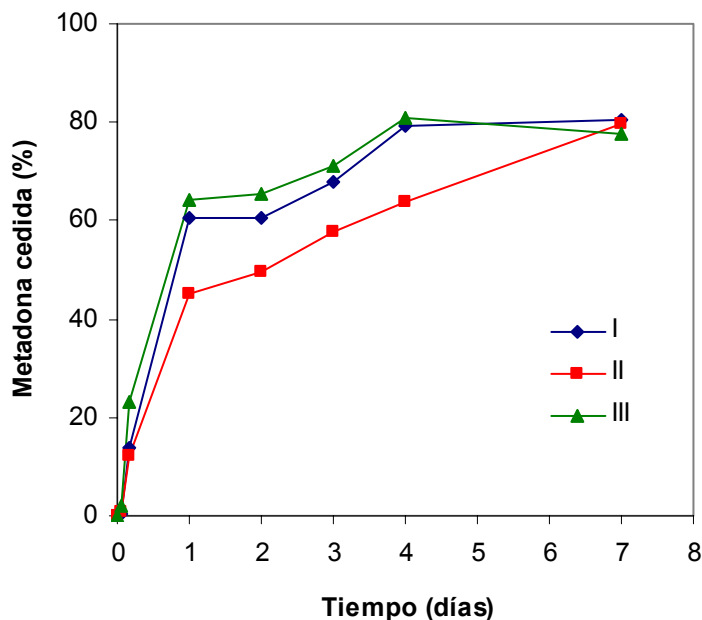


**Figura 4.20.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{50} - M_H^{50}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.



Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,02	0,05	0,10	0,06	0,04
0,17	0,70	0,61	1,16	0,82	0,29
1	3,06	2,28	3,25	2,87	0,51
2	3,07	2,50	3,31	2,96	0,42
3	3,43	2,91	3,59	3,31	0,36
4	4,00	3,22	4,08	3,77	0,47
7	4,06	4,02	3,93	4,00	0,07

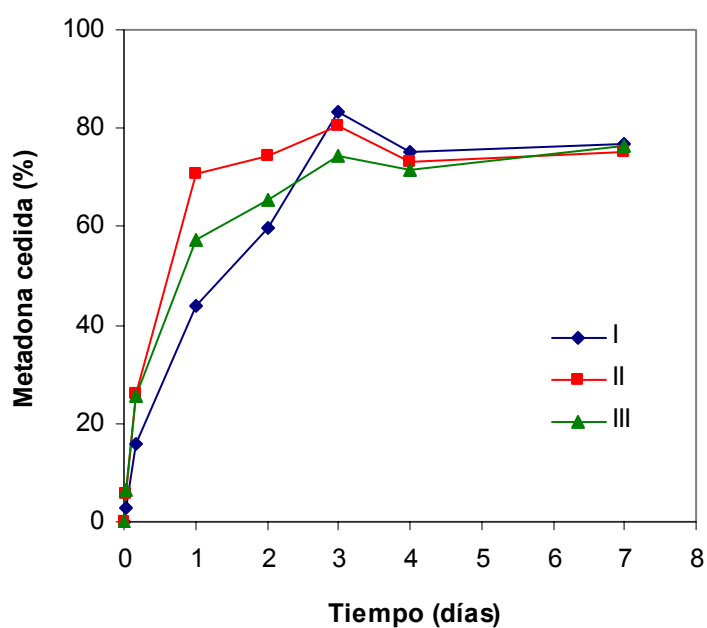
**Tabla 4.38.-** Cantidad de fármaco cedida desde el lote  $p\text{-}G_{12}^{50} - M_H^{50} (L_{5,9}^{12})$  (implantes de 10 mg recubiertos con PLGA-5,9 kDa al 12% con un contenido en metadona de 5 mg).



**Figura 4.21.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $p\text{-}G_{12}^{50} - M_H^{50} (L_{5,9}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,15	0,28	0,33	0,25	0,09
0,17	0,80	1,30	1,29	1,13	0,29
1	2,20	3,54	2,87	2,87	0,67
2	2,99	3,71	3,26	3,32	0,36
3	4,16	4,03	3,71	3,97	0,23
4	3,76	3,65	3,58	3,67	0,09
7	3,85	3,76	3,82	3,81	0,04

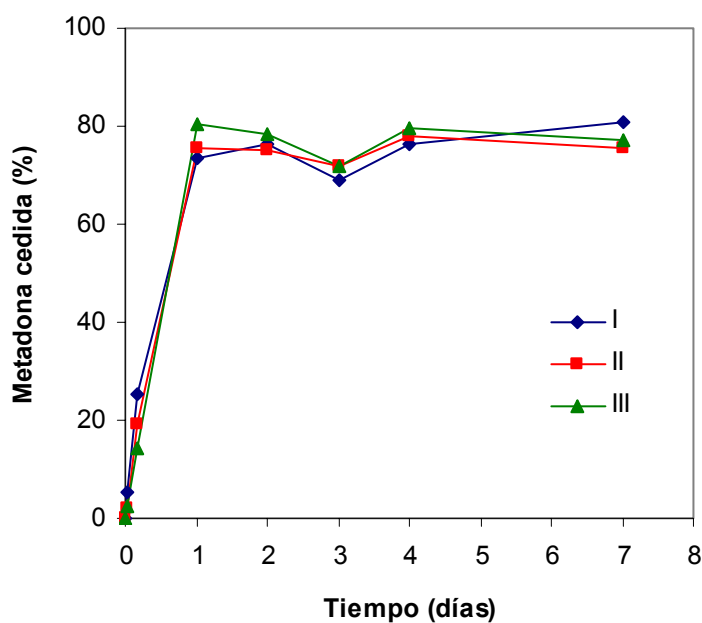
**Tabla 4.39.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p-G_{12}^{50} - M_H^{50} (L_{200}^{12})$  (implantes de 10 mg recubiertos con PLA-230 kDa al 12% con un contenido en metadona de 5 mg).



**Figura 4.22.-** Cesión *in vitro* de Metadona desde el lote  $p-G_{12}^{50} - M_H^{50} (L_{230}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,27	0,09	0,13	0,16	0,09
0,17	1,27	0,96	0,71	0,98	0,28
1	3,67	3,78	4,01	3,82	0,18
2	3,81	3,76	3,93	3,83	0,09
3	3,44	3,58	3,60	3,54	0,08
4	3,81	3,89	3,97	3,89	0,08
7	4,04	3,78	3,85	3,89	0,14

**Tabla 4.40.-** Cantidad de fármaco cedida desde el lote  $p\text{-}G_{12}^{50} - M_H^{50} (G_{12}^{12})$  (implantes de 10 mg recubiertos con PLGA-12 kDa al 12%, con un contenido en metadona de 5 mg).



**Figura 4.23.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $p\text{-}G_{12}^{50} - M_H^{50} (G_{12}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween®80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

- **Implantes de mezclas de metadona base y clorhidrato**

En la tabla 4.41 se recogen las características de los implantes paralelepípedos de 10 mg elaborados con PLGA de 12 kDa y mezcla de metadona base/clorhidrato en una proporción 50:25:25 y 25:25:50. El recubrimiento de algunos de estos implantes se realizó con 1 capa de polímero al 12% en diclorometano.

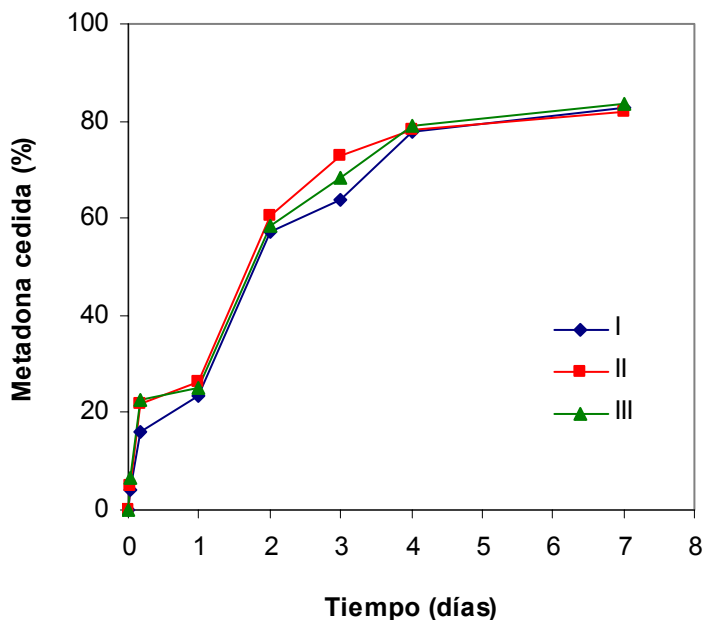
Lote	PLGA 12 kDa (%)	Metadona (%)		Recubrimiento		
		base	clorhidrato	Polímero	Mw (kDa)	(%)
$p-G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25}$	50	25	25	-----	-----	-----
$p-G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (L_{5,9}^{12})$	50	25	25	PLA	5,9	12
$p-G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (L_{230}^{12})$	50	25	25	PLA	230	12
$p-G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (G_{12}^{12})$	50	25	25	PLGA	12	12
$p-G_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50}$	25	25	50	-----	-----	-----
$p-G_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50} (L_{5,9}^{12})$	25	25	50	PLA	5,9	12
$p-G_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50} (L_{230}^{12})$	25	25	50	PLA	230	12
$p-G_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50} (G_{12}^{12})$	25	25	50	PLGA	12	12

**Tabla 4.41.-** Composición de los implantes paralelepípedos  $p-G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25}$  y  $p-G_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50}$  de 10 mg elaborados con PLGA-12 kDa al 50% ó 25% sin recubrir y recubiertos con polímero al 12% en diclorometano.

Los resultados de los ensayos de cesión expresados en cantidad de metadona cedida se encuentran en las tablas 4.42-4.49 y los porcentajes cedidos desde estos lotes de implantes por triplicado se muestran en las figuras 4.24-4.31.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,19	0,23	0,30	0,24	0,06
0,17	0,75	1,03	1,06	0,95	0,17
1	1,11	1,24	1,20	1,18	0,07
2	2,71	2,86	2,77	2,78	0,08
3	3,03	3,44	3,23	3,23	0,21
4	3,68	3,70	3,74	3,71	0,03
7	3,91	3,87	3,95	3,91	0,04

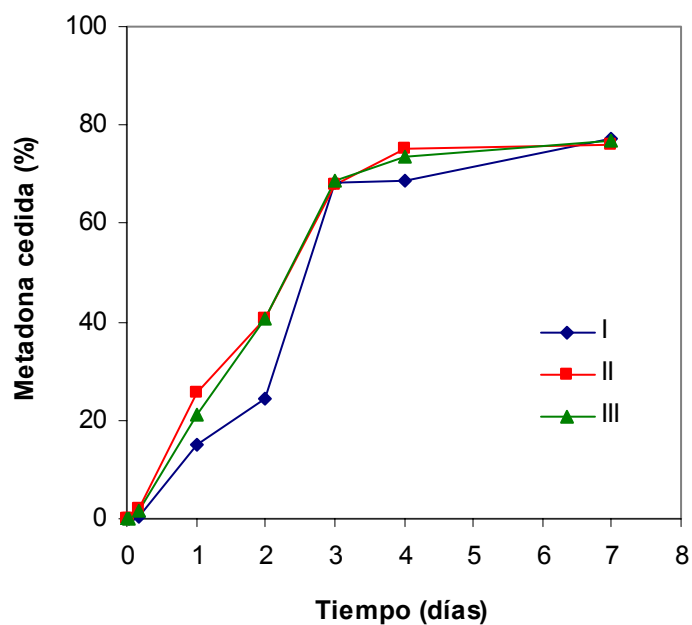
**Tabla 4.42.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25}$  (implantes de 10 mg con un contenido equivalente a metadona base de 4,7mg).



**Figura 4.24.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,17	0,02	0,10	0,08	0,07	0,04
1	0,71	1,22	1,02	0,99	0,26
2	1,17	1,95	1,96	1,69	0,45
3	3,27	3,26	3,31	3,28	0,03
4	3,28	3,60	3,56	3,48	0,17
7	3,69	3,63	3,71	3,68	0,04

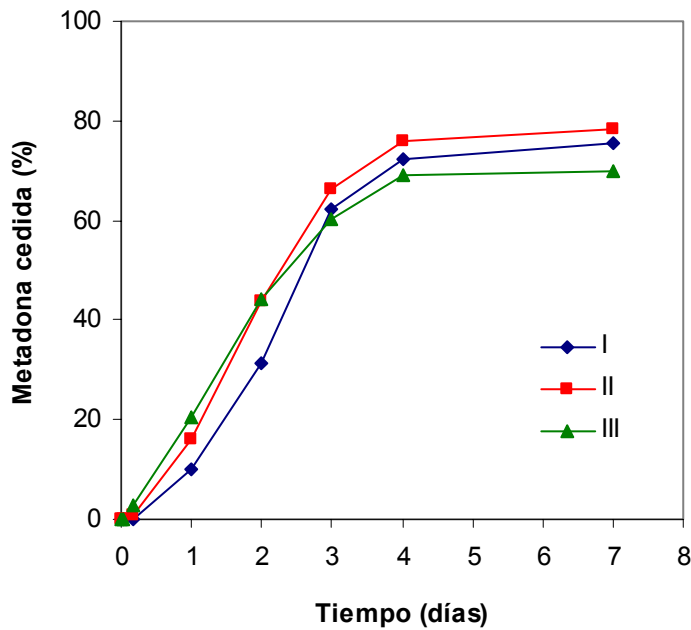
**Tabla 4.43.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (L_{5,9}^{12})$  (implantes de 10 mg recubiertos con PLA-5,9 KDa al 12% con un contenido equivalente a metadona base de 4,7mg).



**Figura 4.25.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (L_{5,9}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,17	0,00	0,04	0,13	0,05	0,08
1	0,48	0,76	0,97	0,74	0,25
2	1,48	2,07	2,11	1,89	0,35
3	2,96	3,14	2,88	2,99	0,13
4	3,42	3,60	3,31	3,45	0,15
7	3,57	3,72	3,34	3,54	0,19

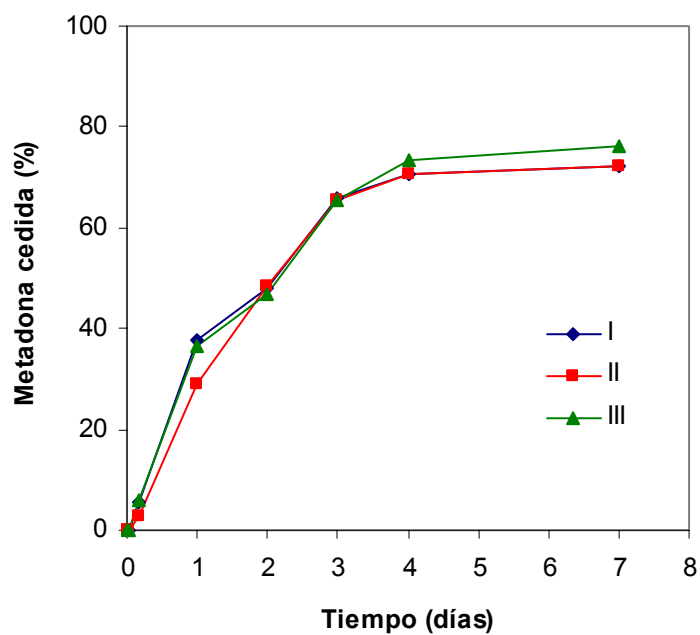
**Tabla 4.44.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (L_{230}^{12})$  (implantes de 10 mg recubiertos con PLA-230 kDa al 12%, con un contenido equivalente a metadona base de 4,7mg).



**Figura 4.26.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (L_{230}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
0,17	0,27	0,14	0,27	0,23	0,08
1	1,77	1,36	1,72	1,62	0,22
2	2,26	2,29	2,21	2,25	0,04
3	3,09	3,11	3,10	3,10	0,01
4	3,32	3,34	3,48	3,38	0,09
7	3,39	3,42	3,61	3,47	0,12

**Tabla 4.45.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p\text{-}G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (G_{12}^{12})$  (implantes de 10 mg recubiertos con PLGA-12 kDa al 12%, con un contenido equivalente a metadona base de 4,7mg).

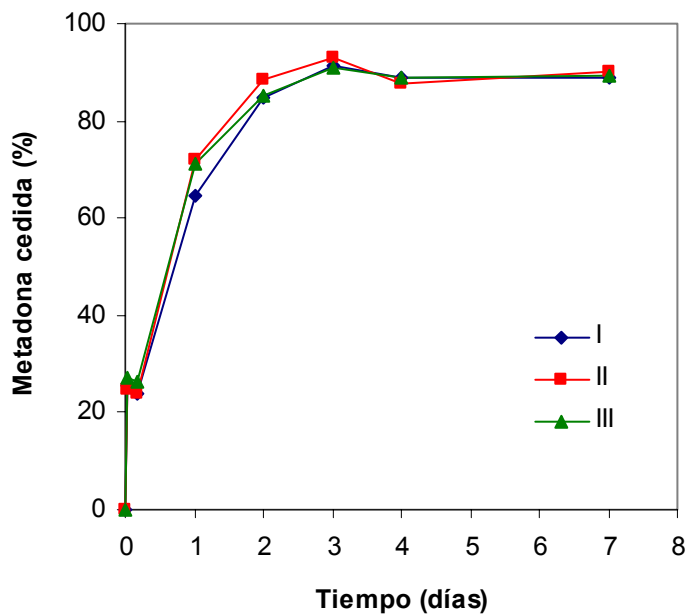


**Figura 4.27.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $p\text{-}G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (G_{12}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.



Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	1,75	1,71	1,89	1,78	0,09
0,17	1,64	1,66	1,84	1,71	0,11
1	4,47	5,02	4,97	4,82	0,30
2	5,86	6,17	5,93	5,99	0,16
3	6,31	6,49	6,34	6,38	0,10
4	6,13	6,12	6,21	6,15	0,05
7	6,14	6,30	6,24	6,23	0,08

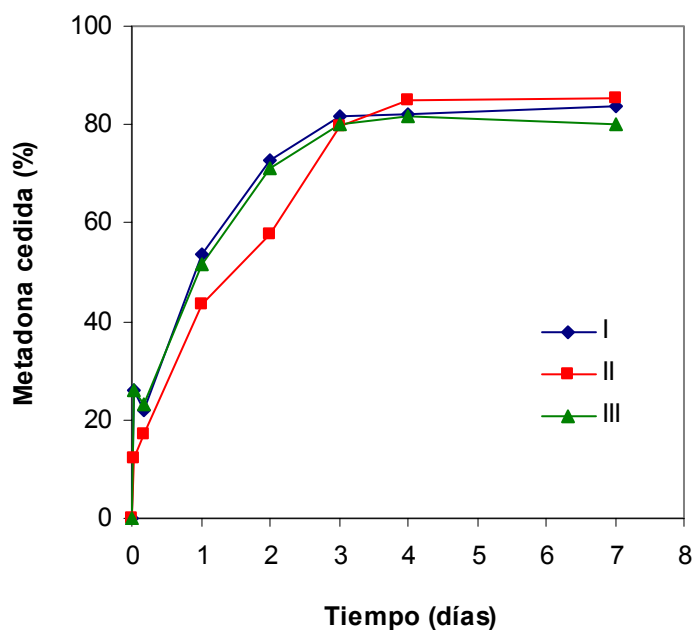
**Tabla 4.46.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50}$  (implantes de 10 mg con un contenido equivalente a metadona base de 7,0 mg).



**Figura 4.28.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	1,84	0,87	1,85	1,52	0,56
0,17	1,57	1,20	1,64	1,47	0,24
1	3,83	3,09	3,68	3,53	0,39
2	5,18	4,10	5,07	4,78	0,59
3	5,81	5,67	5,70	5,72	0,07
4	5,83	6,03	5,80	5,89	0,13
7	5,95	6,06	5,71	5,91	0,18

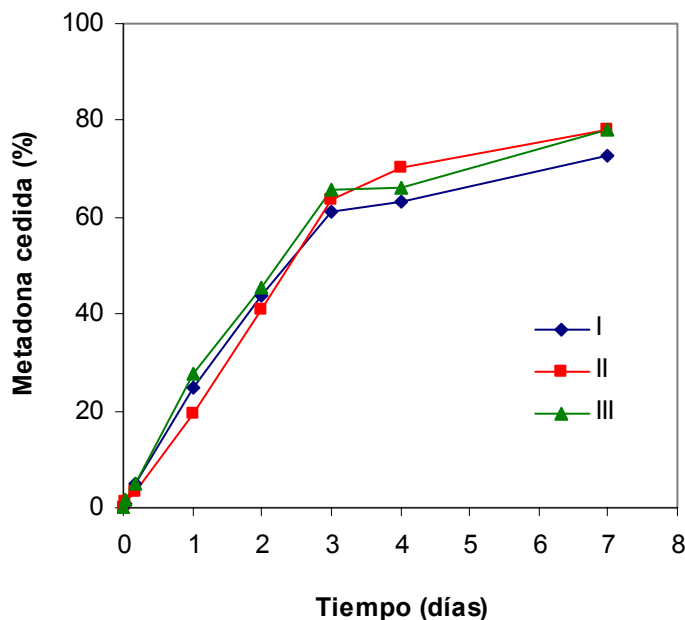
**Tabla 4.47.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p\text{-}G_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50} (L_{5,9}^{12})$  (implantes de 10 mg recubiertos con PLA-5,9 kDa al 12% con un contenido equivalente a metadona base de 7,0 mg)



**Figura 4.29.-** Cesión in vitro de metadona desde el lote  $p\text{-}G_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50} (L_{5,9}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,06	0,07	0,12	0,09	0,03
0,17	0,35	0,23	0,34	0,31	0,06
1	1,74	1,36	1,95	1,69	0,30
2	3,04	2,87	3,19	3,04	0,16
3	4,27	4,48	4,61	4,45	0,17
4	4,41	4,95	4,67	4,68	0,27
7	5,08	5,50	5,49	5,36	0,24

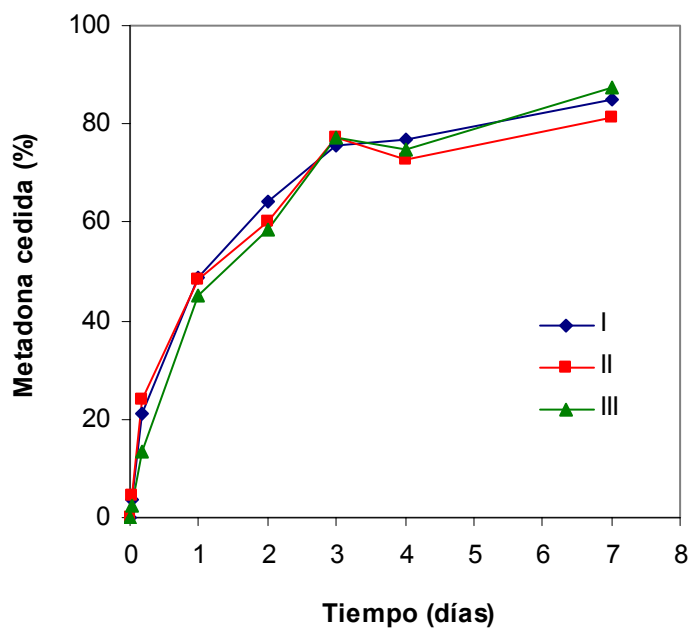
**Tabla 4.48.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50} (L_{230}^{12})$  (implantes de 10 mg recubiertos con PLA-230 kDa al 12% con un contenido equivalente a metadona base de 7,0 mg)



**Figura 4.30.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $p\text{-G}_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50} (L_{230}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,25	0,33	0,18	0,25	0,07
0,17	1,48	1,69	0,96	1,38	0,37
1	3,44	3,40	3,20	3,35	0,13
2	4,52	4,23	4,16	4,30	0,19
3	5,34	5,43	5,50	5,42	0,08
4	5,42	5,13	5,31	5,29	0,14
7	6,00	5,73	6,21	5,98	0,24

**Tabla 4.49.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p\text{-}G_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50} (G_{12}^{12})$  (implantes de 10 mg recubiertos con PLGA-12 kDa al 12% con un contenido equivalente a metadona base de 7,0 mg)



**Figura 4.31.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $p\text{-}G_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50} (G_{12}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

- **Implantes de metadona base**

En la tabla 4.50 se recogen las características de los implantes elaborados con PLGA de 12 kDa y metadona base (50:50), con nomenclatura común  $G_{12}^{50} - M_B^{50}$ .

Lote	PLGA 12 kDa (%)	Metadona Base (%)	Recubrimiento		
			Polímero	Mw (kDa)	(%)
p- $G_{12}^{50} - M_B^{50}$	50	50	-----	-----	-----
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50}$	50	50	-----	-----	-----
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{5,9}^6)$	50	50	PLA	5,9	6
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{5,9}^{12})$	50	50	PLA	5,9	12
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^6)$	50	50	PLA	30	6
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^{12})$	50	50	PLA	30	12
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{230}^6)$	50	50	PLA	230	6
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{230}^{12})$	50	50	PLA	230	12
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50} (G_{12}^6)$	50	50	PLGA	12	6
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50} (G_{12}^{12})$	50	50	PLGA	12	12
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50} (G_{96}^6)$	50	50	PLGA	96	6
c- $G_{12}^{50} - M_B^{50} (G_{96}^{12})$	50	50	PLGA	96	12

**Tabla 4.50.-** Características de elaboración de los implantes preparados con metadona base y PLGA de 12 kDa (50:50) para una semana de cesión.

Hay que indicar que el lote p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> es el único con forma de paralelepípedo y con un peso de  $10 \pm 0,12$  mg, los restantes lotes son implantes cilíndricos de 26 mg elaborados con PLGA de 12 kDa y metadona base (50:50) obtenidos de forma individual aplicando una fuerza de compresión de 1 t durante 5 minutos. El recubrimiento de estos implantes también se realizó con 1 capa de polímero al 6% ó 12% en diclorometano.

**Para comprobar la uniformidad de contenido en metadona de los lotes de implantes paralelepípedos se realizó un estudio con 4 lotes de p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> de 25 unidades ensayándose el contenido por triplicado. En la tabla 4.51 se muestran los porcentajes de incorporación, medias y desviaciones típicas, obtenidos para una incorporación teórica del 50%.**

Lote	Incorporación exp. (%)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
p-G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>B</sub> <sup>50</sup> (a)	49,8	51,0	50,4	50,4	0,60
p-G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>B</sub> <sup>50</sup> (b)	50,3	51,2	50,8	50,8	0,45
p-G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>B</sub> <sup>50</sup> (c)	50,4	49,7	47,7	49,3	1,40
p-G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>B</sub> <sup>50</sup> (d)	50,2	50,6	50,1	50,3	0,27

**Tabla 4.51.-** Porcentajes de incorporación experimental de los lotes p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> ensayados para la uniformidad de contenido en metadona.

En las tablas 4.52- 4.55 se recogen las cantidades cedidas desde los 4 lotes de implantes p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> y en la figura 4.32 se reflejan los porcentajes medios y sus desviaciones típicas para cada uno de los replicados. Los valores de  $f_2$  se encuentran en el intervalo de 55 – 69 por lo que no existen

diferencias entre los cuatro lotes y por lo tanto el método de elaboración es reproducible.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,13	0,13	0,12	0,13	0,00
0,17	0,46	0,51	0,44	0,47	0,03
1	1,26	1,32	1,22	1,27	0,05
2	1,52	1,70	1,56	1,60	0,10
3	1,94	2,05	2,30	2,10	0,18
4	3,33	3,94	3,59	3,62	0,30
5	4,74	4,52	4,44	4,56	0,15
6	4,99	4,85	4,92	4,92	0,07
7	4,87	4,73	4,69	4,76	0,09

**Tabla 4.52.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  (a) (implantes de 10 mg con un contenido en metadona base de 5 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,04	0,05	0,07	0,05	0,01
0,17	0,34	0,43	0,52	0,43	0,09
1	1,03	1,07	1,18	1,09	0,08
2	1,48	1,58	1,99	1,68	0,27
3	1,87	1,96	2,32	2,05	0,24
4	2,98	3,23	3,59	3,27	0,30
7	4,38	4,37	4,38	4,38	0,01

**Tabla 4.53.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  (b) (implantes de 10 mg con un contenido en metadona base de 5 mg).

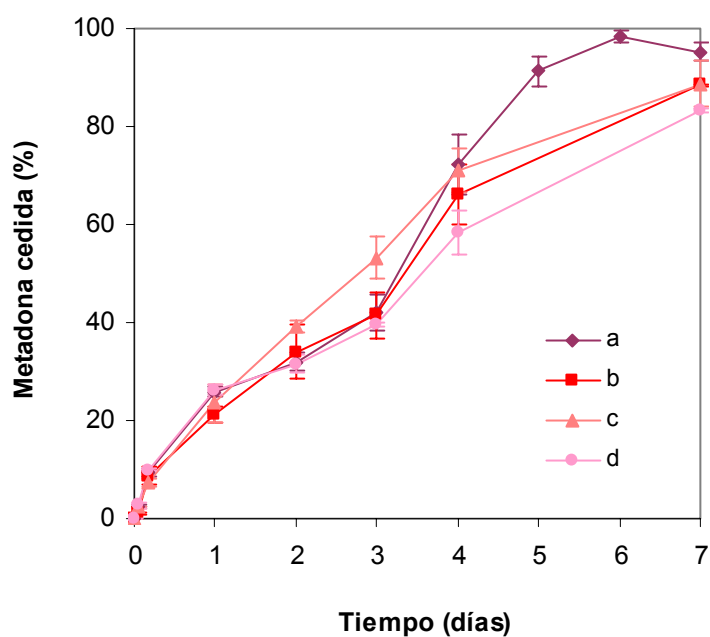
Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,11	0,11	0,13	0,12	0,01
0,17	0,34	0,33	0,42	0,37	0,05
1	1,08	1,27	1,48	1,28	0,20
2	1,89	1,99	2,01	1,96	0,07
3	2,46	2,60	2,91	2,66	0,23
4	3,33	3,52	3,81	3,55	0,24
7	4,16	4,62	4,54	4,44	0,25

**Tabla 4.54.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  (c) (implantes de 10 mg con un contenido en metadona base de 5 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,15	0,16	0,11	0,14	0,03
0,17	0,49	0,50	0,48	0,49	0,01
1	1,34	1,28	1,24	1,28	0,05
2	1,63	1,63	1,47	1,58	0,09
3	1,95	2,00	1,97	1,97	0,03
4	2,64	2,97	3,11	2,91	0,24
7	4,10	4,16	4,17	4,14	0,04

**Tabla 4.55.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  (d) (implantes de 10 mg con un contenido en metadona base de 5 mg).





**Figura 4.32.-** Replicabilidad de la cesión *in vitro* de metadona desde los 4 lotes de implantes  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Para comprobar la uniformidad de contenido en metadona de los lotes de implantes cilíndricos se realizó un estudio con 4 lotes de 25 unidades de implantes  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  ensayándose su contenido por triplicado. En la tabla 4.56 se muestran los porcentajes de incorporación, medias y desviaciones típicas obtenidos.

Lote	Incorporación exp. (%)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
C- G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>B</sub> <sup>50</sup> (a)	49,09	54,34	50,37	51,27	0,93
C- G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>B</sub> <sup>50</sup> (b)	50,40	50,90	52,10	51,13	1,36
C- G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>B</sub> <sup>50</sup> (c)	47,68	49,73	50,40	49,27	1,59
C- G <sub>12</sub> <sup>50</sup> - M <sub>B</sub> <sup>50</sup> (d)	50,48	54,68	50,12	51,76	1,98

**Tabla 4.56.-** Porcentajes de incorporación experimental y de los lotes c- G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> ensayados para la uniformidad de contenido en metadona.

Los resultados de los ensayos de cesión para los 4 lotes de implantes c- G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> se recogen en las tablas 4.57-4.60 y la representación gráfica de los porcentajes medios con sus desviaciones típicas para cada uno de los replicados en la figura 4.33. Los valores de  $f_2$  se encuentran en el intervalo de 62 - 88 por lo que no existen diferencias entre los cuatro lotes y por lo tanto el método de elaboración es reproducible.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,19	0,24	0,39	0,27	0,10
0,25	1,54	1,48	2,27	1,76	0,44
1	4,20	3,70	3,85	3,92	0,25
2	5,68	5,51	5,34	5,51	0,17
3	5,86	7,05	7,82	6,91	0,99
4	7,50	9,14	9,74	8,79	1,16
5	8,83	10,09	10,66	9,86	0,94
6	10,04	11,15	11,11	10,77	0,63
7	11,02	11,34	11,66	11,34	0,32

**Tabla 4.57.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  (a) (implantes de 26 mg con un contenido en metadona base de 13 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,24	0,22	0,19	0,22	0,02
0,25	2,06	1,38	1,42	1,62	0,38
1	5,09	3,26	3,80	4,05	0,94
2	6,42	4,56	6,10	5,69	0,99
3	7,44	6,59	9,18	7,74	1,32
4	8,16	9,00	10,74	9,30	1,31
5	9,67	10,08	11,57	10,44	1,00
6	10,34	11,06	11,86	11,09	0,76
7	11,35	11,89	12,44	11,89	0,54

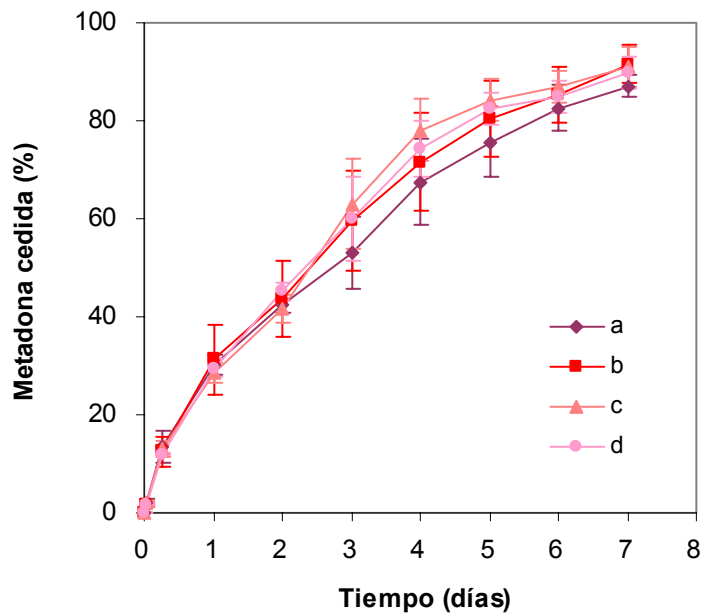
**Tabla 4.58.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  (b) (implantes de 26 mg con un contenido en metadona base de 13 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,30	0,25	0,18	0,24	0,06
0,25	1,69	1,50	1,93	1,71	0,21
1	3,57	3,58	4,08	3,75	0,29
2	5,20	5,26	5,93	5,46	0,40
3	6,83	9,09	8,83	8,25	1,23
4	9,24	10,86	10,61	10,24	0,87
5	10,35	11,38	11,39	11,04	0,60
6	10,97	11,34	11,91	11,41	0,48
7	11,34	11,97	12,49	11,93	0,58

**Tabla 4.59.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  (c) (implantes de 26 mg con un contenido en metadona base de 13 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,22	0,26	0,23	0,24	0,02
0,25	1,53	1,60	1,56	1,57	0,04
1	3,94	3,58	4,08	3,87	0,26
2	5,59	6,04	6,10	5,91	0,28
3	6,54	8,24	8,80	7,86	1,18
4	8,81	10,07	10,28	9,72	0,80
5	10,24	11,13	11,00	10,79	0,48
6	10,58	11,52	11,19	11,10	0,48
7	11,26	12,20	11,72	11,73	0,47

**Tabla 4.60.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  (d) (implantes de 26 mg con un contenido en metadona base de 13 mg).



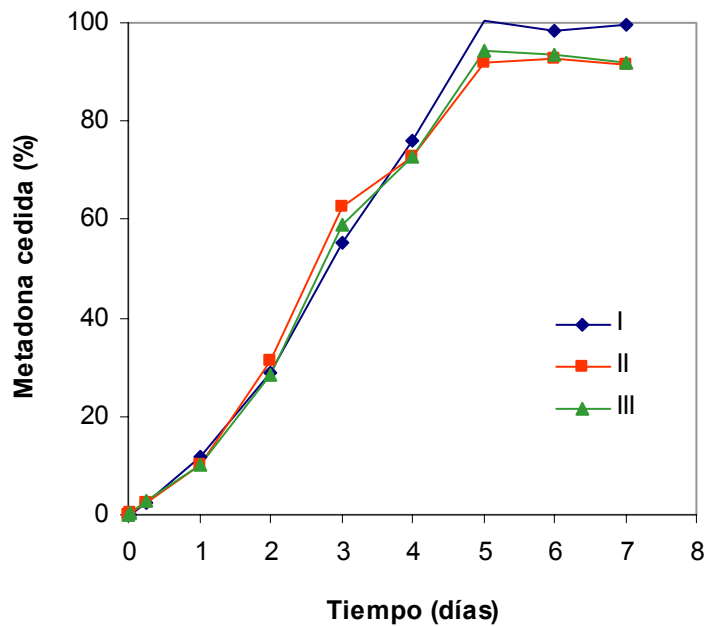
**Figura 4.33.-** Replicabilidad de la cesión *in vitro* de metadona desde los 4 lotes de implantes  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

El lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  fue recubierto con una capa de distintos polímeros, disueltos en diclorometano al 6% y 12%, en concreto con PLA de 5,9, 30 y 230 kDa y PLGA de 12 y 96 kDa. Los resultados de los ensayos de cesión *in vitro* de los lotes  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{5,9}^6)$ ,  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{5,9}^{12})$ ,  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^6)$ ,  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^{12})$ ,  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{230}^6)$ ,  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{230}^{12})$ ,  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(G_{12}^6)$ ,  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(G_{12}^{12})$ ,  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(G_{96}^6)$  y  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(G_{96}^{12})$ , se encuentran recogidos en las tablas 4.61-4.73 y su representación gráfica en las figuras 4.34-4.43, incluyendo el estudio de replicabilidad del recubrimiento llevado a cabo con el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^{12})$ . La uniformidad del recubrimiento

se pone de manifiesto con los valores del parámetro  $f_2$  superiores a 50 que se encuentran en el intervalo de 53 a 77.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,03	0,05	0,05	0,04	0,01
0,25	0,29	0,34	0,35	0,33	0,03
1	1,51	1,34	1,32	1,39	0,11
2	3,71	4,08	3,69	3,83	0,22
3	7,14	8,13	7,67	7,64	0,50
4	9,85	9,47	9,46	9,59	0,22
5	13,00	11,96	12,26	12,41	0,54
6	12,74	12,02	12,15	12,30	0,38
7	12,88	11,88	11,96	12,24	0,56

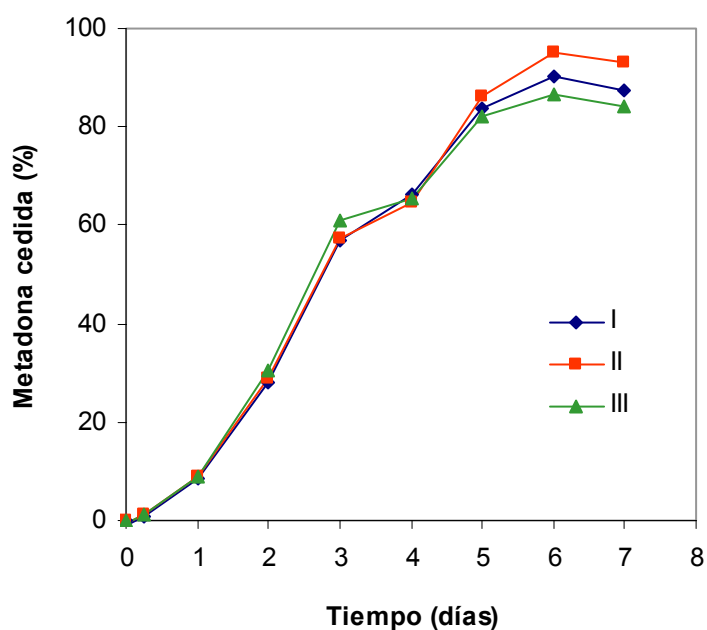
**Tabla 4.61.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{5,9}^6)$  (implantes de 26 mg recubiertos con PLA-5,9 kDa al 6% con un contenido en metadona base de 13 mg).



**Figura 4.34.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{5,9}^6)$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0	0	0	0	0
0,25	0,08	0,18	0,17	0,15	0,05
1	1,09	1,15	1,16	1,13	0,04
2	3,63	3,73	3,96	3,77	0,17
3	7,35	7,44	7,92	7,57	0,31
4	8,56	8,38	8,50	8,48	0,09
5	10,84	11,15	10,69	10,90	0,23
6	11,67	12,34	11,27	11,76	0,54
7	11,33	12,07	10,92	11,44	0,58

**Tabla 4.62.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{5,9}^{12})$  (implantes de 26 mg recubiertos con PLA-5,9 kDa al 12% con un contenido en metadona base de 13 mg).

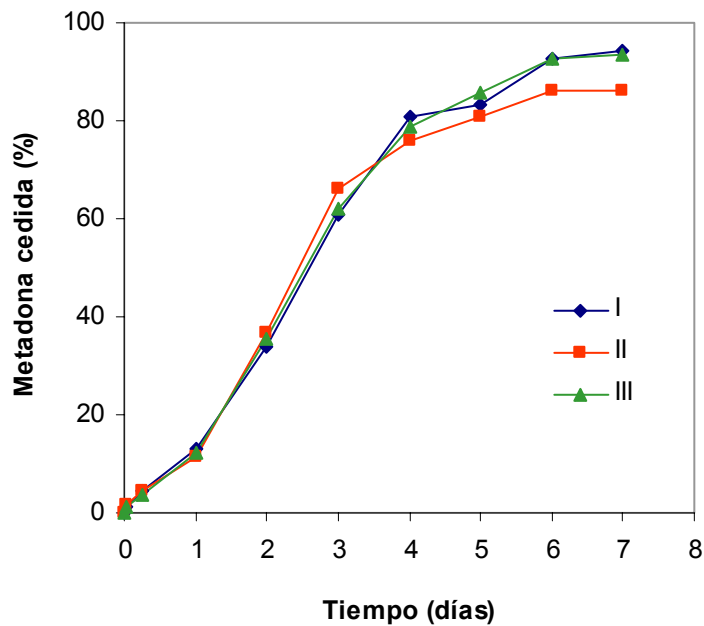


**Figura 4.35.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{5,9}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,17	0,22	0,16	0,18	0,03
0,17	0,58	0,56	0,47	0,54	0,06
1	1,64	1,49	1,56	1,56	0,08
2	4,31	4,70	4,57	4,52	0,20
3	7,73	8,46	7,93	8,04	0,38
4	10,32	9,74	10,08	10,05	0,30
5	10,63	10,35	10,97	10,65	0,31
6	11,79	11,03	11,87	11,56	0,47
7	12,01	11,01	11,99	11,67	0,57

**Tabla 4.63.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^6)$  (implantes de 26 mg recubiertos con PLA-30 kDa al 6% con un contenido en metadona base de 13 mg).





**Figura 4.36.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^6)$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,19	0,11	0,03	0,11	0,08
0,25	0,66	0,55	0,18	0,46	0,25
1	1,88	1,46	0,77	1,37	0,56
2	2,76	3,17	3,18	3,04	0,24
3	3,52	6,67	7,08	5,76	1,95
4	5,12	9,13	9,08	7,77	2,30
5	7,52	11,15	10,81	9,83	2,01
6	9,24	11,37	11,26	10,62	1,20
7	10,39	11,38	11,45	11,07	0,59

**Tabla 4.64.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^{12})$  (a) (implantes de 26 mg recubiertos con PLA-30 kDa al 6% con un contenido en metadona base de 13 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0	0	0	0	0
0,25	0,28	0,20	0,15	0,21	0,07
1	1,54	1,61	1,23	1,46	0,20
2	4,33	4,44	3,79	4,18	0,35
3	7,64	7,64	7,16	7,48	0,27
4	9,49	9,05	8,75	9,10	0,37
5	10,14	10,04	9,49	9,89	0,35
6	10,40	10,32	9,70	10,14	0,39
7	10,59	10,59	10,06	10,41	0,30

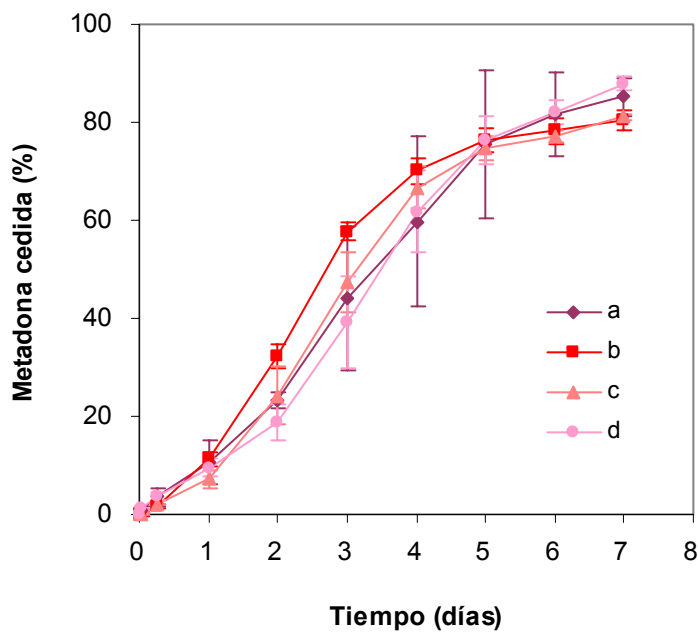
**Tabla 4.65.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^{12})$  (b) (implantes de 26 mg recubiertos con PLA-30 kDa al 6% con un contenido en metadona base de 13 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,04	0	0,02	0,02	0,02
0,25	0,25	0,26	0,25	0,25	0,01
1	0,81	1,23	0,80	0,95	0,24
2	3,36	3,83	2,28	3,16	0,80
3	6,66	6,58	5,18	6,14	0,83
4	9,24	8,70	8,05	8,66	0,60
5	10,11	9,62	9,37	9,70	0,37
6	10,27	10,01	9,84	10,04	0,22
7	10,59	10,66	10,38	10,54	0,15

**Tabla 4.66.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^{12})$  (c) (implantes de 26 mg recubiertos con PLA-30 kDa al 6% con un contenido en metadona base de 13 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,12	0,17	0,16	0,15	0,02
0,25	0,40	0,60	0,48	0,49	0,10
1	1,14	1,48	1,06	1,23	0,23
2	1,89	2,62	2,76	2,42	0,47
3	3,94	4,80	6,43	5,06	1,27
4	7,01	7,70	9,29	8,00	1,17
5	9,34	9,59	10,72	9,89	0,73
6	10,34	10,46	11,11	10,64	0,41
7	11,23	11,18	11,76	11,39	0,32

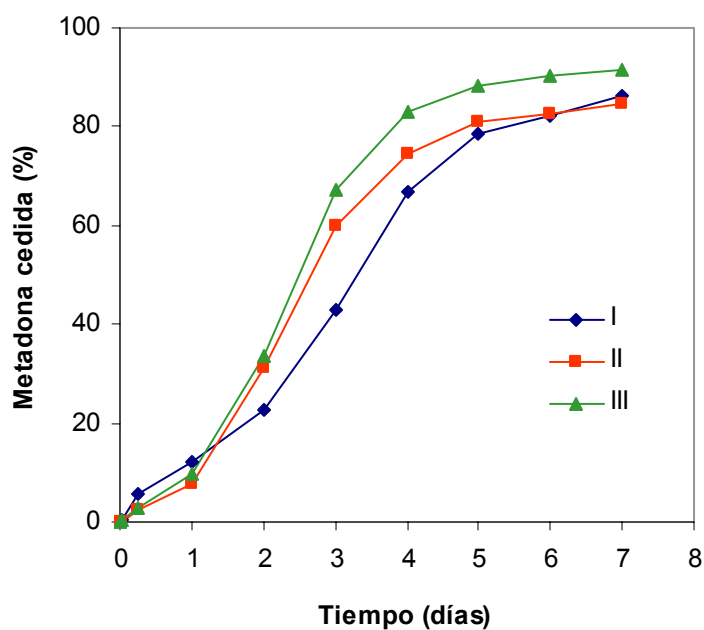
**Tabla 4.67.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^{12})$  (d) (implantes de 26 mg recubiertos con PLA-30 kDa al 6% con un contenido en metadona base de 13 mg).



**Figura 4.37.-** Replicabilidad de la cesión in vitro de metadona desde los 4 lotes de  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,04	0,03	0,04	0,04	0,01
0,25	0,73	0,33	0,36	0,47	0,22
1	1,54	1,02	1,25	1,27	0,26
2	2,94	4,06	4,38	3,79	0,76
3	5,54	7,82	8,81	7,39	1,68
4	8,59	9,72	10,87	9,73	1,14
5	10,15	10,57	11,56	10,76	0,72
6	10,62	10,79	11,82	11,08	0,65
7	11,11	11,03	11,97	11,37	0,52

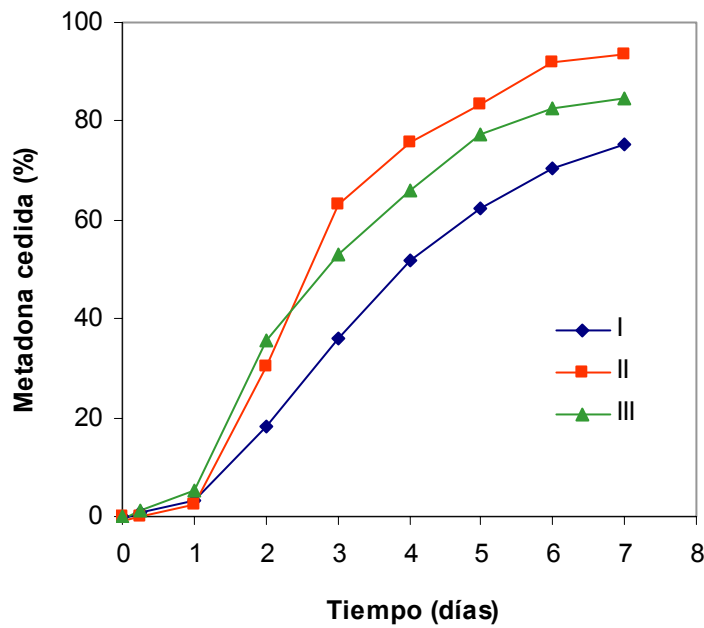
**Tabla 4.68.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{230}^6)$  (implantes de 26 mg recubiertos con PLA-230 kDa al 6% con un contenido en metadona base de 13 mg).



**Figura 4.38.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{230}^6)$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween® 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0	0	0	0	0
0,25	0,10	0,02	0,14	0,09	0,06
1	0,41	0,30	0,67	0,46	0,19
2	2,40	3,98	4,63	3,67	1,15
3	4,69	8,25	6,94	6,63	1,80
4	6,78	9,89	8,60	8,42	1,57
5	8,15	10,90	10,10	9,72	1,41
6	9,18	12,01	10,78	10,65	1,42
7	9,82	12,20	11,07	11,03	1,19

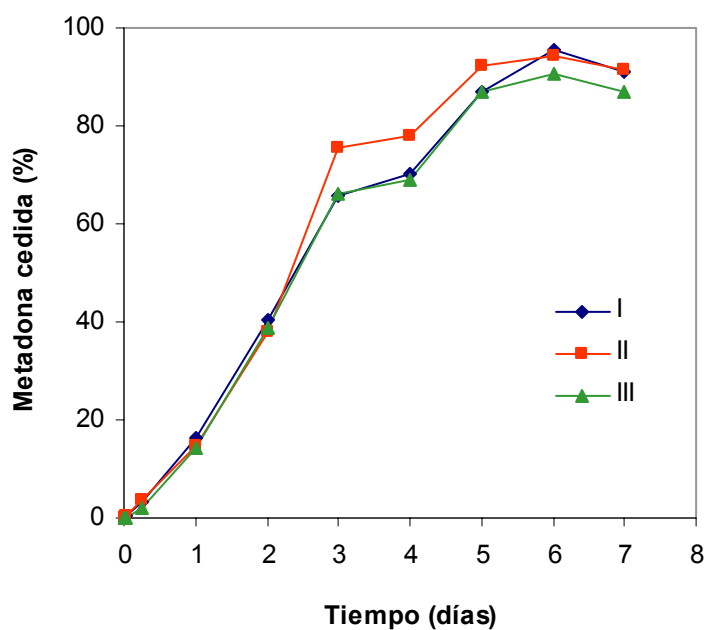
**Tabla 4.69.-** Cantidad de fármaco cedida desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{230}^{12})$  (implantes de 26 mg recubiertos con PLA-230 kDa al 12% con un contenido en metadona base de 13 mg).



**Figura 4.39.-** Cesión in vitro de metadona desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{230}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween®80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,08	0,07	0,02	0,05	0,03
0,25	0,43	0,49	0,27	0,40	0,12
1	2,11	1,91	1,86	1,96	0,13
2	5,23	4,91	5,02	5,05	0,16
3	8,51	9,80	8,57	8,96	0,73
4	9,09	10,15	8,98	9,40	0,65
5	11,28	12,01	11,28	11,52	0,42
6	12,34	12,28	11,80	12,14	0,30
7	11,79	11,91	11,30	11,67	0,32

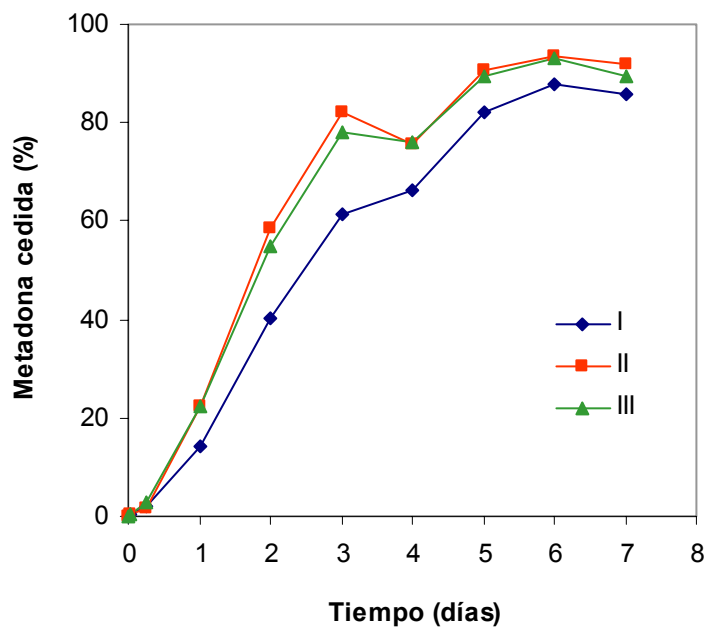
**Tabla 4.70.-** Cantidad de fármaco cedida desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (G_{12}^6)$  (implantes de 26 mg recubiertos con PLGA-12 kDa al 6% con un contenido en metadona base de 13 mg).



**Figura 4.40.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (G_{12}^6)$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween® 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,07	0,03	0,06	0,06	0,02
0,25	0,24	0,23	0,39	0,29	0,09
1	1,82	2,92	2,90	2,55	0,63
2	5,21	7,61	7,14	6,66	1,27
3	7,93	10,70	10,17	9,60	1,47
4	8,55	9,80	9,91	9,42	0,75
5	10,66	11,80	11,65	11,37	0,62
6	11,38	12,18	12,09	11,88	0,44
7	11,11	11,93	11,65	11,56	0,42

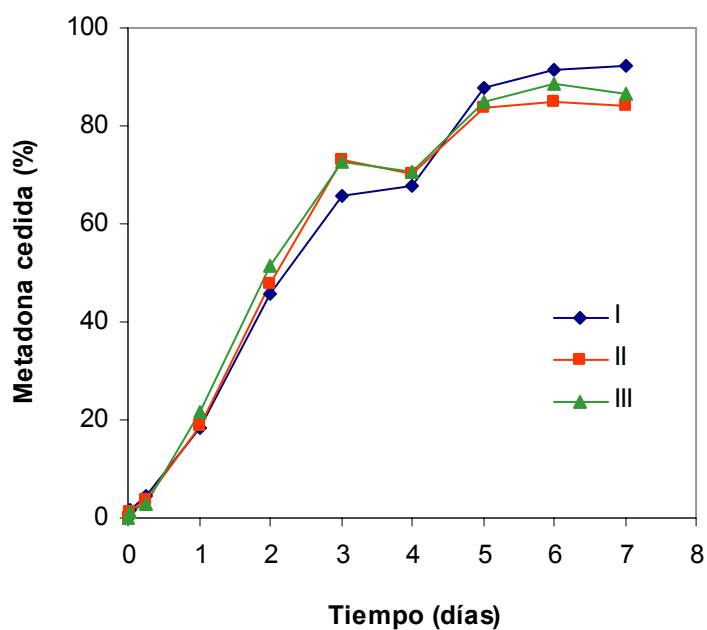
**Tabla 4.71.-** Cantidad de fármaco cedida desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (G_{12}^{12})$  (implantes de 26 mg recubiertos con PLGA-12 kDa al 12 % con un contenido de metadona base de 13 mg).



**Figura 4.41.-** Cesión in vitro de metadona desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (G_{12}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0.001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,20	0,15	0,17	0,17	0,03
0,25	0,56	0,47	0,39	0,47	0,08
1	2,39	2,41	2,84	2,55	0,25
2	5,89	6,20	6,70	6,27	0,41
3	8,49	9,48	9,44	9,14	0,56
4	8,79	9,10	9,20	9,03	0,21
5	11,34	10,81	11,02	11,06	0,27
6	11,86	10,97	11,49	11,44	0,45
7	11,93	10,88	11,25	11,35	0,53

**Tabla 4.72.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote c-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> (G<sub>96</sub><sup>6</sup>) (implantes de 26 mg recubiertos con PLGA-96 kDa al 6% con un contenido en metadona base de 13 mg).

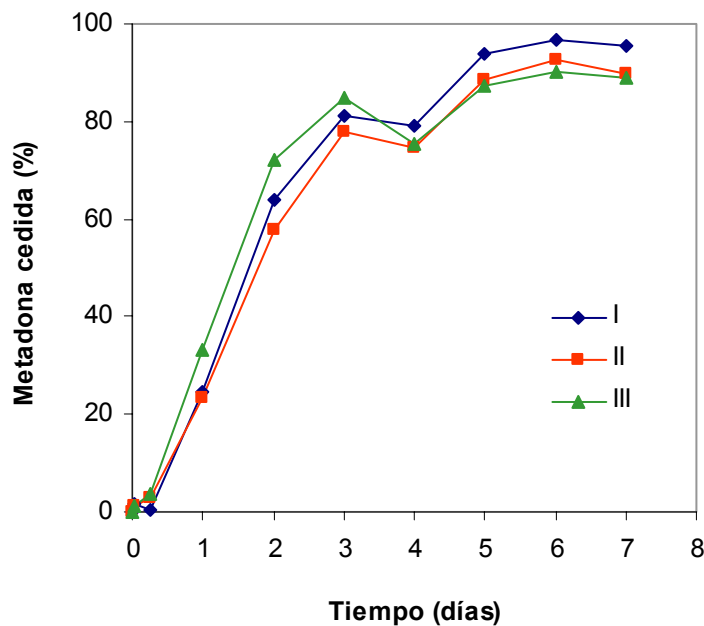


**Figura 4.42.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote c-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> (G<sub>96</sub><sup>6</sup>) en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.



Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,23	0,16	0,18	0,19	0,04
0,25	0,06	0,35	0,50	0,30	0,22
1	3,20	3,00	4,29	3,50	0,69
2	8,29	7,47	9,38	8,38	0,96
3	10,49	10,08	11,03	10,53	0,47
4	10,23	9,65	9,79	9,89	0,30
5	12,14	11,47	11,34	11,65	0,43
6	12,52	12,02	11,74	12,09	0,39
7	12,38	11,62	11,57	11,86	0,45

**Tabla 4.73.-** Cantidad de fármaco cedida desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (G_{96}^{12})$  (implantes de 26 mg recubiertos con PLGA-96 kDa al 12% con un contenido en metadona base de 13 mg).



**Figura 4.43.-** Cesión *in vitro* de metadona desde el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (G_{96}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup>80,  $\mu=0,264$ , 37°C.

#### 4.5.2.- IMPLANTES PARA UNA CESIÓN DE METADONA DE UN MES. ENSAYOS *IN VITRO*

- **Elaboración y características de implantes para un mes**

En la tabla 4.74 se recogen las características de los implantes cilíndricos de 47,5 mg y 70 mg de PLA de 30 kDa y metadona base (35:65) obtenidos utilizando una fuerza de compresión de 1 t durante 5 minutos, diseñados para la cesión sostenida de metadona durante un mes. El recubrimiento de estos implantes se realizó con 1 capa de PLA 30 kDa al 12% ó 25% en diclorometano.

Lote	Peso implante (mg)	PLA 30 kDa (%)	Met. Base (%)	Recubrimiento		
				Polímero	Mw (kDa)	(%)
C-L <sub>30</sub> <sup>35</sup> - M <sub>B</sub> <sup>65</sup>	47.5	35	65	-----	-----	-----
C-L <sub>30</sub> <sup>35</sup> - M <sub>B</sub> <sup>65</sup> (L <sub>30</sub> <sup>12</sup> )	47.5	35	65	PLA	30	12
C-L <sub>30</sub> <sup>35</sup> - M <sub>B</sub> <sup>65</sup> (L <sub>30</sub> <sup>25</sup> )	47.5	35	65	PLA	30	25
C-L <sub>30</sub> <sup>35</sup> - M <sub>B</sub> <sup>65</sup> (L <sub>30</sub> <sup>25</sup> )-70	70	35	65	PLA	30	25

**Tabla 4.74.-** Composición de los implantes cilíndricos de 47,5 mg y 70 mg elaborados con PLA 30 kDa al 35% y metadona base al 65%, sin recubrir y recubiertos con una capa de PLA 30 kDa al 12% ó 25% en diclorometano.

- **Ensayos de cesión**

Las cantidades y porcentajes de metadona cedidos desde estos lotes de implantes se muestran en las tablas 4.75-4.78 y figuras 4.44-4.47 respectivamente.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,24	0,29	0,29	0,27	0,03
0,25	2,06	2,27	2,18	2,17	0,11
1	6,86	6,18	6,61	6,55	0,34
2	10,99	11,84	10,97	11,27	0,50
3	13,28	13,77	13,53	13,53	0,24
4	16,67	16,42	15,99	16,36	0,35
5	16,75	17,18	16,87	16,93	0,22
6	18,26	18,48	18,30	18,35	0,11
7	19,39	19,23	19,73	19,45	0,26
8	21,17	20,74	20,99	20,97	0,21
11	23,37	23,20	23,88	23,48	0,35
14	25,70	25,32	26,26	25,76	0,47
17	26,78	25,22	26,59	26,20	0,85
18	27,30	26,03	27,25	26,86	0,72
21	27,82	26,75	27,92	27,49	0,65
24	26,98	25,95	27,17	26,70	0,66
27	28,08	27,73	28,52	28,11	0,39
30	28,06	27,28	28,85	28,06	0,78

**Tabla 4.75.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup> (implantes de 47,5 mg con un contenido en metadona base de 31 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,084	0,10	0,0	0,09	0,05	0,08
0,25	0,49	0,65	0,57	0,57	0,08
1	2,75	1,95	2,85	2,52	0,49
2	3,62	4,18	5,08	4,29	0,73
3	7,05	5,54	7,28	6,63	0,95
4	8,99	7,10	8,60	8,23	1,00
5	11,00	8,14	10,20	9,78	1,48
6	13,54	11,28	11,54	12,12	1,24
7	14,64	10,79	12,81	12,74	1,93
8	15,45	10,66	13,29	13,13	2,40
11	18,70	13,36	16,24	16,10	2,67
15	21,15	16,89	19,31	19,12	2,13
19	23,13	20,11	21,83	21,69	1,52
22	25,41	23,39	25,59	24,80	1,22
26	27,07	27,20	28,13	27,47	0,58
29	27,45	26,94	29,33	27,91	1,26
33	28,80	28,88	29,56	29,08	0,42

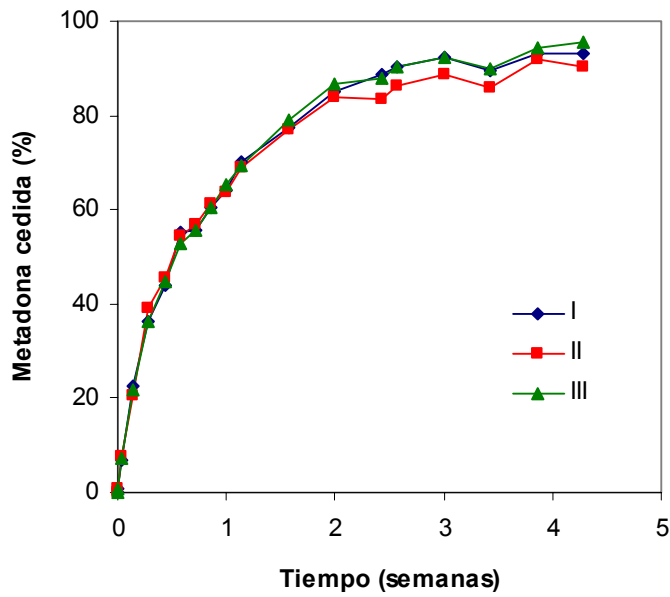
**Tabla 4.76.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{12})$  (implantes de 47,5 mg recubiertos con PLA-30 kDa al 12% con un contenido en metadona base de 31 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0	0	0	0	0
0,167	0,20	0,19	0,22	0,20	0,02
0,333	0,55	0,62	0,54	0,57	0,04
1	1,76	1,94	1,68	1,79	0,13
2	3,17	3,68	3,41	3,42	0,26
3	4,74	4,90	5,02	4,89	0,14
4	5,87	6,12	6,23	6,07	0,18
5	7,09	7,47	7,57	7,38	0,25
6	8,05	8,81	8,72	8,52	0,41
7	9,49	8,90	9,26	9,22	0,30
8	10,76	10,49	10,23	10,49	0,26
9	10,98	11,06	10,75	10,93	0,16
10	10,64	11,30	11,13	11,03	0,34
12	11,98	12,79	12,84	12,53	0,48
13	13,07	14,81	14,32	14,07	0,90
14	14,56	15,53	15,21	15,10	0,49
17	16,51	19,08	17,43	17,67	1,30
20	20,10	21,73	20,55	20,79	0,84
24	23,34	24,22	22,07	23,21	1,08
28	25,52	26,27	24,76	25,52	0,75
33	29,79	29,03	28,53	29,11	0,63
38	29,02	29,19	29,70	29,30	0,36
42	28,88	29,63	29,81	29,44	0,50

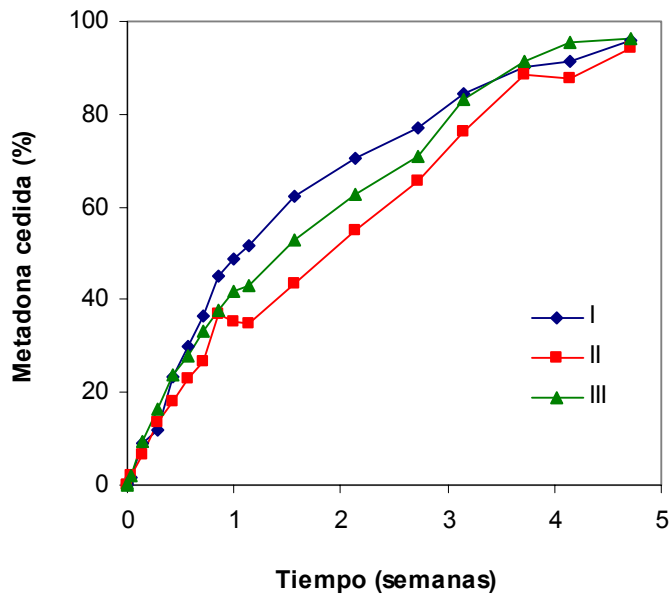
**Tabla 4.77.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25})$  (implantes de 47,5 mg recubiertos con PLA-30 kDa al 25% con un contenido de metadona base de 31 mg).

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0	0	0	0	0
0,167	0	1,23	0,35	0,53	0,63
0,333	0,29	0,64	1,05	0,66	0,38
1	1,49	2,15	2,87	2,17	0,69
2	3,38	4,31	4,90	4,20	0,77
3	4,44	5,97	7,02	5,81	1,30
4	5,41	7,27	7,96	6,88	1,32
5	6,54	9,02	9,00	8,19	1,42
6	7,36	9,57	9,95	8,96	1,40
7	8,62	10,86	11,09	10,19	1,36
9	10,69	12,76	13,23	12,23	1,35
11	12,87	15,31	15,54	14,57	1,48
13	14,69	17,32	16,70	16,24	1,38
15	17,60	18,74	18,02	18,12	0,58
18	21,52	22,29	22,08	21,96	0,40
21	26,87	26,52	25,75	26,38	0,57
25	27,16	28,67	28,87	28,23	0,93
29	31,47	33,96	34,02	33,15	1,45
33	34,13	36,25	36,31	35,56	1,24
39	41,50	42,72	44,19	42,80	1,35
43	41,98	42,91	43,06	42,65	0,59
49	45,10	43,47	42,67	43,74	1,24

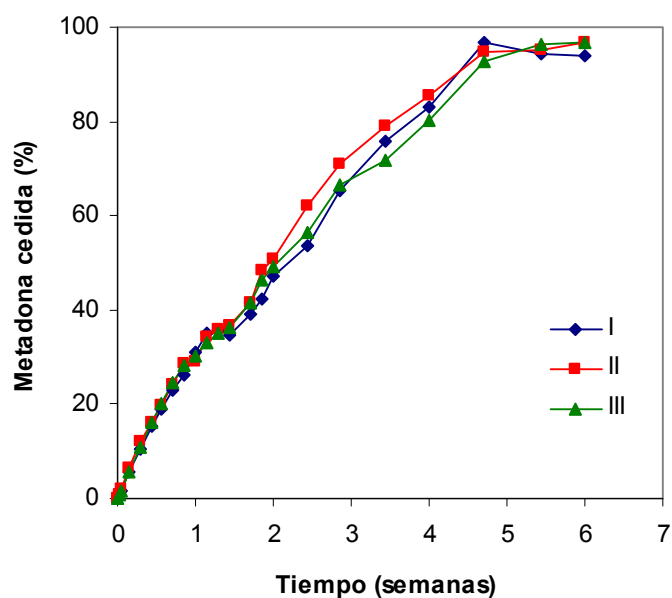
**Tabla 4.78.-** Cantidad de fármaco cedido desde el lote c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup> (L<sub>30</sub><sup>25</sup>) -70 (implantes de 70 mg recubiertos con PLA-30 kDa al 25% con un contenido en metadona base de 45,5 mg).



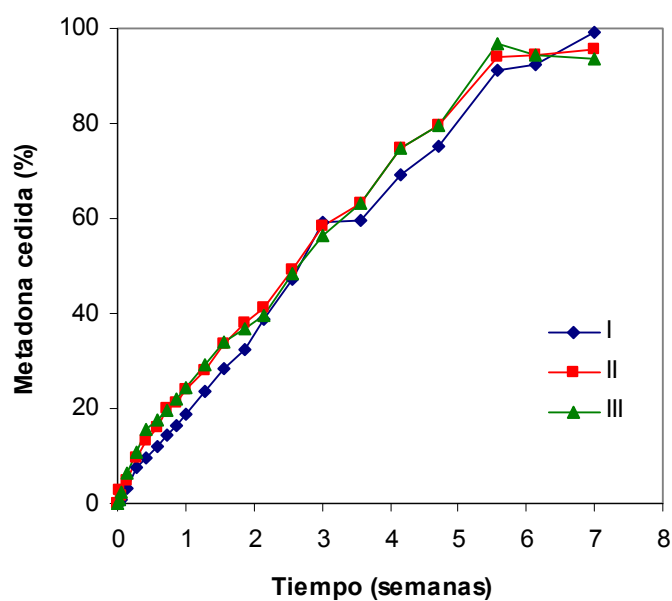
**Figura 4.44.-** Cesión in vitro de metadona desde el lote  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.



**Figura 4.45.-** Cesión in vitro de metadona desde el lote  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{12})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.



**Figura 4.46.-** Cesión in vitro de metadona desde el lote  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25})$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.



**Figura 4.47.-** Cesión in vitro de metadona desde el lote  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25})-70$  en tampón fosfato 0,066M, pH 7,4, 0,001% Tween<sup>®</sup> 80,  $\mu=0,264$ , 37°C.



### 4.5.3.- ENSAYOS *IN VIVO* CON IMPLANTES

#### 4.5.3.1- Ensayos in vivo de implantes del lote p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>

Correspondientes a implantes paralelepípedos de 10 mg de peso elaborados con un 50% de PLGA de 12 kDa y un 50% de metadona base.

##### a) Niveles séricos

En la tabla 4.79 se recogen las concentraciones de metadona en suero obtenidas tras la administración subcutánea a ratones de 30 g de un implante del lote p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> con un contenido de metadona base de 5 mg.

Tiempo (días)	Concentraciones séricas (ng/ml)							Media	Desviación típica
	I	II	III	IV	V	VI	VII		
0,04	325,4	314,2	399,6	-	-	-	-	346,4	46,4
0,17	454,5	344,9	364,3	-	-	-	-	387,9	58,4
1	105,9	133,8	185,6	293,2	141,8	113,7	109,9	154,8	66,8
2	130,4	95,0	179,0	-	-	-	-	134,8	42,2
3	216,2	257,0	106,7	190,7	144,0	158,4	160,1	176,2	49,6
4	126,9	119,1	130,4	-	-	-	-	125,5	5,8
5	65,4	86,4	147,1	22,5	33,6	57,8	45,3	65,4	41,7
6	44,8	nd	24,3	-	-	-	-	23,0	22,43
7	nd	nd	nd	-	-	-	-	-	-

nd: no detectable

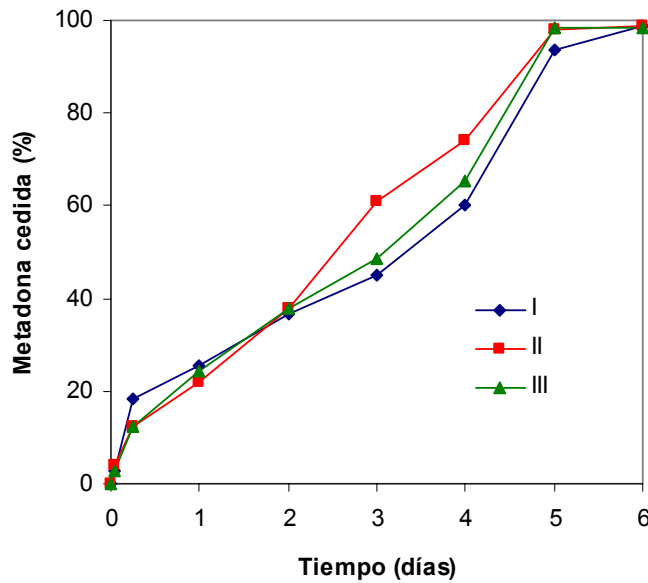
**Tabla 4.79.-** Concentraciones séricas medias y desviaciones típicas obtenidas tras la implantación subcutánea de un implante del lote p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>, conteniendo una dosis de 5 mg de metadona base. Las columnas I, II y III corresponden a muestras tomadas simultáneamente con el experimento de determinaciones de niveles de metadona en cerebro y las cuatro restantes al experimento de respuesta neuronal

### b) Cantidades cedidas *in vivo*

La tabla 4.80 y figura 4.48 recogen los resultados de cesión a lo largo de 6 días desde los implantes  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  calculados a partir de la valoración del fármaco remanente en los implantes retirados del tejido subcutáneo. Estos mismos resultados estimados por deconvolución empleando las funciones de absorción disposición obtenidas tras la administración de dosis únicas y dosis múltiples se muestran en la tabla 4.81.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,042	0,14	0,20	0,15	0,16	0,03
0,25	0,92	0,62	0,63	0,72	0,17
1	1,28	1,10	1,22	1,20	0,09
2	1,84	1,89	1,90	1,88	0,03
3	2,26	3,04	2,43	2,58	0,41
4	3,00	3,71	3,27	3,33	0,36
5	4,69	4,90	4,92	4,84	0,13
6	4,93	4,94	4,93	4,93	0,00

**Tabla 4.80.-** Cantidad de fármaco cedido *in vivo* desde los  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$ , conteniendo 5 mg de metadona base calculadas a partir de las cantidades remanentes.



**Figura 4.48.-** Porcentajes de metadona cedida in vivo desde implantes del lote  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  calculados a través de la valoración de las cantidades remanentes.

tiempo (días)	Cantidades cedidas (mg)			
	6 mg/kg		12 mg/kg	
	Dosis única	Dosis repetidas	Dosis única	Dosis repetidas
0,042	0,066	0,110	0,039	0,090
0,25	0,414	0,608	0,283	0,561
1	2,02	2,83	1,49	2,77
2	3,05	4,27	2,26	4,19
3	4,17	5,83	3,10	5,73
4	5,25	7,33	3,90	7,21
5	5,93	8,28	4,41	8,14
6	6,24	8,71	4,65	8,58

**Tabla 4.81.-** Cantidades cedidas estimadas por deconvolución tras la administración subcutánea de implantes del lote  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  empleando la función característica obtenida para 6 y 12 mg/kg en dosis única y dosis repetidas.

### c) Niveles en cerebro

En la tabla 4.82 se recogen los niveles de metadona valorados por TDX en los homogeneizados de cerebros previa resección del cerebelo.

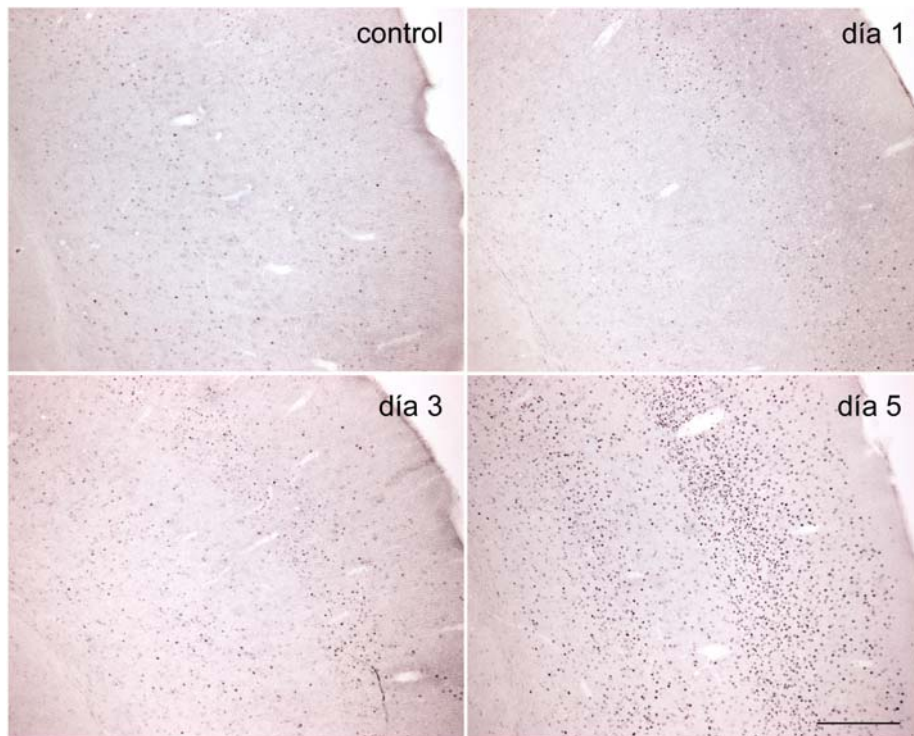
Tiempo (días)	Concentración en cerebro (ng/g)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,17	626,6	701,2	689,3	672,4	40,1
1	193,3	265,9	253,5	237,6	38,8
3	489,6	443,5	236,2	389,8	134,9
5	215,9	148,5	102,8	155,7	56,9
7	148,6	5,9	nd	51,5	84,1

nd: no detectable

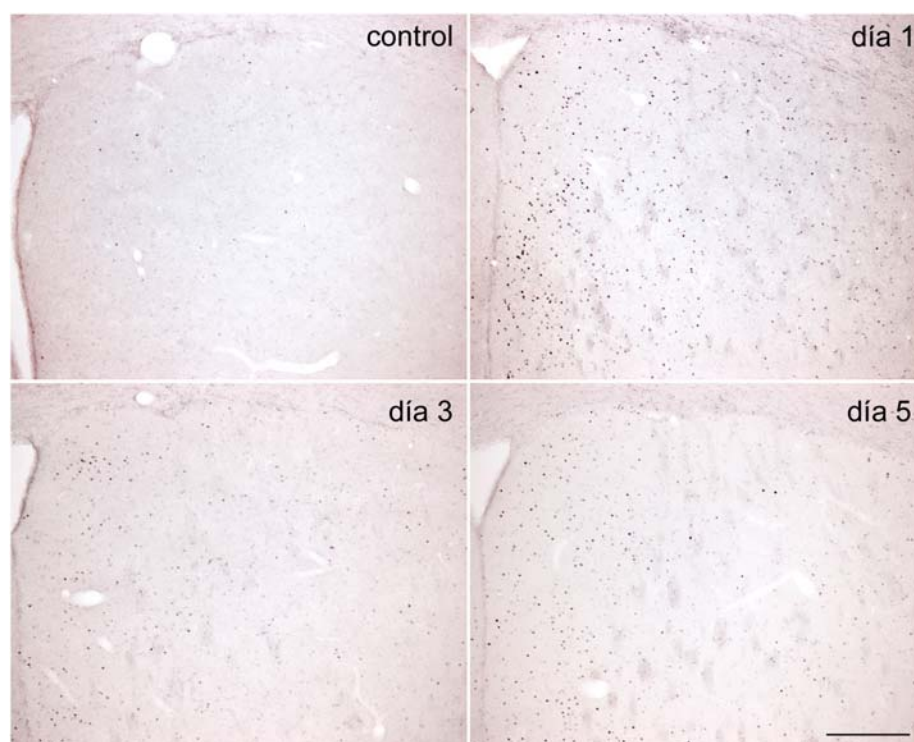
**Tabla 4.82.-** Concentraciones en cerebro y desviaciones típicas obtenidas tras la administración subcutánea de implantes del lote p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>, conteniendo una dosis de 5 mg de metadona base.

### d) Niveles c-fos. Implantes p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>

En las figuras 4.49 y 4.50 se muestran los resultados de la reacción inmunohistoquímica en estriado y corteza parietal respectivamente después de 1, 3 y 5 días de la administración subcutánea del implante p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>.



**Figura 4.49.-** Microfotografías de tinciones inmunohistoquímicas que ilustran la expresión de c-fos en la corteza parietal inducida tras la administración subcutánea de implantes de metadona, lote p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>. Cortes (30 μm de grosor) de cerebro de ratón. Barra de calibrado = 250 μm.



**Figura 4.50.-** Microfotografías de tinciones inmunohistoquímicas que ilustran la expresión de *c-fos* en la parte dorsal del estriado inducida tras la administración subcutánea de implantes de metadona, lote  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$ . Cortes ( $30\ \mu\text{m}$  de grosor) de cerebro de ratón. Barra de calibrado =  $250\ \mu\text{m}$ .

#### 4.5.3.2.- Ensayos in vivo de implantes del lote c-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>

Correspondientes a implantes cilíndricos con peso de 26 mg elaborados con un 50% de PLGA de 12 kDa y un 50% de metadona base.

##### a) Niveles séricos

En la tabla 4.83 se recogen las concentraciones de metadona en suero obtenidas tras la administración subcutánea a ratones de un implante del lote c-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>.

Tiempo (días)	Concentración en suero (ng/ml)				Media	Desviación típica
	I	II	III	IV		
0,04	957,3	741,3	1081,4	1164,0	986,0	184,0
0,08	1216,7	1016,2	1243,5	1208,1	1171,1	104,4
0,17	1471,3	1437,0	992,8	1330,9	1308,0	218,5
0,25	1486,6	1222,6	1353,7	1534,6	1399,4	140,5
0,50	-	503,8	1565,2	1215,6	1094,8	540,9
0,63	629,0	620,7	593,0	-	614,2	18,9
0,75	463,8	603,7	1239,4	432	684,7	377,2
0,83	417,8	545,7	620,5	-	528,0	102,5
1	358,2	466,0	361,3	367,9	388,4	51,9
2	242,8	242,2	160,3	137,4	195,7	54,9
3	208,9	258,9	239,4	299,7	251,7	38,1
4	231,9	439,3	225,8	361,8	314,7	104,1
5	241,2	114,2	220,3	118,3	173,5	66,7
6	17,3	7,7	21,7	nd	11,7	9,7

nd: no detectable

**Tabla 4.83.-** Concentraciones séricas y desviaciones típicas obtenidas tras la administración subcutánea de un implante del lote c-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> conteniendo una dosis de 13 mg de metadona base.

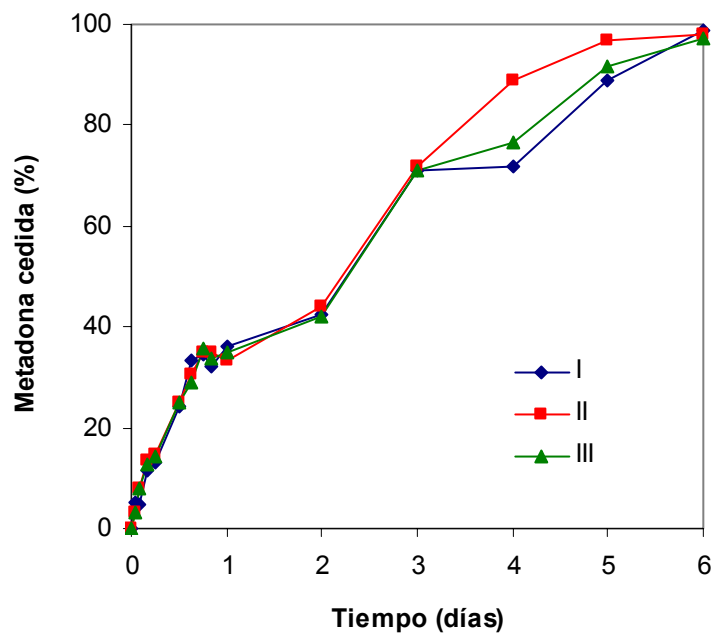
### b) Cantidades cedidas *in vivo*

La tabla 4.84 y figura 4.51 recogen los resultados de cesión a lo largo de 6 días desde los implantes  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  calculados a partir de la valoración del fármaco remanente en los implantes retirados del tejido subcutáneo. En la tabla 4.85 se muestran las cantidades cedidas *in vivo* estimadas por deconvolución empleando las funciones características obtenidas tras la administración de dosis únicas y dosis múltiples por vía subcutánea.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,04	0,66	0,41	0,42	0,50	0,14
0,08	0,63	1,04	1,03	0,90	0,23
0,17	1,49	1,74	1,63	1,62	0,12
0,25	1,72	1,90	1,88	1,83	0,10
0,50	3,16	3,25	3,26	3,23	0,05
0,63	4,37	4,00	3,80	4,05	0,29
0,75	4,47	4,56	4,66	4,56	0,10
0,83	4,18	4,56	4,42	4,39	0,19
1	4,71	4,33	4,56	4,53	0,19
2	5,50	5,75	5,46	5,57	0,15
3	9,27	9,35	9,23	9,28	0,06
4	9,34	11,59	9,98	10,30	1,16
5	11,60	12,61	11,93	12,05	0,52
6	12,84	12,78	12,67	12,77	0,09

**Tabla 4.84.-** Cantidades de fármaco cedidas *in vivo* desde implantes del lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$ , con un contenido en metadona base de 13 mg, calculadas a partir de las cantidades remanentes.





**Tabla 4.51.-** Porcentajes de metadona cedidos in vivo desde implantes del lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  calculados a través de la valoración de las cantidades remanentes.

tiempo (días)	Cantidades cedidas (mg)			
	6 mg/kg		12 mg/kg	
	Dosis única	Dosis repetidas	Dosis única	Dosis repetidas
0,04	0,188	0,314	0,111	0,257
0,08	0,557	0,865	0,353	0,753
0,17	1,32	1,94	0,900	1,79
0,25	2,14	3,09	1,50	2,91
0,50	4,36	6,16	3,17	5,96
0,63	5,09	7,15	3,74	6,97
0,75	5,66	7,95	4,17	7,77
0,83	6,00	8,42	4,43	8,23
1	6,54	9,16	4,85	8,98
2	8,62	12,04	6,41	11,84
3	10,23	14,29	7,63	14,05
4	12,26	17,14	9,12	16,85
5	14,00	19,55	10,42	19,24
6	14,65	20,44	10,91	20,14

**Tabla 4.85.-** Cantidades cedidas estimadas por deconvolución tras la administración subcutánea de implantes del lote c-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> empleando la función característica obtenida para 6 y 12 mg/kg en dosis única y dosis repetidas.

#### 4.5.3.3.- Ensayos *in vivo* de implantes del lote c-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> (L<sub>30</sub><sup>6</sup>)

Correspondientes a implantes cilíndricos de 26 mg de peso elaborados con un 50% de PLGA de 12 kDa y un 50% de metadona base recubiertos con PLA de 30 kDa al 6% en diclorometano.

##### a) Niveles séricos

En la tabla 4.86 se recogen las cantidades de metadona en suero obtenidas tras la administración subcutánea a ratones de implantes del lote c-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> (L<sub>30</sub><sup>6</sup>), que contienen 13 mg de metadona base.

Tiempo (días)	Concentración en suero (ng/ml)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,17	613,9	819,9	452,0	628,5	184,4
1	536,8	281,0	403,8	407,2	180,9
3	285,3	375,5	285,0	329,5	45,1
5	205,6	213,7	220,6	213,3	7,5
7	28,6	59,7	48,9	45,7	15,5

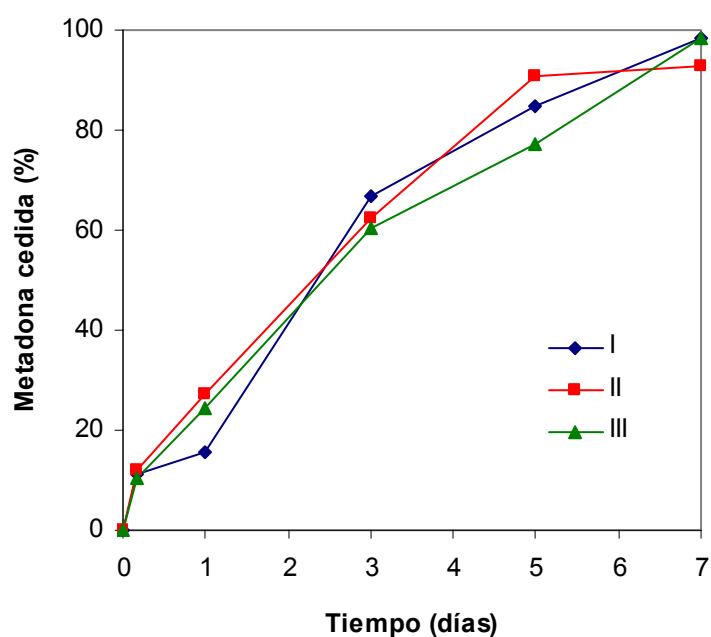
**Tabla 4.86.-** Concentraciones séricas y desviaciones típicas obtenidas tras la administración subcutánea de implantes del lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^6)$  que contienen una dosis de 13 mg de metadona base.

#### b) Cantidades cedidas *in vivo*

La tabla 4.87 y figura 4.52 recogen los resultados de cesión a lo largo de 6 días desde los implantes  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^6)$  calculados a partir de la valoración del fármaco remanente en los implantes retirados del tejido subcutáneo. Las cantidades cedidas estimadas por deconvolución usando las funciones características correspondientes a dosis únicas y múltiples se muestran en la tabla 4.88.

Tiempo (días)	Cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,17	1,45	1,59	1,34	1,46	0,12
1	2,04	3,53	3,18	2,91	0,78
3	8,67	8,13	7,84	8,22	0,42
5	11,05	11,82	10,04	10,97	0,89
7	12,81	12,08	12,83	12,57	0,43

**Tabla 4.87.-** Cantidades de fármaco cedidas *in vivo* desde implantes del lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^6)$ , conteniendo una dosis de 13 mg de metadona base, calculadas a partir de los remanentes.



**Figura 4.52.-** Porcentajes de metadona cedida in vivo, calculados a partir de las cantidades remanentes, desde implantes del lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^6)$ .

tiempo (días)	Cantidades cedidas (mg)			
	6 mg/kg		12 mg/kg	
	Dosis única	Dosis repetidas	Dosis única	Dosis repetidas
0,17	0,430	0,645	0,285	0,581
1	3,50	4,92	2,58	4,80
3	8,78	12,27	6,52	12,06
5	12,66	17,68	9,42	17,39
7	14,50	20,24	10,80	19,93

**Tabla 4.88.-** Cantidades cedidas estimadas por deconvolución tras la administración subcutánea de implantes del lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^6)$  empleando la función característica obtenida para 6 y 12 mg/kg en dosis única y dosis repetidas.

#### 4.5.3.4.- Ensayos in vivo con implantes del lote c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup> (L<sub>30</sub><sup>25</sup>) -70.

Ensayos correspondientes a implantes cilíndricos con un peso de 70 mg, elaborados con un 35% de PLA de 30 kDa y un 65% de metadona base recubiertos con PLA de 30 kDa al 25% en diclorometano, conteniendo 45,5 mg de metadona base.

##### a) Niveles séricos

En la tabla 4.89 se recogen las concentraciones de metadona en suero obtenidas tras la administración subcutánea a ratones de dos implantes del lote c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup> (L<sub>30</sub><sup>25</sup>) -70.

Tiempo (días)	Concentración en suero (ng/ml)							Media	Desviación típica
	I	II	III	IV	V	VI	VII		
0,17	707,9	792,2	544,6	796,5	653,0	798,6	945,0	748,3	127,6
1	-	602,5	284,4	571,3	306,4	191,3	426,3	397,1	165,3
3	207,1	241,4	784,8	-	-	-	-	411,1	324,0
7	167,9	149,5	114,9	125,0	176,8	148,6	164,0	149,5	22,7
10	105,1	118,2	145,6	-	-	-	-	123,0	20,7
14	153,1	95,5	96,5	107,8	113,4	106,1	107,9	111,5	19,5
17	154,1	96,1	156,2	-	-	-	-	135,4	34,1
21	292,7	124,5	81,5	187,5	172,1	151,6	92,7	157,5	71,3
24	168,1	316,9	329,3	-	-	-	-	271,4	89,7
28	258,4	204,4	368,6	345,7	270,3	227,5	126,1	257,3	82,9
35	136,5	220,8	100,9	131,3	93	80	85	121,1	49,1
42	123,4	51,0	118,9	nd	53,3	95	39,6	68,7	45,3

nd: no detectable

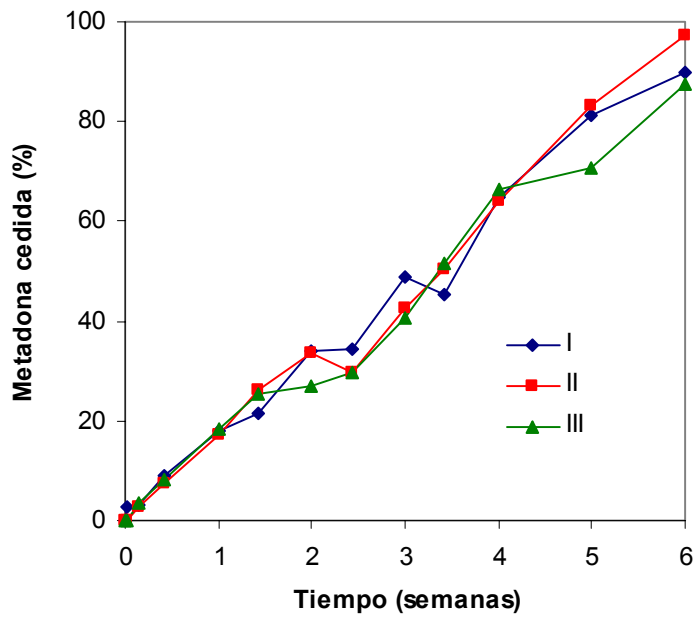
**Tabla 4.89.-** Concentraciones séricas medias y desviaciones típicas obtenidas tras la implantación subcutánea de 2 c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup> (L<sub>30</sub><sup>25</sup>) -70, con una dosis total de metadona base de 91 mg. Las columnas I, II y III corresponden a muestras tomadas simultáneamente con el experimento de determinaciones de niveles de metadona en cerebro y las cuatro restantes al experimento de respuesta neuronal.

### b) Cantidades cedidas *in vivo*

La tabla 4.90 y la figura 4.53 recogen los resultados de cesión a lo largo de 6 semanas desde los implantes  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}(L_{30}^{25})-70$  calculados a partir de la valoración del fármaco remanente en los implantes retirados del tejido subcutáneo. Las cantidades cedidas estimadas por deconvolución empleando las funciones características obtenidas tras la administración de dosis únicas y dosis múltiples se muestran en la tabla 4.91.

Tiempo (días)	cantidad cedida (mg)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,17	2,36	0	0	0,79	1,36
1	2,94	2,44	3,16	2,85	0,37
3	8,23	6,71	7,43	7,45	0,76
7	16,22	15,62	16,82	16,22	0,60
10	19,64	23,82	23,11	22,19	2,24
14	30,87	30,49	24,63	28,67	3,50
17	31,14	27,07	26,97	28,39	2,38
21	44,58	38,87	36,99	40,15	3,96
24	41,40	45,74	46,75	44,63	2,84
28	58,91	58,26	60,50	59,22	1,15
35	74,02	75,83	64,17	71,34	6,28
42	81,62	88,58	79,52	83,24	4,74

**Tabla 4.90.-** Cantidades de metadona cedida *in vivo* tras la administración de 2 implantes  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}(L_{30}^{25})-70$ , con un contenido total de metadona base de 91 mg, estimadas a partir de la valoración de la metadona remanente en los implantes.



**Figura 4.53.-** Porcentajes de metadona cedida in vivo tras la administración de 2 implantes  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25}) - 70$  estimados a partir de la metadona remanente en los implantes.

tiempo (días)	Cantidades cedidas (mg)			
	6 mg/kg		12 mg/kg	
	Dosis única	Dosis repetidas	Dosis única	Dosis repetidas
0,17	0,502	0,755	0,333	0,680
1	3,90	5,48	2,88	5,36
3	9,73	13,61	7,22	13,36
7	17,72	24,75	13,20	24,36
10	20,66	28,84	15,39	28,40
14	24,01	33,52	17,89	33,01
17	26,68	37,24	19,87	36,67
21	30,87	43,09	22,99	43,43
24	35,50	49,58	26,44	48,80
28	43,06	60,13	32,08	59,20
35	52,55	73,35	39,15	72,24
42	57,30	79,98	42,70	78,78

**Tabla 4.91.-** Cantidades cedidas estimadas por deconvolución tras la administración subcutánea de 2 implantes  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}(L_{30}^{25})-70$  empleando la función característica obtenida para 6 y 12 mg/kg en dosis única y dosis repetidas.

### c) Niveles en cerebro

Los resultados de la valoración de metadona, después de la implantación de 2 unidades de  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}(L_{30}^{25})-70$ , en los homogeneizados de cerebro a los que se les ha retirado el cerebelo, se encuentran recogidos en la tabla 4.92.

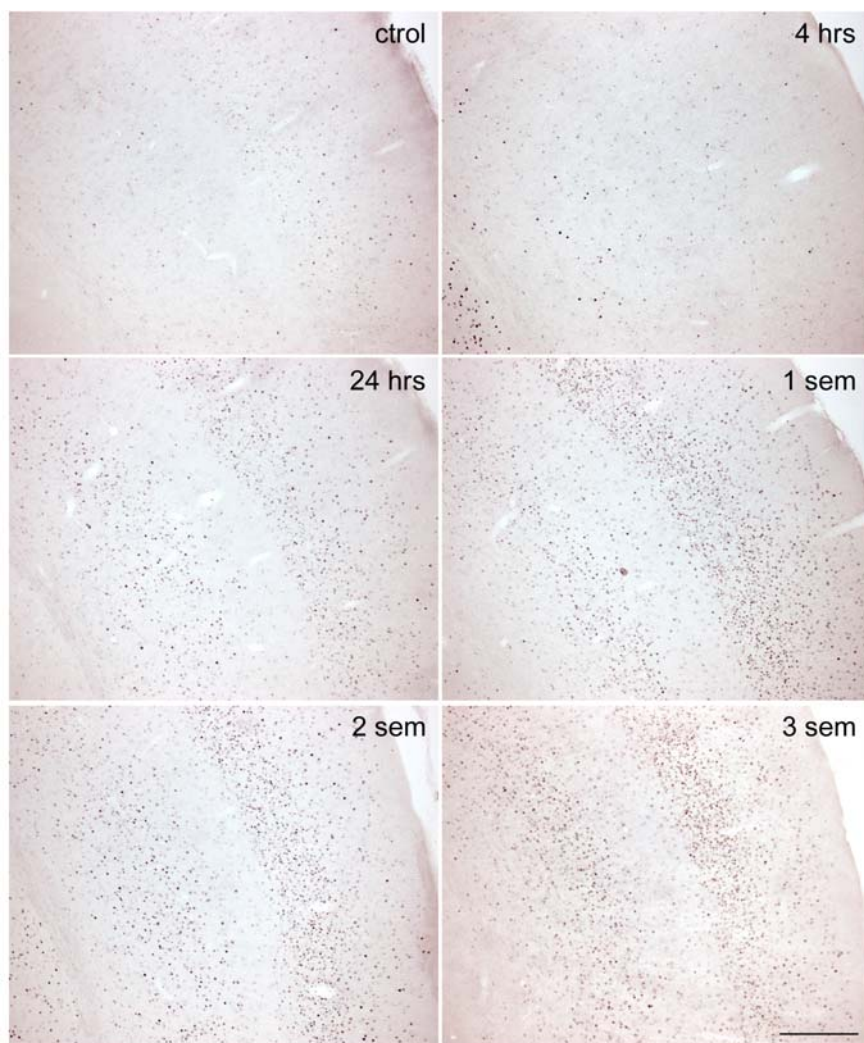


Tiempo (días)	Concentración en cerebro (ng/g)			Media	Desviación típica
	I	II	III		
0,17	986,7	1101,7	830,7	973,1	136,0
1	1093,2	642,2	494,1	743,2	312,1
3	1176,4	871,1	700,8	916,1	241,0
7	134,7	182,1	190,9	169,3	30,3
10	299,7	253,4	379,5	310,9	63,8
14	115,6	120,9	113,9	116,8	3,7
17	120,6	250,1	166,3	179,0	65,7
21	660,3	475,7	599,4	578,5	94,01
24	292,0	493,3	719,7	501,6	214,0
28	415,3	439,9	157,7	337,7	156,3
35	440,9	671,7	568,6	560,4	115,6
42	486,5	506,6	483,4	492,2	12,6

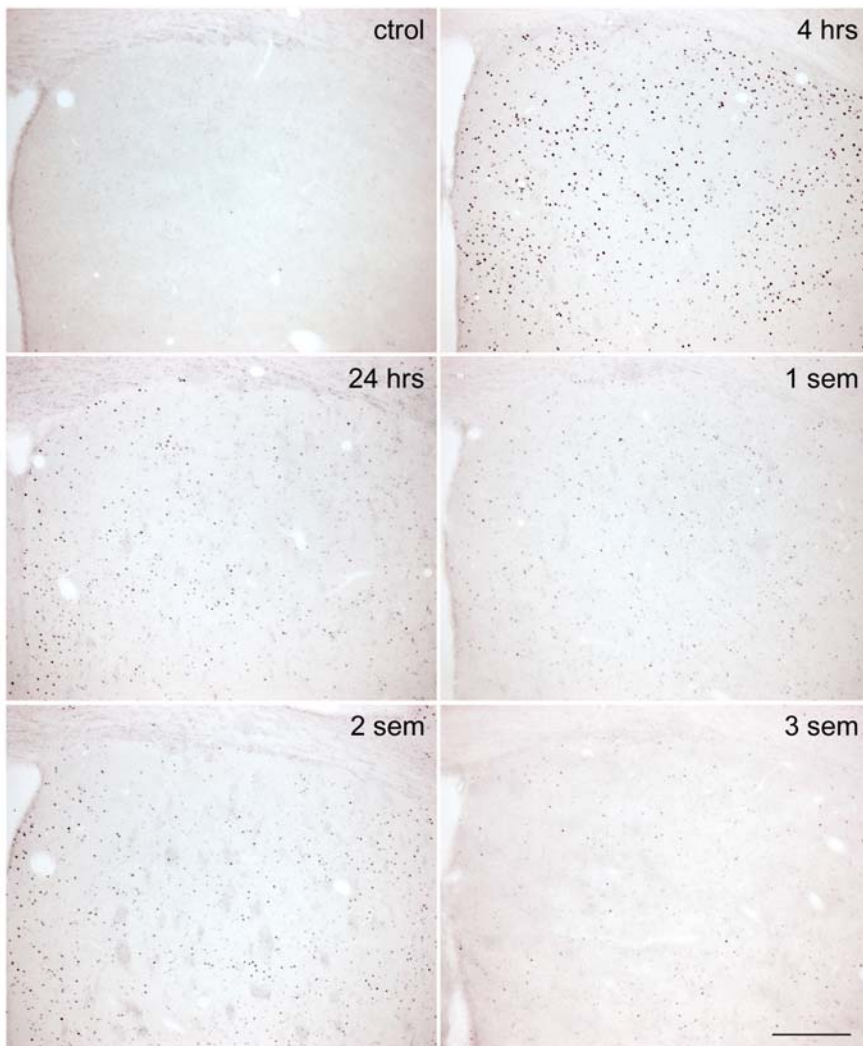
**Tabla 4.92.-** Niveles de metadona en cerebro homogeneizado de ratón tras la implantación de 2 unidades de  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25}) -70$ , con un contenido total de 91 mg de metadona base.

#### d) Niveles c-fos. Implantes un mes

En las figuras 4.54 y 4.55 se muestran los resultados de la reacción inmunohistoquímica para c-Fos en estriado y corteza parietal respectivamente correspondientes a 4 y 24 horas, 1, 2, y 3 semanas, después de la administración de 2 implantes  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25}) -70$ .



**Figura 4.54.-** Microfotografías de tinciones inmunohistoquímicas que ilustran la expresión de *c-fos* en la corteza parietal inducida tras la administración subcutánea de 2 implantes de metadona, lote  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25}) -70$ . Cortes (30 μm de grosor) de cerebro de ratón. Barra de calibrado = 250 μm.



**Figura 4.55.-** Microfotografías de tinciones inmunohistoquímicas que ilustran la expresión de *c-fos* en la parte dorsal del estriado inducida tras la administración subcutánea de 2 implantes de metadona, lote  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25}) -70$ . Cortes ( $30 \mu\text{m}$  de grosor) de cerebro de ratón. Barra de calibrado =  $250 \mu\text{m}$ .

## **DISCUSIÓN**

## 5.- DISCUSIÓN

### 5.1.- Farmacocinética de la d,l-metadona en ratón

Tal y como hemos planteado, el objetivo de esta memoria es la obtención de una formulación de cesión sostenida de metadona para periodos prolongados, destinada al tratamiento de mantenimiento con metadona (TMM) para heroinómanos. Por ello, el primer paso que se abordó fue el estudio de la farmacocinética en ratón, animal de experimentación elegido. Sin embargo, hay que tener en cuenta que aunque las características de distribución de la metadona en humanos y pequeños animales de laboratorio son similares, no ocurre lo mismo con la eliminación. Se ha publicado que el aclaramiento medio en ratas es de 6 l/h/kg frente a valores de aclaramiento en humanos menores, en el intervalo de 0,186 a 0,093 l/h/kg para adictos a opiáceos y pacientes con dolor crónico respectivamente (Änggard *et al.*, 1975; Inturrisi *et al.*, 1987). Estas diferencias entre especies son probablemente debidas a diferencias en la expresión de las distintas isoformas del CYP en el metabolismo de la metadona (Garrido y Trocóniz, 1999).

Para llevar a cabo el estudio de la farmacocinética se administraron dosis de clorhidrato de metadona en disolución, equivalentes a 6 y 12 mg/kg de metadona base, por vía subcutánea en el lomo de ratones. Los datos se ajustaron a un modelo bicompartimental, obteniéndose las expresiones siguientes para 6 (ec. 5.1) y 12 mg/kg (ec. 5.2):

$$C_s = 326,9 e^{-1,948 t} + 276,8 e^{-0,559 t} - 603,7 e^{-9,772 t} \quad (\text{ec. 5.1})$$

$$C_s = 7689,1 e^{-4,160 t} + 407,9 e^{-0,329 t} - 8097,0 e^{-5,500 t} \quad (\text{ec. 5.2})$$

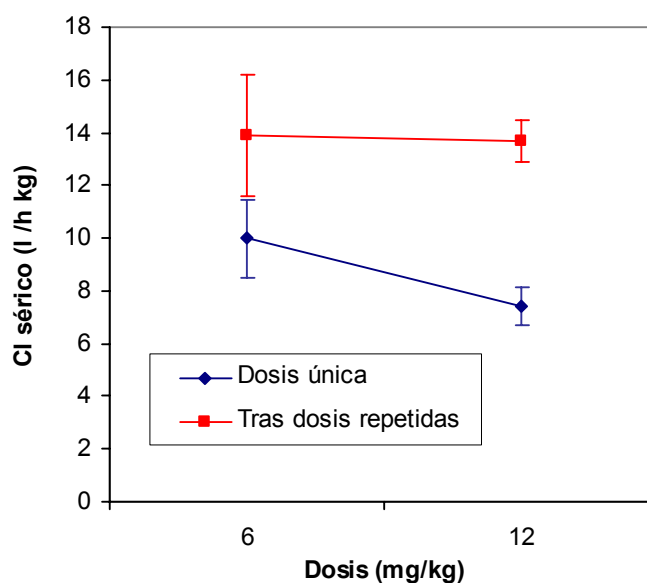
El aclaramiento sérico (Cl<sub>s</sub>) estimado para la dosis de 6 mg/kg fue de 10 l/h/kg y el correspondiente a la dosis de 12 mg/kg de 7,4 l/h/kg,

aclareamientos significativamente diferentes ( $p < 0,05$ ) y superiores, en ambos casos, al valor de 6 l/h/kg reseñado en la literatura para ratas (Garrido y Trocóniz, 1999). Estos resultados parecen indicar una cierta dependencia de la eliminación con la dosis, este fenómeno podría ser debido a algún proceso saturable que limita la eliminación. Teniendo en cuenta que con el sistema de cesión sostenida se persigue una liberación continua del fármaco, y que se ha documentado en la bibliografía la posibilidad de una autoinducción enzimática hepática (Rostami-Hodjegan *et al.*, 1999; Wolff *et al.*, 2000), se procedió al estudio de la farmacocinética con dosis repetidas. Para ello, se administraron dosis de 12 mg/kg cada 12 horas durante 4 días. Transcurrido este tiempo se administraron de nuevo las dosis de 6 y 12 mg/kg y los resultados se ajustaron a las ecuaciones 5.3 y 5.4 respectivamente:

$$C_s = 13637,2e^{-7,003t} + 223,1e^{-0,705t} - 13860,3e^{-7,565t} \quad (\text{ec. 5.3})$$

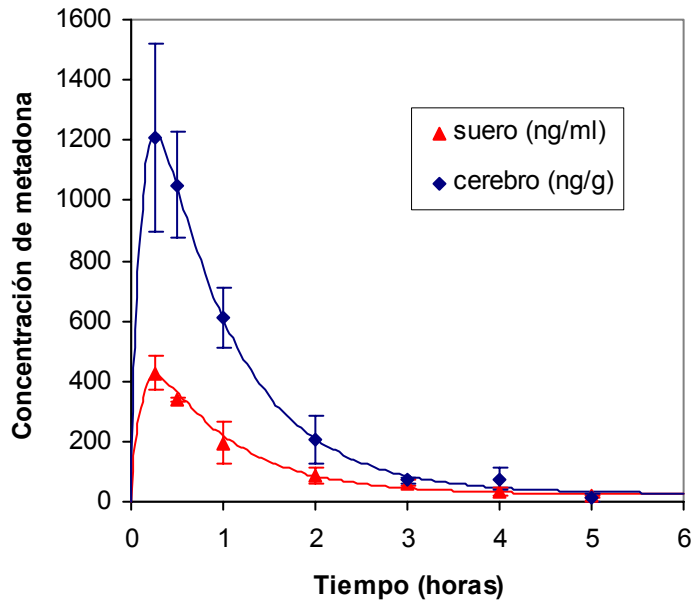
$$C_s = 2546,2e^{-3,802t} + 567,0e^{-0,837t} - 3113,2e^{-6,615t} \quad (\text{ec. 5.4})$$

La estimación de los aclareamientos puso en evidencia el proceso de autoinducción enzimática con valores de 13,9 y 13,7 l/h/kg para las dosis de 6 y 12 mg/kg respectivamente y la independencia de la dosis administrada. Los resultados se ilustran en la figura 5.1. Por tanto, para ambas dosis, los aclareamientos estimados después de la administración de dosis múltiples son significativamente superiores ( $p < 0,05$ ) a los estimados con dosis únicas y una vez inducido el metabolismo de la metadona no existen diferencias entre los aclareamientos para distintas dosis.



**Figura 5.1.-** Variación del aclaramiento sérico estimado con dosis única y dosis múltiples

Los niveles de fármaco en cerebro y suero fueron determinados simultáneamente administrando la dosis de 6 mg/kg por vía subcutánea (tablas 4.7. y 4.8). El ajuste al modelo bicompartimental propuesto (tablas 4.9 y 4.10) se muestra en la figura 5.2. En este modelo se ha considerado que la cantidad de metadona en cerebro forma parte del compartimento periférico, ya que, a pesar de que las concentraciones en cerebro son muy elevadas, la cantidad presente en el mismo es muy pequeña. La relación de áreas bajo la curva de concentraciones en cerebro/concentraciones séricas resultó ser de 2,6 valor inferior al aportado por Gabrielson *et al.* (1985) pero que confirma la mayor afinidad de la metadona por cerebro.



**Figura 5.2.-** Perfiles de las curvas ajustadas de suero y cerebro al modelo triexponencial propuesto y las concentraciones medias con sus desviaciones típicas obtenidas tras la administración de una dosis de 6 mg/kg.

## 5.2.- Respuesta neuronal

La valoración de la respuesta a nivel neuronal, tal y como se explicó en el apartado de materiales y métodos, se realizó mediante la expresión del c-fos. La expresión de la proteína c-Fos en el núcleo de las neuronas se determinó mediante inmunohistoquímica con un anticuerpo policlonal específico contra c-Fos. En primer lugar, con la dosis de 12 mg/kg se realizó la curva tiempo-respuesta y se determinó el tiempo al cual se obtiene la respuesta máxima, que se fijó en 1 hora. Se observó que en este tiempo el número de células que expresaban la proteína fue el máximo. La expresión de la proteína se mantuvo a las 2 horas y a las 4 horas se observó una clara disminución. A las 8 horas después de la administración de metadona la expresión de c-fos fue similar a la basal y los mismos resultados se



observaron a las 10,5 y 24 horas. Por tanto, estos resultados indican que la expresión de c-fos es rápida y transitoria, ya que al cabo de 6-8 horas disminuye hasta valores basales. Además, la cinética de inducción de c-fos resultó ser similar a la obtenida por Moratalla *et al.* (1993) utilizando cocaína como estímulo en vez de metadona o por Gardier *et al.* (2000) que utilizaron desfenfluramina (inhibidor de la recaptación de serotonina). De ello se deduce que la cinética de inducción y mantenimiento de la proteína c-Fos en dosis agudas es similar y, por tanto, independiente del estímulo que la haya inducido.

Con la dosis de 12 mg/kg, la intensidad de expresión de c-fos fue homogénea en el estriado, corteza y núcleo accumbens (figura 4.3), sin embargo, en el tubérculo olfatorio se detectó un ligero incremento con respecto a los núcleos antes citados. En el estriado, la expresión de c-fos se concentró principalmente en la parte dorsomedial, aunque en la parte más rostral del estriado la inducción de c-fos se extendió más ventralmente (figura 4.7). La distribución anatómica de la expresión de c-fos fue altamente heterogénea con parches de expresión, cuyas medidas se sitúan entre 50-200  $\mu\text{m}$  de ancho por 75-400  $\mu\text{m}$  de largo, distribuidos a lo largo del estriado. Estos parches o grupos de células que expresan c-fos se distribuyeron por toda la parte dorsal del estriado siguiendo una disposición inclinada con respecto al eje dorsoventral (figura 4.4). Esta distribución se mantuvo rostrocaudalmente. En la parte más caudal del estriado, la parte correspondiente a la cabeza del núcleo caudado en otras especies, la expresión de c-fos fue mucho menor que en la parte rostral, aunque también se distribuyó en parches. Otras drogas de abuso como la anfetamina inducen c-fos de manera heterogénea, aunque no todas, ya que la cocaína lo hace de forma homogénea (Moratalla *et al.*, 1996 a). Curiosamente, el globo pálido, también expresa c-fos tras la inducción con metadona.

Para comprobar si el patrón de expresión estriatal de c-fos inducido por metadona se corresponde con los estriosomas (uno de los compartimentos estriatales), hemos llevado a cabo estudios de doble marcaje para c-fos y receptor opioide  $\mu$  (MOR1), utilizado aquí como marcador de los estriosomas (Tan *et al.*, 2000). Curiosamente, la expresión de c-fos, a pesar de ser parcheada, no coincidió anatómicamente con la distribución de los estriosomas sino que, por el contrario, los rodea y evita (Figura 4.4). Por tanto, estos resultados parecen indicar que los estriosomas están impidiendo la expresión de c-fos inducida por metadona, mientras que las células de la matriz, en particular las de la parte dorsal, la favorecen. Como se explicó en la introducción, estas dos estructuras cerebrales se diferencian entre sí porque reciben proyecciones de distintas áreas cerebrales y porque expresan diferentes concentraciones de neuropéptidos y de receptores. Es posible que esta diferencia neuroquímica sea responsable del patrón estriatal de inducción de c-fos por metadona debido a la modulación que ejerce el sistema opioide sobre la expresión de estos neuropéptidos y los sistemas de neurotransmisión que los regulan (Spanagel *et al.*, 1994; Sepúlveda *et al.*, 1998).

Además del estriado, una de las estructuras cerebrales que se ha involucrado en la adicción a drogas de abuso y que forma parte de los sistemas de recompensa, es el núcleo accumbens del septo. La metadona también induce la expresión de c-fos en este núcleo con una distribución parcheada como en el estriado que se circunscribe sólo a la parte lateral del núcleo, dejando a la parte central (que rodea a la comisura anterior) sin c-fos (figura 4.3). Otras drogas de abuso, como la anfetamina o la cocaína también inducen c-fos en esta parte del núcleo accumbens (Moratalla *et al.*, 1996 a) detectándose una mayor fosforilación de MAP kinasas y de expresión de Elk1 en esta parte (Valjent *et al.*, 2000).

En lo que respecta al fenotipo de las células estriatales que expresan c-fos, como ya se indicó en la introducción, en el estriado se distinguen dos tipos principales de neuronas estriatales: las neuronas que proyectan al globo pálido (estriatopalidales) que se marcan con encefalina y las que proyectan a la sustancia negra (estriatonigrales) que se marcan con dinorfina. Para identificar el fenotipo neuronal que se activa por la metadona, hemos realizado estudios de doble marcaje inmunocitoquímico de c-fos/encefalina y de c-fos/dinorfina mediante la incubación simultánea de los dos anticuerpos correspondientes. La mayoría de los núcleos reactivos a c-fos colocalizaron con dinorfina lo que indica que la inducción de c-fos se produjo casi exclusivamente en las neuronas estriatonigrales que representan el 47% de la población neuronal del estriado. Por el contrario, no se encontró c-fos en neuronas encefalinérgicas o neuronas que proyectan al globo pálido, que representan también un 47% de las neuronas del estriado (figura 4.5).

La expresión de c-fos en las neuronas tras la administración de metadona coincide con la mayor expresión de los receptores  $\mu$  y  $\kappa$  en estas neuronas, por lo que proponemos que la inducción de c-fos en éstas puede resultar de la desactivación de los receptores opioides  $\mu$  y  $\kappa$ , no sólo en el estriado sino también en el núcleo accumbens del septo, donde también existe una gran proporción de receptores opioides en comparación con otras áreas cerebrales. Otra posibilidad para explicar la expresión de c-fos en estas neuronas es una influencia opuesta directa de los sistemas opioides y dopaminérgicos a nivel celular, puesto que se ha demostrado que los receptores opioides  $\mu$  y  $\kappa$  se expresan en las células estriatonigrales donde también se expresa el receptor dopaminérgico D1. Esta interacción del sistema dopaminérgico con el opioide a nivel celular se ha descrito bioquímicamente mediante la cuantificación de niveles de AMPc. Así, se ha mostrado el efecto inhibitorio de morfina sobre la actividad dopaminérgica

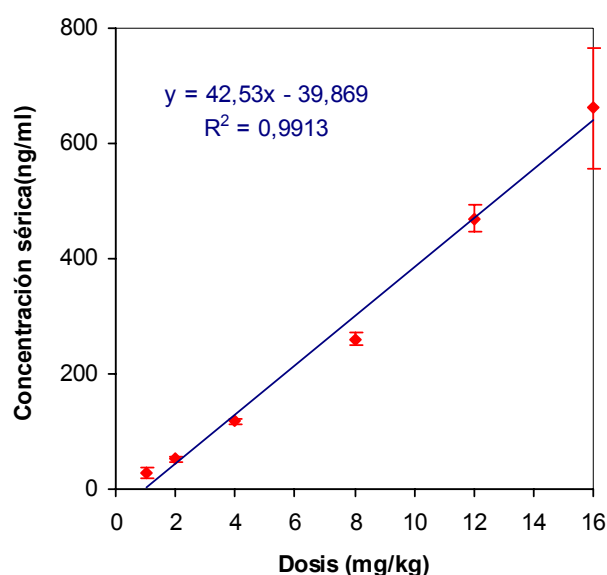
mediada por el receptor D1. Teniendo en cuenta esto, la metadona, al levantar esta inhibición, proporcionaría un efecto activador residual vía receptores dopaminérgicos D1.

Los resultados obtenidos de dobles marcajes de c-fos con marcadores de interneuronas estriatales (que representan el 2-5% de la población total) indicaron que sólo se indujo c-fos en parte de las neuronas que expresan parvalbúmina, no en todas (figura 4.6). Estos resultados son interesantes ya que estas interneuronas se sitúan en la parte dorsolateral del estriado, cerca de la corteza frontal, por lo que se piensa que tienen una función importante dirigiendo la información que fluye al estriado y además, se ha demostrado que estas neuronas hacen múltiples contactos con la mayor parte de las neuronas de proyección estriatales.

El siguiente paso fue el estudio de la curva dosis-respuesta si bien, previamente se estudió la relación entre dosis y concentraciones séricas determinadas una hora después de la administración, obteniéndose un aumento lineal de las concentraciones con la dosis en el intervalo muestreado (figura 5.3).

En cuanto a la respuesta, nuestros resultados indican que la metadona produce un incremento en la inducción de c-fos, dependiente de la dosis, en el estriado y en el accumbens y de forma menos perceptible en la corteza. Tal y como se observa en la figura 4.8, la respuesta no aumenta de manera proporcional a la dosis administrada, a partir de la dosis de 4 mg/kg la respuesta sólo se incrementa ligeramente. Sin embargo, el patrón anatómico de expresión de c-fos una vez que se hace perceptible (en la mayoría de los animales a la dosis de 2 mg/kg) es similar al descrito con dosis mayores de 4, 8, 12 y 16 mg/kg. Si bien al aumentar la dosis (8, 12 y 16 mg/kg), el patrón

de distribución se hace más evidente, con una intensidad de la respuesta mayor y por tanto una definición más clara de los parches o grupos de células en los que se detecta la inducción de c-fos (figura 4.8). Estos resultados indican que el patrón de expresión de c-fos inducida por metadona es selectivo de la metadona y no depende de la dosis utilizada.



**Figura 5.3.-** Relación lineal entre las concentraciones séricas determinadas una hora después de la administración subcutánea de distintas dosis de metadona.

### 5.3.- Formulaciones de cesión sostenida

- **Elaboración y optimización de microesferas para una semana de tratamiento**

Para abordar el objetivo planteado, es decir desarrollar y evaluar una formulación de cesión sostenida para TMM, se elaboraron una serie de lotes de microesferas tomando como referencia los resultados del diseño experimental realizado por Delgado *et al.* (1996) para la optimización de la

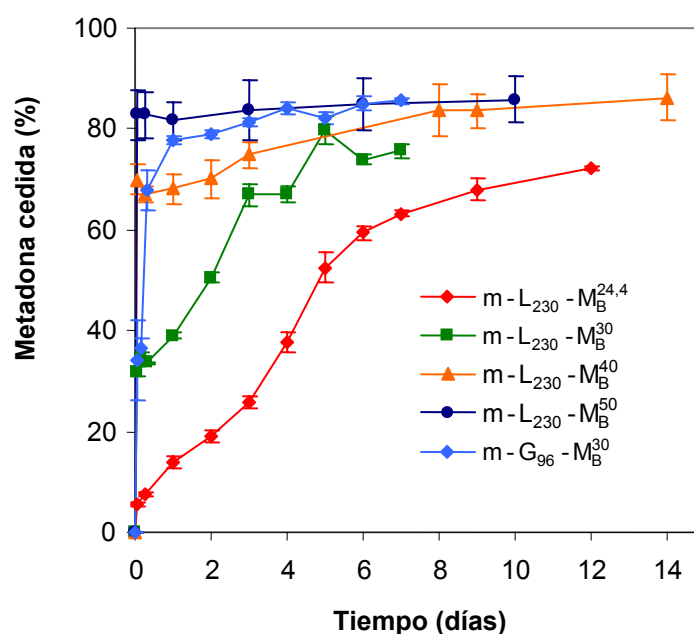
cesión *in vitro* de este tipo de formulaciones. Dichos resultados señalan que una cesión sostenida óptima *in vitro* durante 7 días se podría conseguir empleando DL-PLA de alto o bajo peso molecular medio en peso (Mw) y cargas de metadona relativamente bajas. De hecho, de entre las formulaciones ensayadas, la más próxima a la óptima se encontraba entre una formulación elaborada con DL-PLA de Mw 144 kDa y 17,5% de metadona, y otra con Mw 195 kDa y 19,6 % de metadona.

En este trabajo se elaboraron inicialmente cuatro lotes de microesferas con DL-PLA de peso molecular (Mw 230 kDa), superior al ensayado por Delgado *et al.* (1996) con cargas de metadona base de 24,4, 30, 40 y 50% para evitar la administración de cantidades muy elevadas de microesferas.

La cesión más sostenida se consigue con las formulaciones elaboradas con menor carga, ya que al aumentar el contenido de metadona se produce un incremento de la cesión inicial, en concreto la única formulación aceptable para un tratamiento prolongado sería la formulación m-L<sub>230</sub>-M<sub>B</sub><sup>24,4</sup>, con un porcentaje real de metadona incorporado de aproximadamente el 23%. Esta formulación libera aproximadamente un 5% durante la primera hora y un 17% en 24 horas, mientras que los restantes lotes ceden entre un 30% y más de un 80% en la primera hora en función de su contenido en fármaco (figura 5.4).

Cabe destacar que en ninguno de los lotes se cede la totalidad de la dosis incorporada, los porcentajes de liberación a los 7 días varían entre aproximadamente un 60% con la menor carga, hasta aproximadamente un 80% con la del 50% y que en realidad, se libera en la primera hora. La observación al microscopio óptico de estas microesferas puso de manifiesto la presencia de cristales de metadona, más apreciables cuanto mayor es la

carga de metadona empleada y con consecuencias directas sobre los perfiles de cesión *in vitro* de estos lotes de microesferas.



**Figura 5.4.-** Perfiles de cesión *in vitro* de los lotes de microesferas  $m-L_{230} - M_B^{24,4}$ ,  $m-L_{230} - M_B^{30}$ ,  $m-L_{230} - M_B^{40}$ ,  $m-L_{230} - M_B^{50}$  y  $m-G_{96} - M_B^{30}$ .

A la vista de estos resultados se aplican una serie de estrategias tecnológicas con dos fines, por un lado favorecer la cesión completa del fármaco y por otro disminuir el efecto burst.

De acuerdo con publicaciones previas de este equipo de investigación (Delgado *et al.*, 1996) la velocidad de liberación de la metadona depende de su solubilidad en el polímero, por tanto el aumento de la hidrofilia del polímero puede disminuir la cantidad de fármaco disuelto en el mismo y favorecer la cesión completa. Por ello se elaboran microesferas con polímeros más hidrofílicos, concretamente se emplea un PLA de bajo peso molecular (5,9 kDa), un PLGA (96 kDa) y un PEG-PLGA (34 kDa). Con este mismo objetivo

se elaboró un lote de microesferas por doble emulsión, en el que se incorporó dextrosa en la fase acuosa que se liberará más rápido que la metadona creando poros que podrían favorecer su completa liberación.

En ningún caso se mejora la cinética de cesión con respecto a la  $m-L_{230} - M_B^{24,4}$  (figuras 4.13-4.16). El efecto burst es más elevado debido al aumento de cristales de metadona no encapsulada, consecuencia de su menor solubilidad en estos polímeros, pero la cesión del fármaco sigue siendo incompleta.

Por último, y de acuerdo con Fernández (2000) que reduce el efecto burst del ibuprofeno en microesferas con la incorporación de labrafil, se elaboraron otros dos lotes incorporando el aceite junto con la metadona en la fase orgánica. La presencia de labrafil reduce el efecto burst de la formulación con mayor carga ( $m-L_{230} - M_B^{50} - \text{labrafil}^{400}$ ) (figura 4.17) pasando de una cesión inicial del 80% presentada por  $m-L_{230} - M_B^{50}$  a aproximadamente un 60% mientras que no mejora el perfil de cesión de la de menor carga ( $m-L_{230} - M_B^{24,4} - \text{labrafil}^{200}$ ) (figura 4.18).

La razón de la liberación incompleta del fármaco es, probablemente, que la metadona, al igual que otros fármacos de la misma naturaleza química, se une a los grupos carboxílicos terminales del polímero a través de su grupo amino (Cha y Pitt, 1989). Por ello se procedió a metilar los grupos carboxílicos del PLA, si bien la incorporación de metadona resultó excesivamente baja (tabla 4.17) y al no permitir la administración de dosis razonables de microesferas fue descartado. Además, la metadona al tener carácter básico acelera la degradación del polímero (Delgado *et al.*, 1996; Cha y Pitt, 1989) con lo que cada vez hay más grupos carboxílicos disponibles para unirse al grupo amino y un bloqueo inicial es posible que tampoco evite la retención posterior de fármaco.



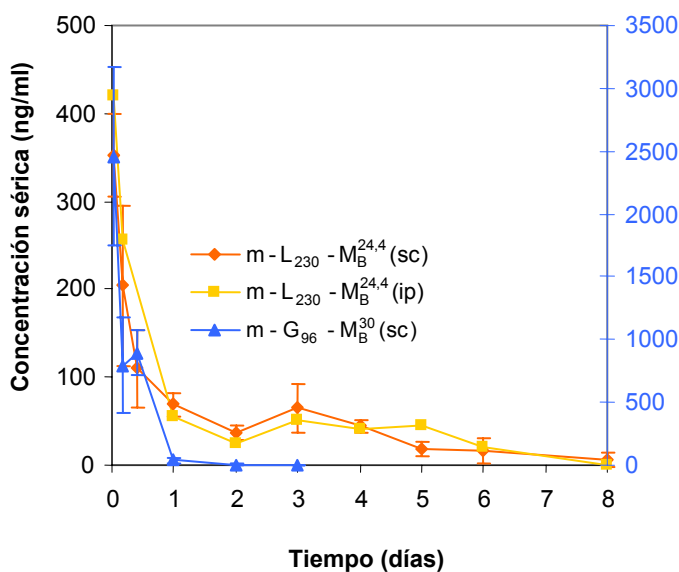
En cualquier caso, ninguna de las formulaciones ensayadas en esta última etapa presenta cesiones iniciales adecuadas ni cede la totalidad de la metadona. Por tanto, la formulación que más se aproxima, *in vitro*, a la ideal sería la formulación m-L<sub>230</sub> -M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> aunque la liberación de metadona es incompleta (figura 5.4). Para una liberación total del fármaco sería necesaria una degradación total del PLA a compuestos solubles. Teniendo en cuenta que la presencia de radicales libres, productos ácidos o enzimas producidos por las células del entorno (Tracy *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2000), así como la posibilidad de un proceso de degradación autocatalítico, por acumulación de productos de degradación en las microesferas y en el tejido que las rodea (Liu *et al.*, 2000), podría acelerar la degradación del polímero *in vivo*, se procedió a ensayar la formulación m-L<sub>230</sub> -M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> en ratones.

El cálculo de la dosis inicial de metadona a administrar por vía subcutánea se hizo teniendo en cuenta que el intervalo de concentraciones eficaces en humanos no está bien establecido, mientras algunos autores indican que los niveles deben mantenerse entre 100 y 200 ng/ml (Cha y Pitt, 1988), Eap *et al.* (2000) consideran que deben encontrarse alrededor de 200-250 ng/ml para l-metadona. Por ello, como nuestro propósito es elaborar un sistema para mantener concentraciones a lo largo del tiempo y el aclaramiento se puede modificar tras la administración continuada de metadona, la dosis de microesferas se estimó empleando los límites extremos del intervalo de aclaramiento sérico (figura 5.1) correspondiente a 12 mg/kg en dosis única y dosis múltiples, que fue de 7,4 – 13,9 l/h/kg respectivamente. Para mantener concentraciones entre 100 y 200 ng/ml durante cinco días en ratones de 30 g de peso, teniendo en cuenta que éste fue el tiempo transcurrido *in vitro* para ceder el 60% (figura 5.4) a una velocidad adecuada, supondría la administración de 20 mg de microesferas del lote m-L<sub>230</sub> -M<sub>B</sub><sup>24,4</sup>

conteniendo 5 mg de metadona, de acuerdo con la siguiente expresión (ec. 5.5):

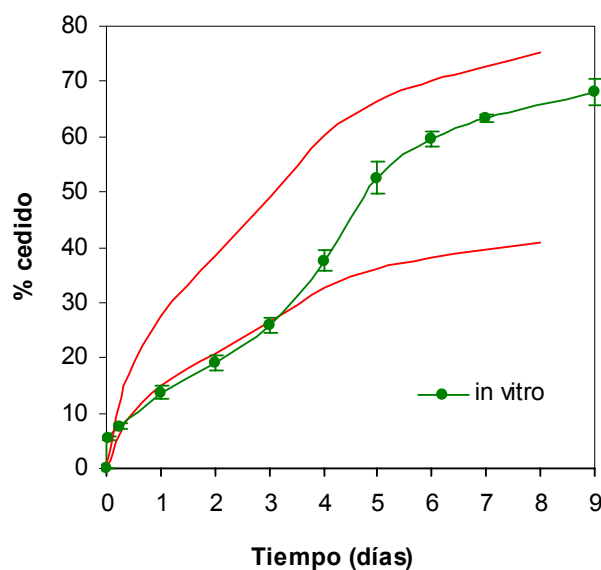
$$\text{Dosis/día} = \text{Aclaramiento} \times \text{Concentración de equilibrio} \quad (\text{ec. 5.5})$$

Como se puede observar (figura 5.5) los niveles séricos son inferiores a los que cabría esperar según la dosis administrada y el intervalo de aclaramiento estimado, pero hemos de tener en cuenta que la cesión máxima *in vitro* fue del 60%. De hecho, las cantidades cedidas *in vivo* calculadas por deconvolución empleando las dos funciones características extremas (tabla 4.31) nos indican que la biodisponibilidad de estas microesferas se encuentra entre 39,1 y 72,2 % en función del valor del aclaramiento (figura 5.6). Sin embargo, podría también producirse alguna alteración en el proceso de cesión-absorción.



**Figura 5.5.-** Curvas de niveles séricos obtenidas tras la administración de 20 mg de microesferas del lote m-L<sub>230</sub>-M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> por vía sc e ip, y 10 mg del lote m-G<sub>96</sub>-M<sub>B</sub><sup>30</sup> (sc).

Para determinar la posible influencia de la vía de administración en la absorción de la metadona, esta misma formulación  $m-L_{230} - M_B^{24,4}$  fue administrada por vía intraperitoneal; la curva de niveles séricos obtenida es muy similar a la obtenida por vía sc y la biodisponibilidad calculada por deconvolución se encuentra entre 40,7 y 75,2 % (tabla 4.32), por tanto la caída de los niveles séricos no puede ser atribuida a la vía de administración.



**Figura 5.6.-** Porcentaje de metadona cedido *in vitro* desde el lote  $m-L_{230} - M_B^{24,4}$  junto con las curvas de cesión *in vivo* estimadas por deconvolución con las funciones características extremas.

Teniendo en cuenta estos resultados se procedió a ensayar otra formulación que presentara *in vitro* una liberación más completa. En este caso se eligieron las microesferas elaboradas con PLGA, lote  $m-G_{96} - M_B^{30}$ , que ceden un 75% en el primer día (figura 5.4) aún sabiendo que no es una formulación de cesión prolongada. La biodisponibilidad calculada por

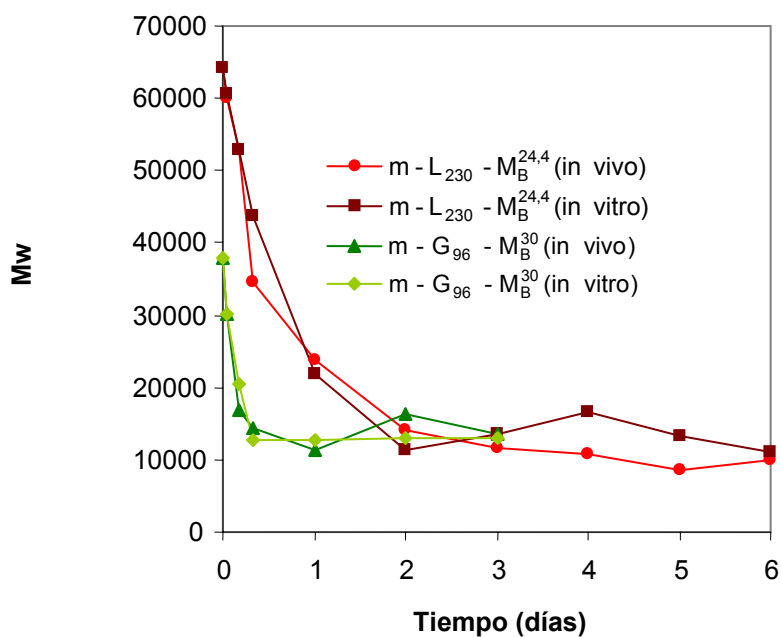
deconvolución para 24 horas fue superior al 100%, pues en este caso no se ha producido el proceso de autoinducción. Por tanto, la desviación observada con la formulación m-L<sub>230</sub>-M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> puede ser debida a la autoinducción enzimática, que como se sabe es un fenómeno tiempo dependiente.

Para intentar explicar las diferencias observadas *in vitro* vs *in vivo*, con ambas formulaciones, se llevó cabo una caracterización más exhaustiva de los dos lotes ensayados. Estos estudios incluyeron: determinación del porcentaje de metadona disuelto en los polímeros por DSC, seguimiento de la degradación de los polímeros por GPC y de los cambios morfológicos de las microesferas por SEM a lo largo de los ensayos de cesión.

Los resultados de DSC se muestran en la figura 4.19 y tabla 4.35. El punto de fusión de la metadona base y la temperatura de transición vítrea ( $T_g$ ) del PLGA son claramente identificables sin embargo, la  $T_g$  del PLA no se detectó. La metadona no disuelta fue calculada a través de la relación de áreas de los picos de fusión. Los resultados indicaron que el 10% y 48% de la metadona se encuentra no disuelta en el PLA y PLGA respectivamente. El porcentaje de metadona no disuelta en el polímero se encuentra íntimamente relacionado con el porcentaje cedido en las primeras horas del ensayo (figura 5.4).

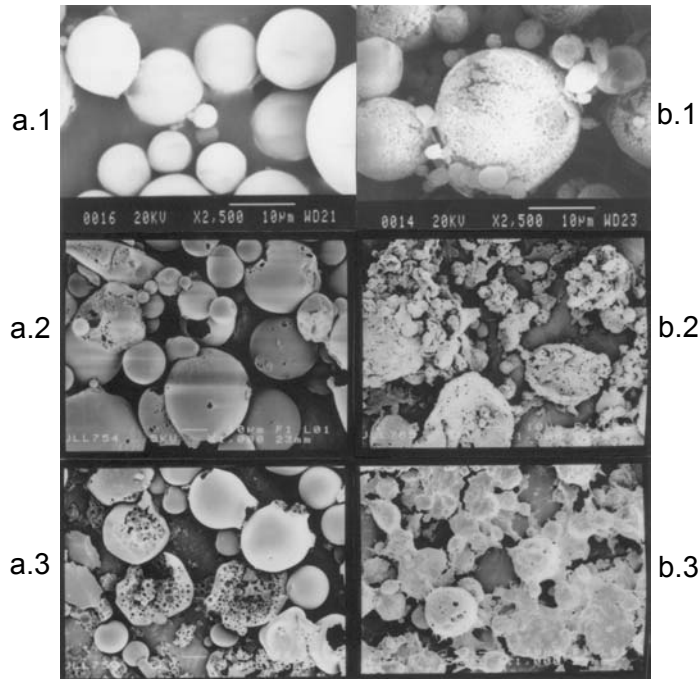
La determinación de la degradación de los polímeros se llevó a cabo para comprobar si existen diferencias entre la velocidad de degradación *in vivo* e *in vitro*. Los resultados obtenidos (figura 5.7) nos indican que la degradación no es más acusada *in vivo* y que el entorno biológico no favorece la liberación del fármaco debido, probablemente, a que el carácter básico de la metadona domina la degradación. De hecho, como se ha publicado anteriormente (Delgado *et al.*, 1996), los polímeros derivados del ácido láctico sufren una importante degradación durante el proceso de elaboración y por ello el peso molecular del polímero en las microesferas es considerablemente

inferior al de partida. Este efecto es mucho más acusado cuanto mayor es el peso molecular inicial del polímero, el PLA de 230 kDa se reduce a unos 65 kDa mientras que el PLGA de 96 kDa, en las microesferas tiene un peso molecular de aproximadamente 40 kDa (figura 5.7).



**Figura 5.7.-** Perfiles de degradación *in vivo* e *in vitro* de los polímeros tras la administración subcutánea de las microesferas  $m-L_{230} - M_B^{24,4}$  y  $m-G_{96} - M_B^{30}$ .

En cuanto a la morfología de las microesferas, hemos de indicar que las elaboradas con PLGA son porosas mientras que las preparadas con PLA son más compactas (figura 5.8), lo que explicaría, en parte, la liberación completa del fármaco desde las primeras. Sin embargo, en ambos casos, a lo largo de los ensayos *in vivo* e *in vitro*, se van deformando; por tanto, la degradación no es la causa de las diferencias observadas en los correspondientes perfiles de cesión *in vivo* e *in vitro*.



**Figura 5.8.-** Cambios morfológicos de las microesferas de los lotes (a)  $m-L_{230} - M_B^{24,4}$  y (b)  $m-G_{96} - M_B^{30}$ , recién elaboradas (1), al cabo de 6 días de incubación *in vitro* (2) y al cabo de 6 días de la administración subcutánea de las mismas (3).

Por último, se llevó a cabo el análisis histopatológico de la zona de inyección para determinar si la reacción del tejido subcutáneo a un cuerpo extraño inducía la encapsulación de las microesferas y era la causa de los bajos niveles séricos alcanzados tras la administración de la formulación  $m-L_{230} - M_B^{24,4}$ . Los cambios secuenciales observados tras la administración de ambas formulaciones, comienzan con una moderada reacción inflamatoria no específica. A las 10 horas se aprecia un absceso y a partir de aproximadamente 48 horas se observa una delimitación de la zona de administración que desemboca en una especie de quiste a los 6 días. Sin embargo, estas reacciones tisulares no son lo suficientemente intensas para

impedir la absorción de metadona ya que se observan tanto con las microesferas de PLA como de PLGA y estas últimas liberan la totalidad de la dosis. Además, este tipo de reacciones son frecuentes tras la administración de sistemas elaborados con polímeros biodegradables y no producen interferencias en la liberación/absorción de fármacos (Kobayashi *et al.*, 1998).

A partir de los resultados expuestos hasta este punto, no parece que la pérdida de linealidad en la correlación *in vivo* – *in vitro* para el porcentaje cedido desde la formulación m-L<sub>230</sub> -M<sub>B</sub><sup>24,4</sup> (figura 5.6) sea debida en su totalidad a factores dependientes de la formulación sino a factores farmacocinéticos, aunque para confirmarlo sería necesario determinar experimentalmente la cantidad de metadona cedida desde el sistema. La retirada total de las microesferas del tejido subcutáneo es prácticamente imposible por lo que se procedió a la elaboración de un implante conteniendo la misma dosis que las microesferas. La ventaja evidente del implante es que se puede extraer del tejido subcutáneo y determinar tanto los niveles séricos como la cantidad de fármaco remanente. Por todo ello, y aunque las microesferas son un sistema de dosificación más versátil, se procedió a la elaboración y optimización de implantes de liberación prolongada.

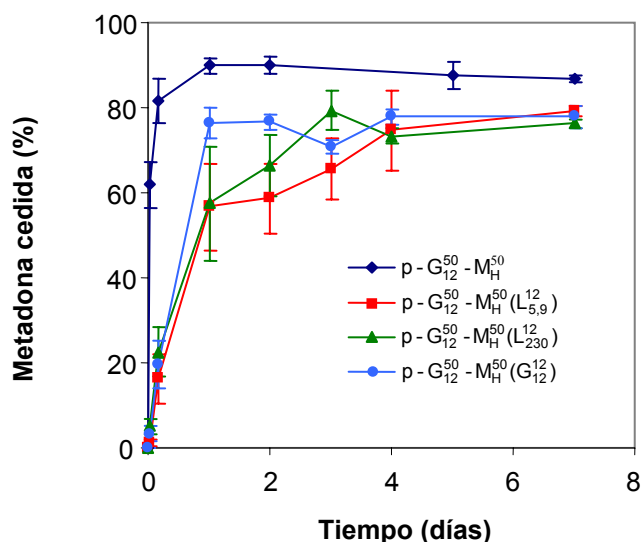
- **Elaboración y optimización de implantes para una semana de tratamiento**

En este apartado de la discusión comentaremos los resultados de cesión *in vitro* obtenidos con 3 tipos de implantes: implantes de clorhidrato de metadona, de mezclas de clorhidrato de metadona y metadona base e implantes elaborados con metadona base.

### a) Implantes de clorhidrato de metadona

Los implantes se elaboraron por compresión directa de mezclas de clorhidrato de metadona con PLGA de 12 kDa (tabla 4.36), obteniéndose comprimidos de 12 mm de diámetro que fueron cortados en paralelepípedos (3x2x1mm;  $10 \pm 0,1$  mg) para adaptarlos a la dosis calculada para mantener *in vivo* los niveles de metadona en el intervalo de 100-200 ng/ml.

El primer lote de implantes ( $p-G_{12}^{50} - M_H^{50}$ ) se preparó con una mezcla 50/50 de clorhidrato de metadona ( $M_H$ ) y PLGA de 12 kDa ( $G_{12}$ ). El perfil de cesión *in vitro* se aleja mucho del óptimo, la metadona es liberada en un alto porcentaje a lo largo de las primeras 24 horas (figura 5.9).



**Figura 5.9.-** Perfiles de cesión *in vitro* de los lotes de implantes  $p-G_{12}^{50} - M_H^{50}$ ,  $p-G_{12}^{50} - M_H^{50}(L_{5,9})$ ,  $p-G_{12}^{50} - M_H^{50}(L_{230})$  y  $p-G_{12}^{50} - M_H^{50}(G_{12})$ .

Para reducir este efecto se procedió a recubrir los implantes con PLA y PLGA, consiguiéndose disminuir la cesión inicial aunque el porcentaje



liberado en las primeras horas continúa siendo alto, entre un 50% con PLA y un 70% con el PLGA (figura 5.9).

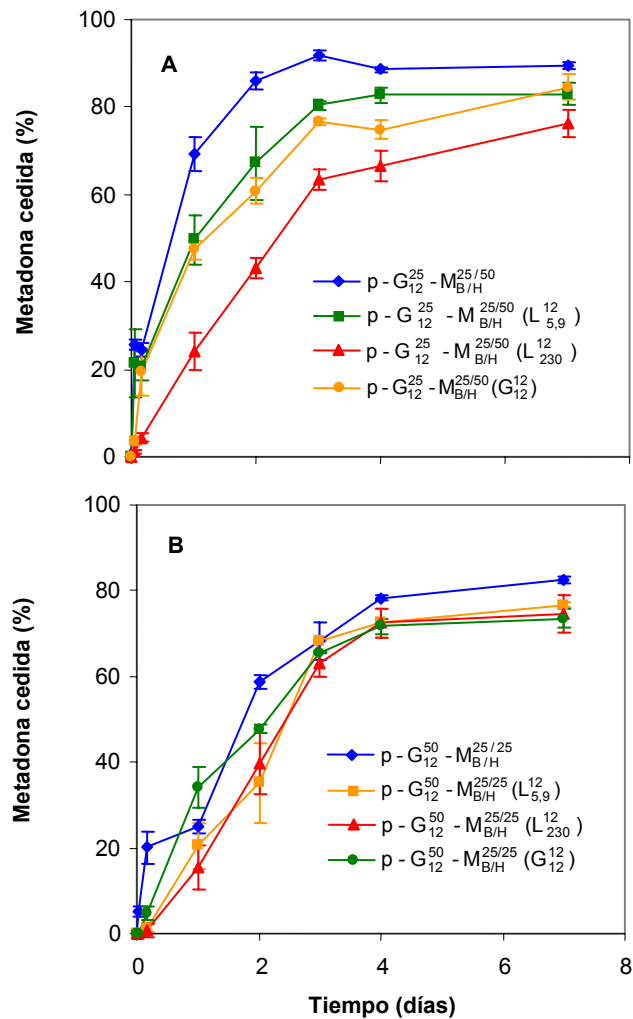
El clorhidrato de metadona es mucho más soluble en agua que la metadona base y por ello para reducir la excesiva liberación inicial se procedió a la elaboración de implantes de mezclas de ambos productos.

#### **b) Implantes de clorhidrato de metadona y metadona base**

En este caso se elaboraron dos lotes de implantes (tabla 4.41), uno con un 50% de clorhidrato de metadona ( $M_H$ ) y un 25% de metadona base ( $M_B$ ) y de PLGA de 12 kDa ( $G_{12}$ ) que sería el lote  $p-G_{12}^{25} - M_{B/H}^{25/50}$  en el que se introduce la metadona base en detrimento del porcentaje de polímero y el otro en el que se mantiene el 50% de  $G_{12}$  y se reduce a un 25% el  $M_H$  manteniéndose la proporción polímero/metadona en 50/50 que sería el lote  $p-G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25}$ . La figura 5.10 refleja la reducción importante que se produce en la cesión inicial al introducir la metadona base en la formulación, si bien la velocidad de cesión a tiempo cortos es aún excesiva, por lo que se procedió a su recubrimiento. De esta forma se consiguió disminuir la velocidad de cesión inicial (figura 5.10), este efecto es más acusado cuanto mayor es el contenido en clorhidrato de metadona (figura 5.10A), incluso no se aprecian diferencias importantes entre los recubrimientos con PLA de distinto peso molecular, en los lotes con menor contenido en clorhidrato de metadona ( $p-G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (L_{5,9}^{12})$  y  $p-G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (L_{230}^{12})$ ).

Los resultados obtenidos tanto con clorhidrato de metadona como con mezclas de clorhidrato y metadona base nos indican que la velocidad de cesión inicial se puede reducir tanto incorporando metadona base como recubriendo los implantes, encontrándose los perfiles de cesión de los implantes  $p-G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (L_{5,9}^{12})$  y  $p-G_{12}^{50} - M_{B/H}^{25/25} (L_{230}^{12})$  próximos al óptimo, si bien

en ambos casos a partir del cuarto día la velocidad de cesión disminuye y no se consigue la liberación total de la metadona, probablemente debido a la dificultad del clorhidrato de metadona para difundir a través de la película hidrofóbica de recubrimiento.



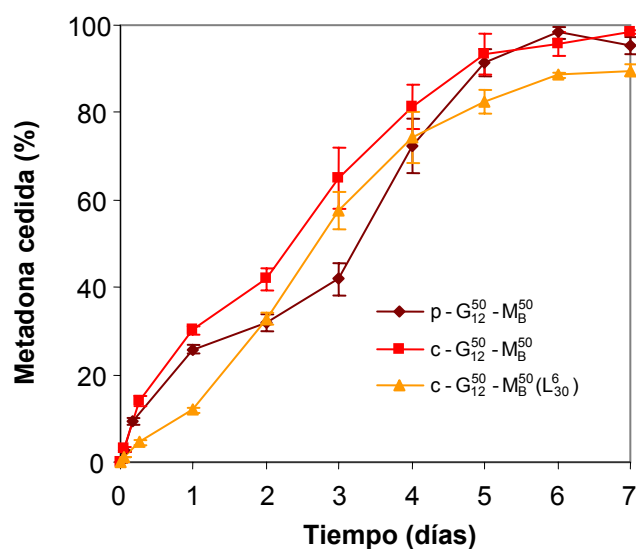
**Figura 5.10.-** Perfiles de cesión *in vitro* de los lotes de implantes elaborados con mezclas de clorhidrato de metadona y metadona base.

Por todo lo expuesto el paso final en la optimización fue la elaboración de implantes de metadona base.

### c) Implantes de metadona base

En la elaboración inicial de este grupo de implantes se mantiene el PLGA de 12 kDa como componente de la matriz y se incorpora la metadona base en un 50%, se comprimen con el punzón de 12 mm y se adaptan a implantes paralelepípedos de 10 mg, para mantener los niveles séricos en 100-200 ng/ml, formulación que hemos denominado p- $G_{12}^{50}$  -  $M_B^{50}$ .

El perfil de cesión *in vitro* (figura 5.11) se caracteriza por una cesión a las 24 horas de un 27%, aproximadamente el doble de la ideal y una liberación completa de la metadona incorporada en unos seis días.

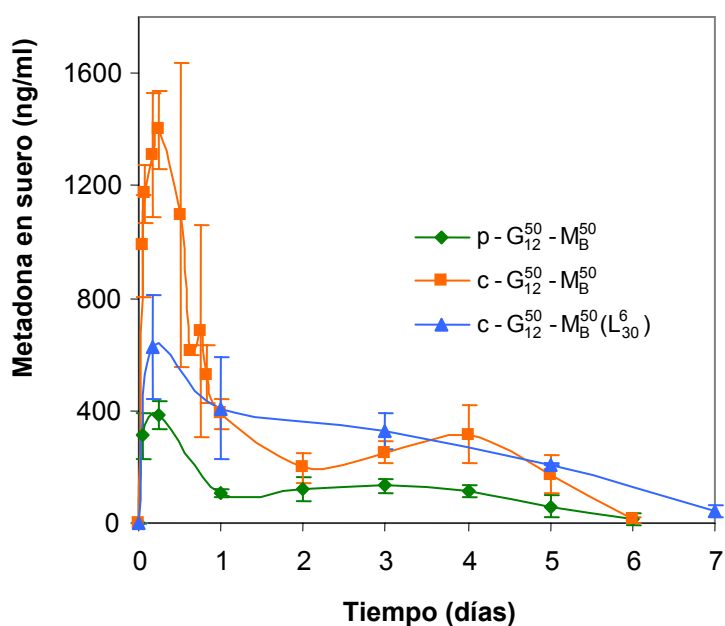


**Figura 5.11.-** Perfiles de cesión *in vitro* de los implantes elaborados con metadona base.

Consideramos que esta formulación (p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>) podría ser adecuada para intentar explicar la curva de niveles séricos obtenida con las microesferas y localizar si la pérdida de linealidad de la correlación *in vivo* – *in vitro* es debida al proceso de cesión-absorción o es una alteración de la disposición del fármaco. Por tanto, con este lote se procedió a realizar el ensayo *in vivo* llevándose a cabo el seguimiento de los niveles séricos, concentraciones en cerebro y determinación de la respuesta a nivel neuronal.

Los niveles de metadona en suero una vez transcurridas las primeras horas se mantienen por encima de 100 ng/ml hasta el cuarto día, a partir del cual los niveles disminuyen (figura 5.12).

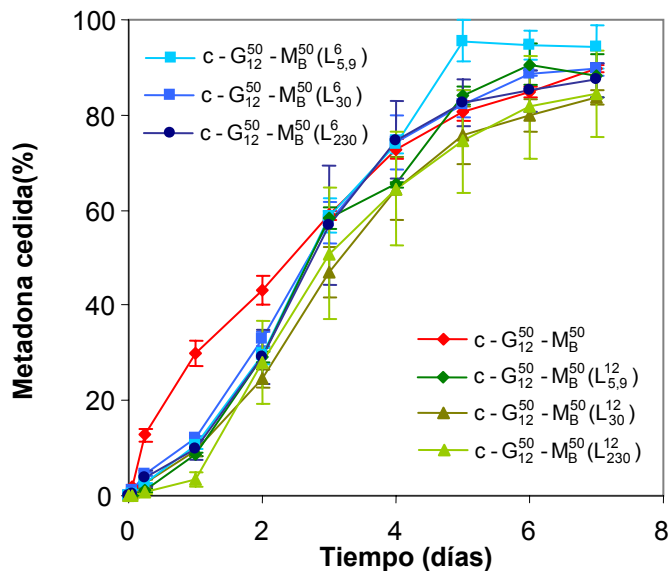
Estos resultados nos indican que para alcanzar y mantener niveles alrededor de 200 ng/ml (Eap *et al.*, 2000), son necesarias dosis más elevadas. Por ello se diseñó y preparó un nuevo tipo de implante conteniendo también un 50% de metadona base y un 50% de PLGA (12kDa), pero de 26 mg de peso. Esto nos permitió comprimir directamente la mezcla con un punzón de 6 mm y obtener así implantes (c-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>) que podían ser usados sin adaptaciones posteriores. La cesión de la metadona *in vitro* (figura 4.33) tiene lugar en aproximadamente 7 días (90%), si bien la cesión inicial es superior a la deseada (30%). Los resultados del ensayo *in vivo* se plasman en la figura 5.12 donde se aprecian niveles séricos elevados en las primeras 24 horas, correspondientes a ese efecto burst observado, tanto *in vitro* como *in vivo*, que disminuyen a concentraciones terapéuticas manteniéndose en el intervalo de 380 a 170 ng/ml durante unos 5 días.



**Figura 5.12.-** Niveles séricos obtenidos tras la administración de los implantes  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$ ,  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  y  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^6)$ .

Una vez que hemos comprobado que con estos implantes podemos mantener concentraciones terapéuticas durante varios días, nos planteamos que la reducción del efecto burst nos llevaría, probablemente, a conseguir la formulación óptima. Por ello, se procedió al recubrimiento de los implantes  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  con PLA y PLGA de distintos pesos moleculares a 2 concentraciones (6% y 12%). El efecto de la película de PLGA es mínimo, se observa una ligera reducción de la velocidad de cesión *in vitro* a tiempos cortos (figuras 4.40-4.43), pero de acuerdo con el valor de  $f_2$ , no significativa, por lo que el recubrimiento con este polímero fue descartado. Por el contrario, el recubrimiento con PLA produce una reducción importante de la velocidad de cesión en los 3 primeros días, no existiendo diferencias significativas posteriormente (figuras 5.13). No obstante, con independencia del peso

molecular y de la concentración empleada, se eligió el lote  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^6)$ , es decir el recubrimiento con PLA de 30 kDa a una concentración del 6% para ser ensayado *in vivo*, porque es el lote que cede mayor porcentaje *in vitro*.

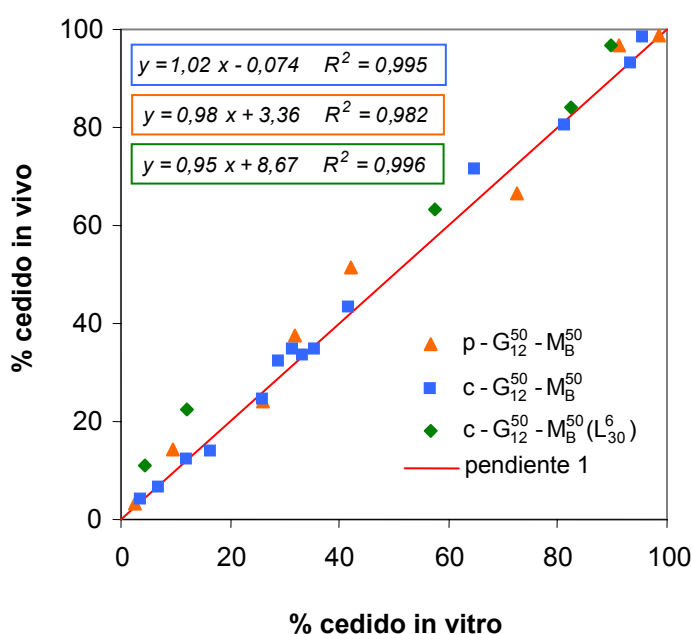


**Figura 5.13.-** Efecto del recubrimiento con PLA y PLGA de distintos pesos moleculares al 6% y 12% sobre la cinética de cesión de la metadona desde los implantes  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$ .

La curva de niveles séricos – tiempo obtenida tras la inserción del implante  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^6)$  (figura 5.12), refleja una notable reducción en las concentraciones iniciales, los niveles disminuyen aproximadamente a la mitad, de unos 1300 ng/ml a 600 ng/ml durante las primeras horas, manteniendo niveles entre 100 y 400 ng/ml durante 6 días.

Para establecer las correlaciones *in vivo-in vitro* con estos tres lotes, los implantes fueron extraídos y valorada la cantidad de metadona remanente (tablas 4.80, 4.84 y 4.87), lo que nos permite conocer experimentalmente las

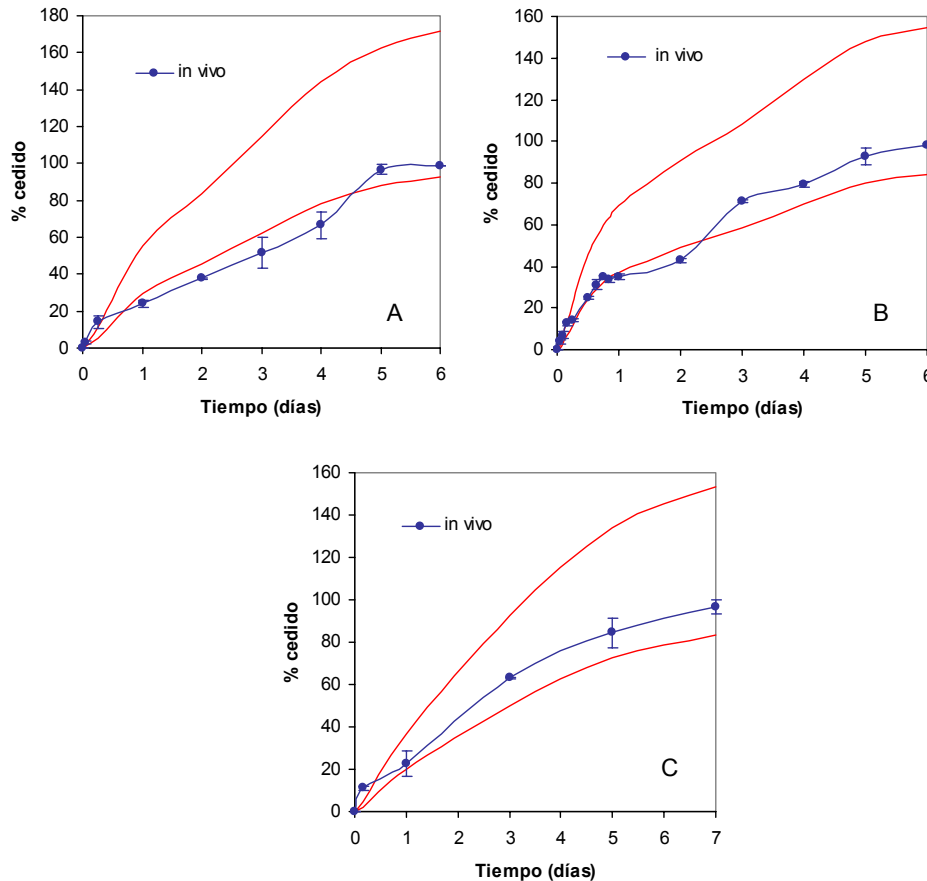
cantidades cedidas desde los implantes. La correlación *in vivo* – *in vitro* obtenida es prácticamente perfecta, con pendiente próxima a la unidad, en todos los casos (figura 5.14).



**Figura 5.14.-** Correlaciones *in vivo-in vitro* de los lotes  $p-G_{12}^{50}-M_B^{50}$ ,  $c-G_{12}^{50}-M_B^{50}$  y  $c-G_{12}^{50}-M_B^{50}(L_{30}^6)$ , establecidas entre el porcentaje de metadona cedido *in vivo* calculado a partir de las cantidades remanentes y el porcentaje cedido *in vitro*.

Como ya hemos comentado, la farmacocinética de la metadona es muy variable y además hemos puesto de manifiesto que se produce una alteración de los procesos implicados en la eliminación del fármaco con el tiempo por lo que las técnicas de deconvolución no se pueden aplicar ya que para ello se requiere que la función absorción-disposición sea lineal y tiempo invariable; por ello hemos empleado las funciones extremas obtenidas con 12 mg/kg en dosis única ( $Cl_s = 7,4$  l/h/kg) y con la misma dosis en administraciones repetidas ( $Cl_s = 13,9$  l/h/kg), para delimitar el intervalo en el que se deben

encontrar los porcentajes cedidos. Las curvas de porcentajes cedidos, calculados a partir de remanentes, para los tres tipos de implantes diseñados para una semana de tratamiento,  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$ ,  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  y  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^6)$ , se encuentran siempre más próximas a la predicha por deconvolución empleando la función de dosis única (figura 5.15), lo que nos indica que no se ha producido, al menos en su totalidad, el proceso de autoinducción que cabría esperar después de una administración continuada.



**Figura 5.15.-** Perfiles de cesión *in vivo* obtenidos con las funciones características extremas, junto con los porcentajes cedidos, estimados a partir de las cantidades remanentes con los implantes (A)  $p-G_{12}^{50} - M_B^{50}$ , (B)  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}$  y (C)  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50}(L_{30}^6)$ .



La comparación de las áreas bajo la curva de niveles séricos-tiempo tras la administración de las microesferas con respecto a los implantes, nos indica que la biodisponibilidad de la metadona es mayor en implantes que en microesferas. La metadona en microesferas presenta una biodisponibilidad relativa de aproximadamente un 40%, igual a la predicha con la función característica estimada para dosis única, probablemente debido a la cesión incompleta, observada previamente *in vitro*. Recordemos que parte de la metadona encapsulada en las microesferas se encuentra disuelta en el polímero, mientras que en los implantes la metadona no estaría disuelta en el polímero y su liberación por tanto está favorecida.

En cuanto a la optimización de una formulación de cesión sostenida para una semana de tratamiento, la  $c-G_{12}^{50} - M_B^{50} (L_{30}^6)$  podría ser considerada adecuada. Sin embargo, en general los TMM son más prolongados y para considerar que realmente se ha alcanzado el objetivo planteado en cuanto a la obtención de un sistema potencialmente eficaz en humanos, debemos conseguir una cesión más prolongada. Por ello el siguiente paso fue la elaboración de implantes para más tiempo.

- **Elaboración y optimización de implantes para un mes de tratamiento**

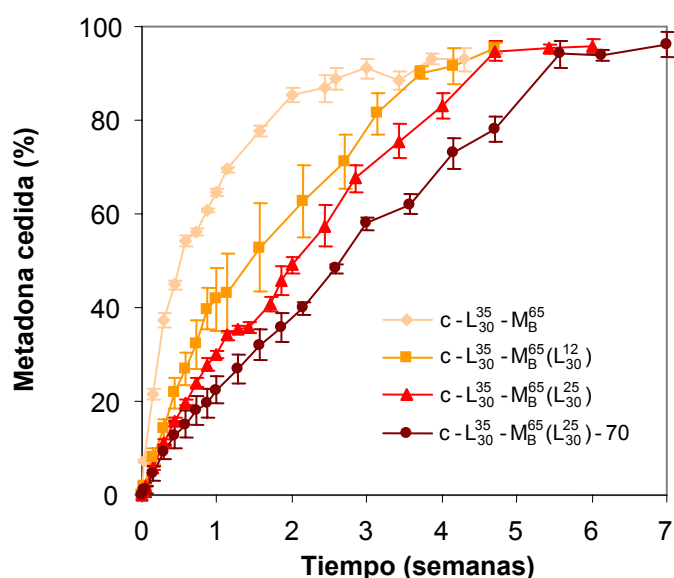
La secuencia experimental seguida en este apartado fue similar a la de una semana, es decir, comenzamos elaborando implantes que contuvieran la dosis necesaria para aproximadamente un mes de tratamiento con el fin de alcanzar y mantener concentraciones entre 100-200 ng/ml. En este caso se incorporó un 65% de metadona base para evitar que resultaran excesivamente grandes y se utilizó PLA de 30 kDa (más lipófilico) como componente de la matriz.

El primer lote que se elaboró fue el  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}$ , con un peso total de 47,5 mg conteniendo 31 mg de metadona para una dosis diaria de 1mg. El ensayo de cesión *in vitro* presenta una liberación inicial elevada de más del 50% en la primera semana (figura 5.16), por tanto, para reducir la cesión se procedió al recubrimiento de los mismos. Teniendo en cuenta los resultados anteriores éste se llevó a cabo también con PLA de 30 kDa a dos concentraciones, 12% en  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}(L_{30}^{12})$  y 25% en  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}(L_{30}^{25})$ . En este caso, las diferencias en los perfiles de cesión también las encontramos fundamentalmente en la cesión inicial, la liberación de metadona desde  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}(L_{30}^{25})$ , es más constante cediéndose un 30% en la primera semana y un 82% en cuatro semanas, mientras que el recubrimiento al 12% cede un 40% en una semana y cerca del 90% antes de las cuatro semanas (figura 5.16), no habiéndose liberado la totalidad de la dosis en 6 semanas que fue el tiempo de duración del ensayo.

Aparentemente cualquiera de los dos lotes podría ensayarse *in vivo*, pero recordemos que con los implantes de 1 semana los niveles séricos se mantienen durante un tiempo menor del esperado porque, por un lado en las primeras 24 horas se libera más de lo deseado y por otro, al ser un sistema para un periodo más prolongado, es de esperar que se manifieste la alteración en la disposición de este fármaco observada tras su administración continuada.

Teniendo en cuenta estos hechos se preparó un nuevo lote,  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}(L_{30}^{25})-70$ , que es exactamente igual que el  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65}(L_{30}^{25})$ , pero con un contenido de metadona (45 mg) y un peso total (70 mg) mayores, es decir se aumenta la dosis para alcanzar niveles séricos más elevados y compensar el posible efecto del tiempo en la disposición del fármaco. El

aumento de la carga, en principio, podría incrementar la velocidad de cesión y conseguir la depleción total del implante pero, por otro lado, también podría verse aumentado el efecto burst; sin embargo, la disminución de la superficie específica, consecuencia del aumento de tamaño del implante, podría compensar dicho efecto.

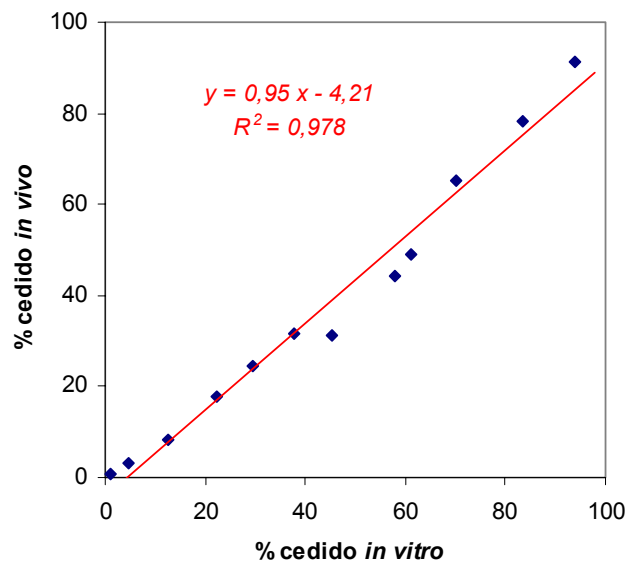


**Figura 5.16.-** Perfiles de cesión *in vitro* de los lotes de implantes  $c-L_{30}^{35}-M_B^{65}$ ,  $c-L_{30}^{35}-M_B^{65}(L_{30}^{12})$ ,  $c-L_{30}^{35}-M_B^{65}(L_{30}^{25})$  y  $c-L_{30}^{35}-M_B^{65}(L_{30}^{25})-70$ .

El perfil de cesión *in vitro* se refleja en la figura 5.16, la liberación del fármaco es prácticamente constante a lo largo de unas cinco semanas y media liberándose un 95%, y aproximadamente un 20% en la primera semana. Esta cinética de cesión *in vitro* nos podría conducir a mantener niveles de unos 100-200 ng/ml *in vivo* durante aproximadamente 5 semanas, si bien antes de llevar a cabo este estudio se realizó un ensayo preliminar tomando algunas muestras de suero durante la primera semana.

Los niveles se mantienen alrededor de los 100 ng/ml, incluso en el intervalo de las primeras 24 horas se detectaron concentraciones de 150 ng/ml, lo que nos llevó a realizar el ensayo *in vivo* con 2 implantes de  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25}) - 70$ .

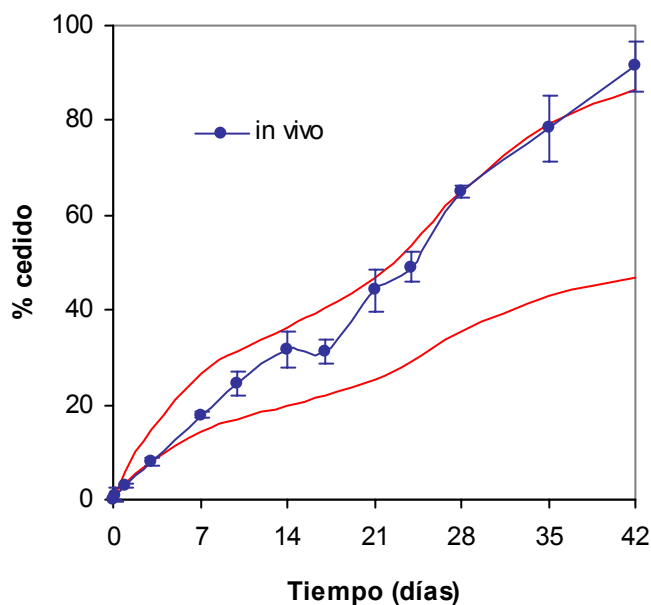
Los niveles séricos obtenidos con estos implantes (figura 5.20) se mantienen a lo largo de 5 semanas entre 100 y 300 ng/ml, exceptuando las primeras 4 horas en las que se alcanzan concentraciones de unos 700 ng/ml y, al igual que con los implantes probados anteriormente *in vivo*, la correlación obtenida entre las cantidades cedidas *in vitro* e *in vivo* es buena, con pendiente próxima a la unidad (figura 5.17).



**Figura 5.17.-** Correlaciones *in vivo-in vitro* de implantes correspondientes al lote  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25}) - 70$ .

La curva de cesión *in vivo*, determinada a partir de la metadona remanente, se superpone durante la primera semana con la curva predicha por deconvolución con dosis única, aproximándose paulatinamente a la

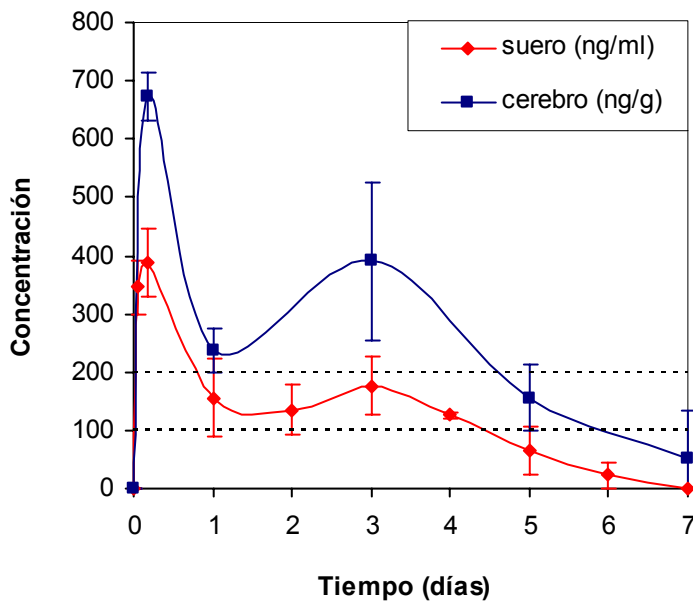
predicha con autoinducción con la que se superpone a partir de las 3 semanas. Estos resultados ponen en evidencia el proceso de autoinducción enzimático típico de la metadona y que recordemos no fue observado con los implantes para una semana de tratamiento, cuyo perfil de cesión *in vivo* se mantiene próximo al estimado empleando la función característica obtenida tras una sola dosis. Estas diferencias también se aprecian al calcular la relación de áreas bajo las curvas obtenidas con los implantes  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25}) - 70$  respecto a los implantes de una semana, que resultó ser de 0,54, consecuencia del aumento del metabolismo.



**Figura 5.18.-** Perfiles de cesión *in vivo* obtenidos con las funciones características extremas junto con los porcentajes cesido estimados a partir de las cantidades remanente con los implante  $c-L_{30}^{35} - M_B^{65} (L_{30}^{25}) - 70$ .

- **Niveles en cerebro. Implantes p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> y c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup>(L<sub>30</sub><sup>25</sup>) - 70**

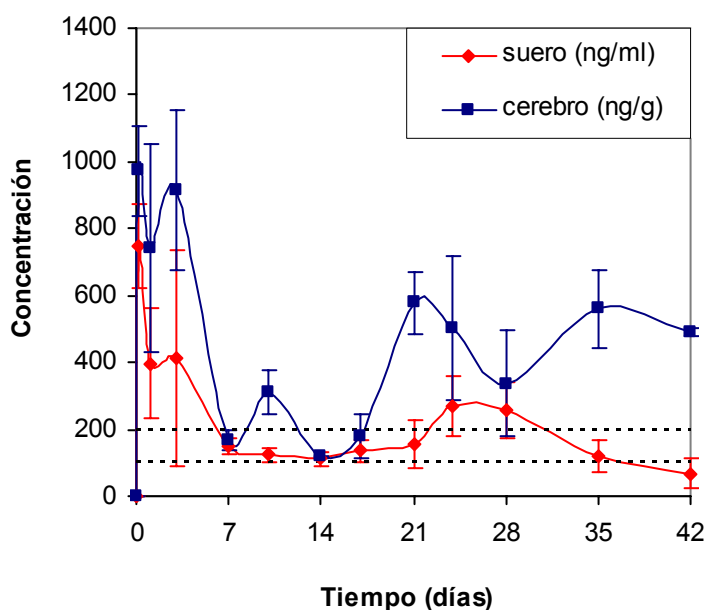
En cuanto a los niveles en cerebro, determinados simultáneamente con los niveles séricos tras la administración de un implante para una semana p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> y un mes de tratamiento c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup>(L<sub>30</sub><sup>25</sup>)-70, hemos de poner de manifiesto que son, al igual que con dosis únicas, más elevados que en suero (figuras 5.19 y 5.20) como corresponde a una mayor afinidad de la metadona por este tejido (Gabrielsson *et al.*, 1985).



**Figura 5.19.-** Niveles en suero y cerebro obtenidos tras la implantación de un implante p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>.

La relación de áreas bajo las curvas de niveles en suero y cerebro se mantiene próxima a la obtenida tras la administración de 6 mg/kg en dosis única (2,6), con valores de 2,1 para p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> y de 2,3 para

c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup> (L<sub>30</sub><sup>25</sup>)-70. Sin embargo, mientras que la curva de concentraciones en cerebro obtenida con p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> se mantiene paralela a la sérica (figura 5.19) al igual que ocurre con dosis únicas (figura 5.2), en el caso de la obtenida con el implante c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup> (L<sub>30</sub><sup>25</sup>)-70, aunque las fluctuaciones observadas en suero se reflejan en los niveles en cerebro, a partir de la primera semana se aprecia un cierto desplazamiento de las mismas en el tiempo, de hecho hay un repunte de los niveles cerebrales al final de la cesión cuando las concentraciones séricas son ya muy bajas (figura 5.20).



**Figura 5.20.-** Niveles en suero y cerebro obtenidos tras la implantación de dos implantes c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup> (L<sub>30</sub><sup>25</sup>)-70.

Teniendo en cuenta que la relación de áreas bajo las curvas, de acuerdo con el modelo farmacocinético propuesto, corresponde al cociente de  $k_{21}/k_{12}$  y manteniéndose éste, podríamos decir que la distribución a cerebro no

se modifica con el tratamiento prolongado. Sin embargo, la observación de los perfiles de las curvas obtenidas con los implantes c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup> (L<sub>30</sub><sup>25</sup>)-70 (figura 5.20), sugiere una cierta modificación en la distribución a cerebro.

- **Respuesta neuronal.**

Implantes p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup>: para el estudio de la respuesta a nivel neuronal obtenida tras la inserción del implante p-G<sub>12</sub><sup>50</sup> - M<sub>B</sub><sup>50</sup> hemos obtenido la expresión de c-fos a las 24 horas, y a los 3 y 5 días. Los resultados se reflejan en la figura 4.49 para la corteza y en la figura 4.50 para estriado.

La inducción de c-fos tras la administración del implante es similar a la obtenida con dosis agudas. Hay inducción en la parte dorsal del estriado y en la parte lateral del núcleo accumbens y en las mismas capas celulares de la corteza cerebral. Sin embargo, el patrón de expresión en el estriado es distinto del obtenido con dosis agudas. Aunque la expresión no es homogénea, tampoco se perfilan parches celulares de expresión elevada. En la parte más medial del estriado el c-fos se expresa con mayor intensidad y va disminuyendo conforme avanzamos lateralmente. Este patrón de expresión no varía a lo largo del tiempo pero sí su intensidad. La mayor intensidad de expresión de c-fos se registró a las 24 horas disminuyendo aproximadamente a la mitad a los 3 días y manteniéndose así hasta el quinto día, lo que concuerda con los resultados de cesión (30% en las primeras 24 horas) y con las curvas de niveles séricos y cerebrales obtenidas (figura 5.19). La respuesta de la corteza a la metadona tras la inserción del implante sigue una dinámica algo diferente a la del estriado y núcleo accumbens, experimentando una ligera subida a las 24 horas que se mantiene hasta los tres días para luego alcanzar su máximo a los 5 días. Este mantenimiento de la respuesta farmacológica más allá del mantenimiento de los niveles cerebrales puede deberse, en parte, a un cambio en la cinética de la



degradación de la proteína c-Fos, debido a la inducción de otros factores de transcripción (los llamados FRA crónicos) que se inducen con el tratamiento prolongado (Hope *et al.*, 1994; Moratalla *et al.*, 1996a). Estos factores al formar dímeros con c-Fos pueden contribuir a su estabilización. Alternativamente cabe pensar que siendo la corteza muy sensible a los cambios ambientales, la inducción observada a los 5 días tras la inserción del implante pueda deberse a estos cambios más que al estímulo de la propia metadona.

Implantes c-L<sub>30</sub><sup>35</sup> - M<sub>B</sub><sup>65</sup>(L<sub>30</sub><sup>25</sup>)-70: con respecto a la respuesta neuronal en el estriado, con el implante de metadona de un mes, la mayor intensidad de expresión de c-fos se alcanzó en las primeras horas (4 y 24 h) después de la administración (figura 4.55), coincidiendo con los niveles más elevados de metadona en suero y cerebro. La expresión de c-fos disminuyó en más de la mitad a la semana manteniéndose después. A partir de la cuarta semana, el nivel de expresión de c-fos decayó por debajo de los límites de detección (Figura 4.55) independientemente de los niveles séricos y cerebrales pues, tal y como se observa en la figura 5.20, éstos se mantienen e incluso aumentan en cerebro. Esta diferencia entre niveles cerebrales y niveles de expresión de c-fos en el estriado puede deberse al fenómeno de tolerancia, descrito para los efectos de morfina o bien puede deberse a una disminución en la expresión de c-fos inducida por el tratamiento crónico, como la descrita para la administración crónica de cocaína que, a pesar del incremento en la respuesta funcional, disminuye en estriado (Moratalla *et al.*, 1996a). La respuesta del núcleo accumbens presenta una cinética similar a la del estriado. Sin embargo, la expresión de c-fos sólo se mantiene hasta la tercera semana tras la cual decae a valores basales. En cuanto a la corteza hemos

observado los mismos picos de respuesta a tiempos cortos que se repiten a las dos y cuatro semanas de la implantación (figura 4.54).

Por tanto, la cinética de la respuesta a la metadona tras la dosificación crónica en implantes tiene dos perfiles diferentes, por un lado el núcleo accumbens y el estriado, y por otro la respuesta en la corteza. La diferencia entre estos dos perfiles podría deberse a una diferente acumulación de metadona en las distintas regiones cerebrales independientemente de los niveles de metadona en suero y cerebro completo. Estas diferencias en el perfil se podrían haber evidenciado con evaluaciones de metadona en distintas zonas, sin embargo no pudo llevarse a cabo debido a limitaciones técnicas.

En general, nuestros resultados indican que los niveles de expresión de c-fos inducidos por metadona, administrada en régimen agudo o mediante implantes de cesión continua, reflejan cambios en el estado fisiológico de las neuronas que se activan para prevenir el síndrome de abstinencia agudo a morfina o heroína.

En resumen, se han elaborado dos sistemas que ceden metadona a lo largo de aproximadamente 1 y 5 semanas y que mantienen niveles séricos en el intervalo de concentraciones consideradas terapéuticas. No obstante, hemos de resaltar que la farmacocinética en ratones es muy diferente a la de humanos, con valores de aclaramiento sérico más elevados y vida media mucho más corta, de aproximadamente 1 hora frente a las 36 horas en humanos.

Aún admitiendo que el comportamiento cinético de la metadona sea diferente también se ha documentado que se activa, tras su administración continuada, un proceso de autoinducción del sistema enzimático del CYP involucrado en su metabolismo. Sin embargo, la mayor vida media en humanos podría amortiguar las fluctuaciones observadas en las concentraciones séricas con los implantes elaborados, por lo que tanto los implantes para una semana como para aproximadamente un mes de tratamiento, podrían ser potencialmente eficaces para pacientes estables sometidos a terapia de mantenimiento facilitando por un lado, la integración socio-laboral de los mismos y por otro, evitando la presencia de metadona en el mercado negro consecuencia de las dosis dispensadas semanalmente.

## **CONCLUSIONES**

## 6.- CONCLUSIONES

- 1.- Las curvas de niveles de metadona en suero y cerebro se ajustan al modelo bicompartimental propuesto, en el que la cantidad de metadona en cerebro se considera que forma parte del compartimento periférico debido a que proporcionalmente representa una cantidad muy pequeña.
- 2.- El aclaramiento de la metadona en ratones aumenta tras la administración única de ocho dosis de 12 mg/kg cada 12 horas, evidenciándose el proceso de autoinducción enzimática documentado en la literatura.
- 3.- La cesión *in vitro* de la metadona depende de su solubilidad en los materiales empleados para la elaboración de los sistemas de liberación controlada fabricados en este trabajo.
- 4.- Los implantes elaborados exclusivamente con metadona base presentan un perfil de cesión próximo al óptimo cuando son recubiertos con PLA en un amplio intervalo de pesos moleculares.
- 5.- Aunque las microesferas como sistemas de cesión controlada permiten una mayor versatilidad en la dosificación, los implantes presentan unos perfiles de liberación, tanto *in vitro* como *in vivo*, idóneos para alcanzar y mantener concentraciones terapéuticas durante largos periodos de tiempo.
- 6.- La variabilidad del aclaramiento durante los tratamientos con metadona no permite el empleo de los métodos de deconvolución para estimar los perfiles de cesión *in vivo*, pero sí nos ha permitido establecer los límites de dichos perfiles a lo largo de un tratamiento crónico.
- 7.- Las correlaciones establecidas entre los porcentajes de metadona cedidos *in vivo*, estimados a partir de la metadona remanente en los implantes, y los

cedidos *in vitro* son perfectas, con pendientes muy próximas a la unidad.

**8.-** Tomando como referencia los implantes de una semana, la biodisponibilidad relativa de las microesferas fue de 0,4 probablemente debido a una liberación incompleta de metadona.

**9.-** La liberación de la metadona desde los implantes es completa, sin embargo, la relación de áreas bajo la curva de niveles séricos normalizadas de los implantes de un mes con respecto a los de una semana es de 0,54, debido probablemente al proceso de autoinducción enzimática que se evidencia transcurrida la primera semana de tratamiento.

**10.-** La relación entre las áreas bajo la curva de niveles en cerebro y suero estimada para dosis única se mantiene prácticamente invariable con la administración crónica en implantes. Sin embargo, el paralelismo observado en las curvas de ambos niveles con dosis única e implantes de una semana no se mantiene con los implantes de un mes detectándose una ligera acumulación en cerebro al final del tratamiento.

**11.-** La metadona induce la expresión c-fos en el estriado y en la corteza de cerebro de ratón de manera dosis dependiente. Esta expresión de c-fos se correlaciona con los niveles cerebrales y séricos de metadona tras la administración subcutánea en disolución.

**12.-** Los implantes de metadona de una semana y de un mes producen una liberación sostenida de metadona capaz de activar neuronas estriatales e inducir respuestas funcionales durante aproximadamente el tiempo que se mantiene la cesión.

## **BIBLIOGRAFÍA**

## 7.- BIBLIOGRAFÍA

Abramson F. P. "Methadone plasma protein binding: alterations in cancer and displacement from  $\alpha_1$ -acid glycoprotein". *Clin. Pharmacol. Ther.* 1982; 32 (5): 652-658.

Adams J. C. "Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product". *J. Histochem. Cytochem.* 1981; 29 (6): 775.

Änggård E., Gunne L. M., Holmstrand J., McMahon R. E., Sandberg C. G. y Sullivan H. R. "Disposition of methadone in methadone maintenance". *Clin. Pharmacol. Ther.* 1975; 17 (3): 258-266.

Aosaki T., Kiuchi K. y Kawaguchi Y. "Dopamine D1-like receptor activation excites rat striatal large aspiny neurons in vitro". *J. Neurosci.* 1998; 18 (14): 5180-5190.

Arvidsson U., Riedl M., Chakrabati S., Lee J-H., Nakano A. H., Dado R. J., Loh H. H., Law P-Y., Wessendorf M. M. y Elde R. "Distribution and targeting of a mu-opioid receptor (MOR1) in brain and spinal cord". *J. Neurosci.* 1995; 15 (5 Pt 1): 3328-3341.

Barrot M., Marinelli M., Abrous D. N., Rougé-Pont F., Le Moal M. y Piazza P. V. "Functional heterogeneity in dopamine release and in the expression of Fos-like proteins within the rat striatal complex". *Eur. J. Neurosci.* 1999; 11 (14): 1155-1166.



Bell J., Seres B., Bowron P., Lewis J. y Batey R. "The use of the serum methadone levels in patients receiving methadone maintenance". *Clin. Pharmacol. Ther.* 1988; 43 (6): 623-629.

Bell J., Bowron P., Lewis J. y Batey R. "Serum levels of methadone in maintenance clients who persist in illicit drug use". *Br. J. Addict.* 1990; 85 (12): 1599-1602.

Bell J. y Zador D. "A risk-benefit analysis of methadone maintenance treatment". *Drug Safety.* 2000; 22 (3): 179-190.

Benet L. Z., Øie S. y Schwart J. B. "Design and optimization of dosage regimens; pharmacokinetic data" en *The pharmacological basis of therapeutics*". Ed. Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Goodman-Gilman, A.; McGraw-Hill, New York. 1996; Appendix II: pp. 1758.

Bertschy G. "Methadone maintenance treatment: an update". *Eur. Arch. Psychiatry Clin. Neurosci.* 1995; 245 (2): 114-124.

Bolam J. P. y Bennett B. D. "Microcircuitry of the neostriatum" en *Molecular and cellular mechanisms of the neostriatal function*. Ed. M. y. S. Ariano, D. J. 1995.

Boulton D. W., Arnaud P. y De Vane C. L. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone enantiomers after a single oral dose of racemate". *Clin. Pharmacol. Ther.* 2001; 70 (1): 48-57.

Bushell T., Endoh T., Simen A. A., Ren D., Bindokas V. P. y Miller R. J. "Molecular components of tolerance to opiates in single hippocampal neurons". *Mol. Pharmacol.* 2002; 61(1): 55-64.

Calvo R., Aguirre C., Troconiz I. F., López J. y Garrido M. J. "Alpha<sub>1</sub>-acid glycoprotein and serum protein binding of methadone in heroin addicts during withdrawal". *Proceedings of the Six World Congress on Clinical Pharmacology and Therapeutics*. Buenos Aires, Argentina. 1996; pp. 174.

Caplehorn J. R. M. y Bell M. J. "Methadone dosage and retention of patients in maintenance treatment". *Med. J. Aust.* 1991; 154 (3): 195-199.

Cha Y. y Pitt C. G. "A one-week subdermal delivery system for L-methadone based on biodegradable microcapsules". *J. Control. Release.* 1988; 7: 69-78.

Cha Y. y Pitt C. G. "The acceleration of degradation-controlled drug delivery from polyester microspheres". *J. Control. Release.* 1989; 8: 259-265.

Chang S. L. y Harlan R.E. "The fos protooncogene protein: regulation by morphine in the rat hypothalamus". *Life Sci.* 1990; 46 (25): 1825-1832.

Chang H. T. y Kita H. "Interneurons in the rat striatum: relationships between parvalbumin neurons and cholinergic neurons". *Brain Res.* 1992; 574 (1-2): 307-311.

Choulis N.H. y Abellana-Intaphan L.; Long acting methadone formulation. *Pharmazie.* 1977; 32: 518-519.

Cowan R. L., Wilson C. J., Emson P. C. y Heizmann C. W. "Parvalbumin-containing GABAergic interneurons in the rat neostriatum". *J. Comp. Neurol.* 1990; 302 (2): 197-205.

Cushman P., JR. "Ten years of methadone maintenance treatment: some clinical observations". *Am. J. Drug Alcohol Abuse.* 1977; 4 (4): 543-553.

De Leede L.G.J., Broek R.J.V.D., Zee M.F.H. y De Blaey C.J. "Drug resin salts of methadone and quinine". *Pharm. Weekbl. Sci.* 1979; 1: 20-24.

Delgado A. "Diseño y optimización de un sistema de cesión controlada de metadona". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. La Laguna. 1995.

Delgado A., Évora C. y Llabrés M. "Optimization of 7-day release (in vitro) from DL-PLA methadone microspheres". *Int. J. Pharm.* 1996; 134: 203-211.

Dessalles M.C., Gasdeblay S. y Mahuzier G. "Détermination de la méthadone sérique à l'aide d'une trousse immunologique et comparaison avec une méthode en chromatographie liquide". *Ann. Biol. Clin.* 1996; 54 (5): 203-209.

Di Chiara G. e Imperato A. "Drugs abused by humans preferentially increase synaptic dopamine concentrations in the mesolimbic system of freely moving rats". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1988; 85 (14): 5274-5278.

Dole V. P. "Implications of methadone maintenance for theories of narcotic addiction". *J. Am. Med. Assoc.* 1988; 260 (20): 3025-3029.

Dole V. P. y Nyswander M. E. "A medical treatment for diacetylmorphine (heroin) addiction: a clinical trial with methadone hydrochloride". *J. Am. Med. Assoc.* 1965; 193: 646-650.

Dole V. P., Nyswander M. E. y Warner A. "Successful treatment of 750 criminal addicts". *J. Am. Med. Assoc.* 1968; 206 (12): 2708-2711.

D'Souza D. N., Harlan R. E., Garcia M. M. "Sexual dimorphism in the response to N-methyl-D-aspartate receptor antagonists and morphine on behavior and c-Fos induction in the rat brain". *Neuroscience.* 1999; 93 (4): 1539-47.

Dyer K. R., Foster D. J. R., White J. M., Somogyi A. A., Menelaou A. y Bochner F. "Steady-state pharmacokinetics and pharmacodynamics in methadone maintenance patients: comparison of those who do and do not experience withdrawal and concentration-effect relationships". *Clin. Pharmacol. Ther.* 1999; 65 (6): 685-694.

Eap C.B., Cuendet C. y Baumann P. "Binding of methadone, l-methadone, and d-methadone to proteins in plasma of healthy volunteers: Role of the variants of  $\alpha$ -1 acid glycoprotein". *Clin. Pharmacol. Ther.* 1990; 47 (3): 338-346.

Eap C. B., Bourquin M., Martin J., Spagnoli J., Livoti S., Powell K., Baumann P. y Déglon J. "Plasma concentrations of the enantiomers of methadone and therapeutic response in methadone maintenance treatment". *Drug Alcohol Depend.* 2000; 61(1): 47-54.

Fernández Carballido A. "Preparación de microesferas de Ibuprofeno para administración intraarticular". Tesis Doctoral. Facultad de Farmacia. Madrid. 2000.

Foster D. J. R., Somogyi A. A. y Bochner F. "Methadone N-demethylation in human liver microsomes: lack of stereoselectivity and involvement of CYP3A4". *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1999; 47 (4): 403-412.

Foster D. J. R., Somogyi A. A., Dyer K. R., White J. M. y Bochner F. "Steady-state pharmacokinetics of (R)- and (S)-methadone in methadone maintenance patients". *Br. J. Clin. Pharmacol.* 2000; 50 (5): 427-440.

Frankel P. S., Harlan R. E. y Garcia M. M. "The 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist, MDL 72222, dose-dependently potentiates morphine-induced immediate-early gene expression in the rat caudate putamen". *Brain res.* 1998; 814 (1-2): 186-193.

Gabrielsson J. L., Johansson P., Bondesson U. y Paalzow L. K. "Analysis of methadone disposition in the pregnant rat by means of a physiological flow model". *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1985; 13 (4): 355-372.

Gabrielsson J. L., y Groth T. "An extended physiological pharmacokinetic model of methadone disposition in the rat: validation and sensitivity analysis". *J. Pharmacokinet. Biopharm.* 1988; 16 (2): 183-201.

Gardier A. M., Moratalla R., Cuellar B., Sacerdote M., Guibert B, Lebrél H. y Graybiel A. M. "Interaction between the serotonergic and dopaminergic systems in d-fenfluramine-induced activation of c-fos and jun B genes in rat striatal neurons". *J. Neurochem.* 2000; 74 (4): pp 1363-1373.

Garrido M. J., Jiménez R., Gómez E. y Calvo R. "Influence of plasma-protein binding on analgesic effect on methadone in rats with spontaneous withdrawal". *J. Pharm. Pharmacol.* 1996; 48 (3): 281-284.

Garrido M. J. y Trocóniz I. F. "Methadone: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties". *J. Pharmacol. Toxicol.* 1999; 42 (2): pp. 61-66.

Georges F., Stinus L. y Le Moine C. "Mapping of c-fos gene expression in the brain during morphine dependence and precipitated withdrawal, and phenotypic identification of the striatal neurons involved". *Eur. J. Neurosci.* 2000; 12 (12): 4475-4486.

Gerfen C. R., Baimbridge K. G. y Miller J. J. "The neostriatal mosaic: compartmental distribution of calcium-binding protein and parvalbumin in the basal ganglia of the rat and monkey". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985; 82 (24): 8780-8784.

Ghozland S., Matthes H. W., Simonin F., Filliol D., Kieffer B. L. y Maldonado R. "Motivational effects of cannabinoids are mediated by mu-opioid and kappa-opioid receptors". *J. Neurosci.* 2002; 22 (3): 1146-1154.

Gómez E., Martínez-Jordá R., Suárez E., Garrido M. J. y Calvo R. "Altered methadone analgesia due to changes in plasma protein binding: role of the route of administration". *Gen Pharmacol.* 1995; 26 (6): 1273-1276.

Graybiel A. M. y Ragsdale C. W. "Histochemically distinct compartments in the striatum of human, monkeys and cat demonstrated by cetylthiocholinesterase staining". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978; 75 (11): 5723-5726.

Graybiel A. M. y Moratalla R. "Dopamine uptake sites in the striatum are distributed differentially in striosome and matrix compartments". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989; 86 (22): 9020-9024.

Graybiel A. M. "Neurotransmitters and neuromodulators in the basal ganglia". *Trends Neurosci*. 1990; 13 (7): 244-254.

Gref R. Minamitake, Y. Peracchia, M. Trubetskoy, V. Torchilin, V. y Langer R. "Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres". *Science*. 1994; 263 (5153): 1600-1603.

Harrison L. M., Kastin A. J. y Zadina J. E. "Differential effects of endomorphin-1, endomorphin-2, and Tyr-W-MIF-1 on activation of G-proteins in SH-SY5Y human neuroblastoma membranes". *Peptides*. 1998; 19 (4): 749-753.

Hayward M., Duman R. S. y Nestler E. J. "Induction of the *c-fos* proto-oncogene during opiate withdrawal in the locus coeruleus and other regions of rat brain". *Brain res*. 1990; 525 (2): 256-266.

Herkenhan M. y Pert C. B. "Mosaic distribution of opiate receptors, parafascicular projections and acetylcholinesterase in rat striatum". *Nature*. 1981; 291 (5814): 415-418.

Holmstrand J., Änggard E. y Gunne L. M. "Methadone maintenance: plasma levels and therapeutic outcome". *Clin. Pharmacol. Ther*. 1978; 23 (2): 175-180.

Hope B. T., Nye H. E., Kelz M. B., Self D. W., Iadarola M. J., Nakabeppu Y., Duman R. S. y Nestler E. J. "Induction of a long-lasting AP-1 complex

composed of altered Fos-like proteins in brain by chronic cocaine and other chronic treatments". *Neuron*. 1994; 13 (5): 1235-1244.

Hsu S. M., Raine L. Y Fanger H. "Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures". *J. Histochem. Cytochem.* 1981; 29 (4): 577-580.

Inturrisi C.E., Colburn W.A., Kaiko R.F., Houde R.W. y Foley K.M. "Pharmacokinetics and pharmacodynamics of methadone in patients with chronic pain". *Clin. Pharmacol. Ther.* 1987; 41 (4): 392-401.

Joel D. y Weiner I. "The organization of the basal ganglia-thalamocortical circuits: open interconnected rather than closed segregated". *Neuroscience*. 1994; 63 (2): 363-379.

Joel D. y Weiner I. "The connections of the dopaminergic system with the striatum in rats and primates: an analysis with respect to the functional and compartmental organization of the striatum". *Neuroscience*. 2000; 96 (3): 451-474.

Jordan B. A. y Devi L. A. "G-protein-coupled receptor heterodimerization modulates receptor function". *Nature*. 1999; 399 (6737): 697-700.

Kawaguchi Y., Wilson C. J. y Emson P. C. "Projection subtypes of rat neostriatal matrix cells revealed by intracellular injection of biocytin". *J. Neurosci.* 1990; 10 (10): 3421-3438.



Kawaguchi Y. "Physiological, morphological and histochemical characterization of three classes of interneurons in rat neostriatum". *J. Neurosci.* 1993; 13 (11): 4908-4923.

Kawaguchi Y., Wilson C. J., Augood S. J. y Emson P. C. "Striatal interneurons: chemical, physiological and morphological characterization". *Trends Neurosci.* 1995; 18 (12): 527-535.

Kell M. J. "Utilization of plasma and urine methadone concentration measurements to limit narcotic use in methadone maintenance patients: II. Generation of plasma concentration response curves". *J. Addict Dis.* 1995; 14 (1): 85-108.

Kieffer B. L. "Opioids: first lessons from knockout mice". *Trends Pharmacol. Sci.* 1999; 20 (1): 19-26.

Kobayashi D., Tsubuku S., Yamanaka H., Asano M., Miyajima M. y Yoshida M. "In vivo characteristic of injectable poly(DL-lactic acid) microspheres for long-acting drug delivery". *Drug Dev. Ind. Pharm.* 1998; 24 (9): 819-825.

Kristensen K., Blemmer T., Angelo H. R. *et al.* "Stereoselective pharmacokinetics of methadone in chronic pain patients". *Ther. Drug Monit.* 1996; 18 (3): 221-227.

Kubota Y. y Kawaguchi Y. "Spatial distributions of chemically identified intrinsic neurons in relation to matrix and intermatrix compartments of rat neostriatum". *J. Comp. Neurol.* 1993; 332 (4): 499-513.

Kulkarni R. K., Pani K. C., Neuman C. y Leonard F. "Polylactic acid for surgical implants". *Arch. Surg.* 1966; 93 (5): 839-843.

Ling G. S., MacLeod J. M., Lee S., Lockhart S. H. y Pasternak G. W. "Separation of morphine analgesia from physical dependence". *Science.* 1984; 226 (4673): 462-464.

Liu J., Nickolenko J y Sharp F. R. "Morphine induces *c-fos* and *junB* in striatum and nucleus accumbens via D<sub>1</sub> and N-methyl-D-aspartate receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1994; 91 (18): 8537-8541.

Liu L., Li S., Garreau H. y Vert M. "Selective enzymatic degradations of poly(L-lactide) and poly(epsilon-caprolactone) blend films". *Biomacromolecules.* 2000; 3: 350-359.

Loimer N. y Schmid R. "The use of plasma levels to optimise methadone maintenance treatment". *Drug Alcohol Depend.* 1992; 30 (3): 241-246.

Llabrés M. "Método general de deconvolución numérica mediante programación simbólica. Análisis de cesión in vivo". *V Congreso de la SEFIG.* Valencia 2001.

Mansour A., Fox C. A., Akil H. y Watson S.J. "Opioid-receptor mRNA expression in the rat CNS: anatomical and functional implications". *Trends Neurosci.* 1995; 18 (1): 22-29.

Mansouri F. A., Motamedi F., Fathollahi Y., Atapour N. y Semnianian S. "Augmentation of LTP induced by primed-bursts tetanic stimulation in

hippocampal CA1 area of morphine dependent rats". *Brain Res.* 1997; 769 (1): 119-124.

Massotte D. y Kieffer B. L. "A molecular basis for opiate action". *Essays Biochem.* 1998; 33: 65-77.

Matthes H. W. D., Maldonado R., Simonin F., Valverde O., Slowe S., Kitchen I., Befort K., Dierich A., Le Meur M., Dollé P, Tzavara E., Hanoune J., Roques B. P. y Kieffer B. L. "Loss of morphine-induced analgesia, reward effect and withdrawal symptoms in mice lacking the  $\mu$ -opioid-receptor gene". *Nature.* 1996; 383 (6603): 819-823.

Mayer D. J., Mao J., Holt J. y Price D. D. "Cellular mechanisms of neuropathic pain, morphine tolerance, and their interactions". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999; 96 (14): 7731-7736.

McConalogue K., Grady E. F., Minnis J., Balestra B., Tonini M., Brecha N. C., Bunnett N. W. y Sternini C. "Activation and internalization of the mu-opioid receptor by the newly discovered endogenous agonists, endomorphin-1 and endomorphin-2". *Neuroscience.* 1999; 90 (3): 1051-1059.

Moratalla R., Robertson H. A. y Graybiel A. M. "Dinamic regulation of NGFI-A (zif268, egr1) gene expression in the striatum". *J. Neurosci.* 1992; 12 (7): 2609-2622.

Moratalla R., Vickers E. A., Robertson H. A., Cochran B. H. y Graybiel A. M. "Coordinate expression of c-fos and jun B is induced in the rat striatum by cocaine". *J. Neurosci.* 1993; 13 (2): 423-33.

Moratalla R., Elibol B., Vallejo M. y Graybiel A. M. "Network-level changes in expression of inducible Fos-Jun Proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal". *Neuron*. 1996 a; 17 (1): 147-156.

Moratalla R., Vallejo M., Elibol B., y Graybiel A. M. "D1 class dopamine receptors influence cocaine-induced persistent expression of Fos-related proteins in striatum". *Neuroreport*. 1996 b; 8 (1): 1-5.

Munguía O., Delgado A., Fariña J., Évora C. y Llabrés M. "Optimization of dl-PLA molecular weight via the response surface method". *Int. J. Pharm.* 1992; 86: 107-111.

Negrín C. M., Delgado A., Llabrés M. y Évora C. "In vivo-in vitro study of biodegradable methadone delivery systems". *Biomaterials*. 2001; 22 (6): 563-570.

Neil A. "Affinities of some common opioid analgesics towards four binding sites in the mouse brain". *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 1984; 328 (1): 24-29.

O'Brien C. P. "Drug addiction and drug abuse" en *The pharmacological basis of therapeutics*". Ed. Hardman, J. G., Limbird, L. E., Molinoff, P. B., Ruddon, R. W., Goodman-Gilman, A.; McGraw-Hill, New York. 1996; Cap. 24: pp. 557.

Pasternak G. W., Wilson H. A. y Snyder S.H. "Differential effects of protein-modifying reagents on receptor binding of opiate agonists and antagonists". *Mol. Pharmacol.* 1975; 11 (3): 340-351.

Pitcher J. A., Freedman N. J. y Lefkowitz R. J. "G protein-coupled receptor kinases". *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67: 653-692.

Rivera A., Cuéllar B., Girón F. J., Grandy D. K., de la Calle A. y Moratalla R. "Dopamine D<sub>4</sub> receptors are heterogeneously distributed in striosomes/matrix compartments of the striatum". *J. Neurochem.* 2002; 80 (2): 219-229.

Romanch M. K., Piafsky K. M., Abel J. G., Khouw V. y Sellers E. M. "Methadone binding to orosomucoid ( $\alpha_1$ -acid glycoprotein): determinant of free fraction in plasma". *Clin. Pharmacol. Ther.* 1981; 29 (2): 211-217.

Rostami-Hodjegan A., Wolff, K., Hay, A. W. M., Raistrick, D., Calvert, R. y Tucker, G.T. "Population pharmacokinetics of methadone in opiate users: characterization of time dependent changes". *Br. J. Clin. Pharmacol.* 1999; 48 (1): 43-52.

Schmidt N., Brune K., Williams K. M. y Geisslinger G. "Stereoselective pharmacokinetics of methadone in beagle dogs". *Chirality.* 1994; 6 (6): 492-495.

Sepúlveda M. J., Hernández L., Rada P., Tucci S. y Contreras E. "Effect of precipitated withdrawal on extracellular glutamate and aspartate in the nucleus accumbens of chronically morphine-treated rats: an in vivo microdialysis study". *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1998; 60 (1): 255-262.

Sorensen J. L. "Methadone treatment for opiate addicts". *Br. Med. J.* 1996; 313 (7052): 245-246.

Spanagel R., Almeida O. F., Bartl C. y Shippenberg T. S. "Endogenous kappa-opioid systems in opiate withdrawal: role in aversion and accompanying changes in mesolimbic dopamine release". *Psychopharmacology*. 1994; 115 (1-2): 121-127.

Sternini C., Brecha N. C., Minnis J, D'Agostino G., Balestra B., Fiori E. y Tonini M. "Role of agonist-dependent receptor internalization in the regulation of mu opioid receptors". *Neuroscience*. 2000; 98 (2): 233-241.

Stornetta R. L., Norton F. E. y Guyenet P. G. "Autonomic areas of rat brain exhibit increased Fos-like immunoreactivity during opiate withdrawal in rats". *Brain res*. 1993; 624 (1-2): 19-28.

Tan A., Moratalla R., Lyford G. L., Worley P. y Graybiel A. M. "The activity-regulated cytoskeletal associated protein arc is expressed in different striosome-matrix patterns following exposure to amphetamine and cocaine". *J. Neurochem*. 2000; 74 (5): 2074-2078.

Terenius L. "From opiate pharmacology to opioid peptide physiology". *Ups. J. Med. Sci*. 2000; 105(1): 1-15.

Torrens M., Castillo C., San Ll., del Moral E., González M. L. y de la Torre R. "Plasma methadone concentrations as an indicator of opioid withdrawal symptoms and heroin use in a methadone maintenance program". *Drug Alcohol Depend*. 1998; 52 (3): 193-200.

Tracy M. A., Ward K. L., Firouzabadian L., Wang Y., Dong N., Qian R. y Zhang Y." Factors affecting the degradation rate of poly (lactide-co-glycolide) microspheres in vivo and in vitro". *Biomaterials*. 1999; 20(11): 1057-1062.

Valjent E., Corvol J.C., Pages C., Besson M.J., Maldonado R. y Caboche J. "Involvement of the extracellular signal-regulated kinase cascade for cocaine-rewarding properties". *J. Neurosci.* 2000; 20 (23): 8701-8709.

Walker R. H., Arbuthnott G. W., Baughman R. W. y Graybiel A. M. "Dendritic domains in medium spiny neurons in the primate striatum: relationships to striosomal borders". *J. Comp. Neurol.* 1993; 337 (4): 614-628.

Wilkins J. N., Ashofteh A., Setoda D., Wheatley W. s., Huigen H. y Ling W. "Ultrafiltration using the Amicon MPS-1 for assessing methadone plasma protein binding". *Ther. Drug Monit.* 1997; 19 (1): 83-87.

Wolff K. Sanderson M. y Hay A. W. M. "Methadone concentrations in plasma and their relationship to drug dosage". *Clin. Chem.* 1991; 37 (2): 205-209.

Wolff K. y Hay A. W. M. "Methadone concentrations in plasma and their relationship to drug dosage". *Clin. Chem.* 1992; 38 (3): 438-439.

Wolff K., Hay A. W. M., Raistrick D. y Calvert R. "Steady-state pharmacokinetics of methadone in opioid addicts". *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1993; 44 (2): 189-194.

Wolff K., Rostami-Hodjegan A., Hay A. W. M., Raistrick D. y Tucker G. T. "Population-based pharmacokinetic approach for methadone monitoring of opiate addicts: potential clinical utility". *Addiction.* 2000; 95 (12): 1771-1783.

Wolfrang S. "Mathematica". Wolfrang Research Inc., & Addison Wesley Pub. Co. Redwood City, 1988.

Xu M., Koeltzow T. E., Santiago G. T., Moratalla R., Cooper D. C., Hu X. T., White, N. M., Graybiel A. M. White F. J. y Tonegawa S. "Dopamine D3 receptor mutant mice exhibit increased behavioral sensitivity to concurrent stimulation of D1 and D2 receptors". *Neuron*. 1997; 19 (4): 837-848.

Young S. T., Porrino L. J. y Iadarola M. J. "Cocaine induces striatal c-fos immunoreactive proteins via dopaminergic D1 receptors". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991; 88 (4): 1291-1295.

Zanis D. A., Mc Clellan T., Alterman A. I. y Cnaan R. A. "Efficacy of enhanced outreach counselling to reenroll high-risk drug users 1 year after discharge from treatment". *Am. J. Psychiatry*. 1996; 153 (8): 1095-1096.