

**UNIVERSIDAD DE LA REPÚBLICA
FACULTAD DE VETERINARIA**

**BIODISPONIBILIDAD DE METADONA ASOCIADA O NO A KETOCONAZOL POR
VÍA ORAL EN PERROS**

“por”

César Daniel HERNÁNDEZ PEREIRA

TESIS DE GRADO presentada como uno de
los requisitos para obtener el título de Doctor
en Ciencias Veterinarias
Orientación: Medicina Veterinaria

MODALIDAD: Ensayo experimental

**MONTEVIDEO
URUGUAY
2018**

TESIS DE GRADO aprobada por:

Presidente de mesa:

Dra. Silvana Alvariza

Segundo miembro (Tutor):

Dra. Nadia Crosignani

Tercer miembro:

Dra. Gimena Feijóo

Cuarto Miembro (Co Tutor):

Dr. Gonzalo Suárez

Fecha:

_____ **30/10/2018**

Autor:

Br. César Daniel Hernández Pereira

AGRADECIMIENTOS

A mi madre, hermana y hermano por todo el apoyo brindado en estos años y haberme dado la posibilidad y el estímulo de estudiar. Así como al resto de la familia por estar presentes y dar siempre sus palabras de aliento.

A mis amigos y amigas, tanto los que me ha dado esta casa de estudio como los que he encontrado a lo largo de mi vida. Por tantas palabras de apoyo, comprensión y saber levantar el ánimo y brindar contención cuando el estrés del estudio lo desborda a uno.

A mi tutora y co-tutor por todo el apoyo, comprensión y ayuda brindada durante este proceso llamado tesis. Mejores no podría haber pedido.

A mis compañeros de la cátedra de Semiología por todo el apoyo y ayuda brindados en estos años de carrera que he formado parte del área, por siempre impulsar hacia adelante y estimular a que uno se forme.

Y por último, pero no por ello menos importante, a esta hermosa casa de estudio y sus docentes por haberme dado algunos de los años más lindos de mi vida hasta ahora. Me llevo aprendizajes tanto desde el punto de vista profesional, como personal de mi pasaje por ella; y un magnífico grupo de amigos.

“Piensa. Desea. Y con el deseo: ¡Hazlo!” Ray Bradbury

Tabla de Contenido

Página de aprobación.....	2
Agradecimientos.....	3
Lista de tablas y lista de figuras:.....	6
Resumen:	7
Summary:	7
1 <u>INTRODUCCIÓN:</u>	8
2 <u>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:</u>	9
3 <u>HIPÓTESIS:</u>	16
4 <u>OBJETIVOS:</u>	16
4.1 Objetivo general:	16
4.2 Objetivos específicos:	16
5 <u>MATERIALES Y MÉTODOS:</u>	16
5.1 Materias primas:.....	16
5.2 Aparatos y equipamientos:.....	16
5.3 Solventes y otros:.....	17
5.4 Animales:	17
5.4.1 Selección de animales: Análisis genético	17
5.5 Muestras de Sangre:.....	18
6 <u>ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN FARMACOCINÉTICA:</u>	18
6.1 Evaluación farmacocinética:.....	19
6.2 Metodología analítica:	19
6.2.1 Adaptación de la metodología analítica:	19
6.2.2 Preparación de las muestras:.....	19
6.2.3 Preparación de las soluciones de la curva estándar:.....	20
6.2.4 Validación parcial de la metodología analítica	20
6.2.5 Evaluación no compartimental del perfil sérico de la Metadona	20
6.3 Análisis estadístico	21
7 <u>RESULTADOS:</u>	22
7.1 Análisis Genético:.....	22
7.2 Validación:.....	22
7.2.1 Selectividad.....	23
7.2.2 Precisión	23
7.2.3 Exactitud	24
7.2.4 Linealidad.....	24
7.2.5 Límite de cuantificación.....	25

7.3 Evaluación Farmacocinética de Metadona.....	25
7.3.1 Evaluación Farmacocinética de Metadona después de la administración IV	25
7.3.2 Análisis farmacocinético de Metadona en comprimido por vía oral.....	26
8 <u>DISCUSIÓN:</u>	27
9 <u>CONCLUSIONES:</u>	29
<u>BIBLIOGRAFÍA</u>	30
ANEXO 1	33
ANEXO 2	34

Lista de tablas:

Tabla 1: Parámetros utilizados en el espectrómetro de masas para detección de Metadona en plasma de perros usando Fentanilo como estándar interno (EI).....	19
Tabla 2: Desviaciones estándar relativas intradía de las tres muestras control de calidad, utilizadas para la curva estándar de Metadona en suero de perros.....	23
Tabla 3: Exactitud para las muestras de control de calidad utilizadas para la curva estándar de Metadona en suero de perros.....	24
Tabla 4: Parámetros farmacocinéticos medios obtenidos por un enfoque no compartimental a partir de los datos serológicos resultantes de la administración de Metadona IV 0,5 mg / kg y de la administración de 0,5 mg/kg de Metadona PO. co-administrada asociada a 10 mg/kg de Ketoconazol PO. (c/12h 2 dosis) (n = 4).....	26

Lista de figuras:

Figura 1: Gel de Poliacrilamida con la corrida de los cuatro perros (1, 2, 3 y 4), un control (C) y los marcadores moleculares (M). La flecha indica el lugar donde se encuentra el MDR1 (148 pb). Un perro negativo para la mutación previamente tipificada fue usado como control (C).....	22
Figura 2: Cromatogramas obtenidos por CLAE/EM para Metadona y Fentanilo en suero de perros: a) muestra de la curva estándar con 100 ng/mL de Fentanilo; b) muestra de la curva estándar con 100 ng/mL de Metadona.....	23
Figura 3: Curva de calibración media para Metadona en suero de perros determinada por CLAE/EM.....	24
Figura 4: Perfil de la concentración sérica media de Metadona tras la administración intravenosa de 0,5 mg/kg a perros Cocker Spaniel (n=4, media \pm error estándar).....	25
Figura 5: Perfil de la concentración sérica media de Metadona tras la administración de la dosis de 0,5 mg/kg asociada a Ketoconazol (10 mg/kg PO c/12h, 2 dosis) en perros Cocker Spaniel Inglés (n=4, media \pm desvío estándar).....	27

Resumen:

Este trabajo tuvo como objetivo determinar la biodisponibilidad de la Metadona así como sus parámetros farmacocinéticos al ser administrada por vía oral, en forma solitaria, así como co-administrada junto con Ketoconazol, un fármaco inhibidor reversible de la CYP3A, reduciendo así el metabolismo de la misma. La Metadona se administró de forma intravenosa (0,5 mg/kg), en perros de la raza Cocker Spaniel Inglés, así como también se utilizó Metadona en comprimido (0,5 mg/kg) asociada o no a Ketoconazol (10 mg/kg, dos dosis), obteniendo así tres grupos. Las concentraciones séricas resultantes fueron determinadas por cromatografía líquida de alta eficiencia con espectrómetro de masas, empleándose metodología validada y los perfiles plasmáticos individuales fueron evaluados por abordaje no compartimental, utilizando el software Excel® 2003, para la determinación de los parámetros farmacocinéticos, que fueron comparados estadísticamente por la prueba Wilcoxon Rank-Sum y Kruskal-Wallis ($\alpha = 0,05$). Después de la administración de la Metadona PO, solo el grupo en la que se la co-administro con Ketoconazol presentó concentraciones séricas detectables, presentando además el fenómeno de doble pico plasmático sérico. Los resultados nos permiten indicar que el uso de comprimido de Metadona presenta una baja absorción, alcanzando niveles séricos no cuantificables por la metodología empleada; Sin embargo, cuando se co-administra con Ketoconazol sí se detectan concentraciones séricas, lo que nos permite concluir que el uso de Metadona en comprimido oral en perros se presenta como una buena alternativa solo si es co-administrada con Ketoconazol u otro inhibidor CYP.

Summary:

The objective of this work was to determine the bioavailability of Methadone as well as its pharmacokinetic parameters when it was administered orally, in solitary form, as well as when it was co-administered together with Ketoconazole, a reversible inhibitor drug of CYP3A, in this way reducing the metabolism of Methadone. The same was administered intravenously (0.5 mg/kg) in dogs of the English Cocker Spaniel breed, as well as Methadone tablet (0.5 mg/kg) associated or not with Ketoconazole (10 mg/kg, two doses), obtaining in this way three groups. The resulting serum concentrations were determined by CLAE/EM, by using validated methodology and the individual plasma profiles were evaluated by a non-compartmental approach, using Excel® 2003 software, for the determination of pharmacokinetic parameters, which were statistically compared by the Wilcoxon test. Rank-Sum and Kruskal-Wallis ($\alpha = 0.05$). After the administration of Methadone PO, only the group in which it has been co-administered with Ketoconazole presented serum concentrations and also presenting the phenomenon of double serum plasma peak. The results allowed us to indicate that the use of a Methadone tablet has a low absorption, and it reaches serum levels that cannot be quantified by the methodology used. However, when Methadone was being co-administered with Ketoconazole, serum concentrations were detected, which allowed us to conclude that the use of methadone in oral tablet in dogs is a good alternative only if it's being co-administered with Ketoconazole or another CYP inhibitor.

1 INTRODUCCIÓN:

La prevención y el control del dolor son de vital importancia, tanto en la anestesia como en los tratamientos; Por lo mismo es esencial tener un buen entendimiento de los procesos fisiológicos que conducen a la percepción del dolor y las respuestas de los pacientes a este proceso. En medicina humana muchas organizaciones se dedican a mejorar la comprensión y tratamiento del dolor, tanto crónico como agudo; al punto de llegar a considerarlo en hospitales como el quinto signo vital, junto con la temperatura, presión sanguínea, pulso y respiración. Si bien las similitudes entre la medicina humana y la veterinaria son grandes, varias encuestas realizadas dentro de la profesión veterinaria han mostrado que el manejo del dolor está mejorando, pero aún se encuentra lejos de ser ideal. Llegando en veterinaria por medio de la American Animal Hospital Association (AAHA), a elevar al dolor como el cuarto signo vital en animales, junto con el pulso, la respiración y la temperatura. Por esto, y teniendo en cuenta que es fácil pasar por alto el dolor en los animales, es de vital importancia aumentar los esfuerzos para detectar, evaluar, prevenir y aliviar el dolor, mejorando así los cuidados que pueden ser brindados a los mismos (Hellyer y col., 2007).

Los opioides son una de las principales clases de analgésicos utilizados, junto con los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) y anestésicos locales, a nivel veterinario. Considerados la piedra angular en el tratamiento del dolor, son un grupo versátil de fármacos con amplias aplicaciones en el tratamiento de muchos tipos de dolor, ya sea desde dolores agudos por traumas, pasando por su utilización a nivel de procedimientos quirúrgicos, o en pacientes con condiciones médicas o enfermedades dolorosas y en aquellos que sufren de dolor crónico (Lamont y col., 2007).

La Metadona es un opioide sintético que se diferencia del resto de los fármacos de esta familia por sus mecanismos de acción. Además de ser agonista en los receptores Mu (μ), posee acción antagonista de los receptores N-Metil-D-Aspartato (NMDA), así como en los neurotransmisores vinculados al dolor serotonina y norepinefrina. Este último efecto lo hace potencialmente útil en estados de dolor neuropático y de resistencia a opioides (Trescot y col., 2008). A pesar de su largo uso en la clínica, aún existe interés en identificar las fuentes de variabilidad en la respuesta a la Metadona. Estas podrían estar relacionadas con la farmacodinamia, como por ejemplo, la variabilidad genética en el gen del receptor μ y/o a la farmacocinética, por ejemplo, variabilidad del metabolismo de la familia de enzimas del citocromo P450 (CYP450), o la unión a proteínas y la actividad de la Glicoproteína P (P-gp) (Rodríguez y col., 2004).

2 REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA:

Según Muir (2015) el dolor animal es definido como una experiencia sensorial que frecuentemente es, pero no siempre, asociada con un daño nervioso o de tejidos. A su vez el dolor fisiológico es un reflejo protector del organismo, cuya función es evitar injuria o daño tisular; frente a una lesión del tejido el dolor patológico brindará condiciones para la curación (Klaumann y col., 2008).

Los receptores nociceptivos, son terminaciones libres o especializadas, de fibras nerviosas localizadas en piel, articulaciones, músculos y en las paredes de las vísceras que captan los estímulos dolorosos y los transforman en impulsos nerviosos (López Forniés y col., 2007).

Existen tres tipos de nociceptores:

- Mecano receptores: estimulados por presión.
- Termo receptores: estimulados por temperaturas extremas.
- Receptores polimodales: responden indistintamente a estímulos nociceptivos, mecánicos, térmicos y químicos (López Forniés y col., 2007).

La nocicepción es en sí el componente fisiológico del dolor y abarca los procedimientos de transducción, transmisión y modulación del estímulo nociceptivo. El proceso doloroso comienza con la activación y sensibilización periférica, mediante un estímulo, donde tiene lugar la transducción por la cual dicho estímulo nociceptivo se transforma en impulso eléctrico. A partir de este estímulo la fibra nerviosa estimulada inicia un impulso nervioso denominado potencial de acción (PA), que es conducido hasta la segunda neurona, localizada en el asta dorsal de la médula, mediante el proceso de transmisión. Es en el asta dorsal de la médula donde se va a dar el proceso de modulación, en el cual intervienen las proyecciones de las fibras periféricas, las fibras descendentes de centros superiores y las neuronas localizadas en la médula. La facilitación o inhibición de dichos impulsos depende de la acción de neurotransmisores como Glutamato, Substancia P, Serotonina, Norepinefrina, entre otros. Por último, tiene lugar el reconocimiento o integración por parte de los centros supra espinales del Sistema nervioso central (SNC) (López Forniés y col., 2007; Klaumann y col., 2008).

De los sistemas de modulación nociceptiva, los dos más importantes son mediados por receptores opioides y NMDA, los cuales muestran un amplio patrón de distribución por casi todo el SNC. De los tres principales subtipos de receptores opioides, los receptores μ y delta (δ) pueden tanto inhibir como potenciar eventos mediados por los receptores NMDA, mientras que el receptor Kappa (κ) antagoniza la actividad mediada por receptores NMDA (Riedel y Neeck, 2001).

Clasificación del dolor

Una vez instalada la injuria o daño tisular puede introducirse el concepto de dolor patológico; el cual podemos clasificar según, su duración, patogenia, localización, según la farmacología, entre otras cosas (López Forniés y col., 2007; Klaumann y col., 2008; Guedes, 2017):

-Según su duración:

- Agudo: Limitado en el tiempo, con escaso componente psicológico. Ejemplo el dolor músculo esquelético relacionado a fracturas patológicas.

- Crónico: Ilimitado en su duración, se acompaña de componente neuropático central y a veces, de un componente psicológico. Por ejemplo el dolor referido a casos oncológicos (López Forniés y col., 2007; Klaumann y col., 2008; Guedes, 2017).

-Según su patogenia u origen:

- Neuropático: Está producido por estímulo directo del SNC por lesión de vías nerviosas periféricas, o por una modulación neuropática central patológica.
- Nociceptivo: Este tipo de dolor es el más frecuente y se divide en somático y visceral según su localización. (López Forniés y col., 2007; Klaumann y col., 2008; Guedes, 2017).

-Según la localización:

- Somático: Se produce por la excitación anormal de nociceptores somáticos superficiales o profundos (piel, músculo esquelético, articulaciones, etc.).
- Visceral: Se produce por la excitación anormal de nociceptores viscerales (ubicados en las paredes de las mismas). Este dolor en general es continuo y profundo. Puede con frecuencia estar acompañado de síntomas neurovegetativos. Ejemplo de esto son los cólicos intestinales (López Forniés y col., 2007; Klaumann y col., 2008).

-Según la intensidad:

- Leve: El paciente puede realizar actividades habituales sin muchos problemas.
- Moderado: Interfiere con las actividades habituales. Precisa tratamiento para mejorar su vida diaria.
- Severo: Interfiere con las actividades diarias e incluso con el descanso. Necesita tratamiento con analgésicos potentes (López Forniés y col., 2007; Guedes, 2017).

-Según su eficacia farmacológica: en esta clasificación se los agrupa dependiendo de si la eficacia analgésica es buena, parcial o escasa (López Forniés y col., 2007).

Opioides:

El término opio hace referencia a una mezcla de alcaloides de la semilla de la amapola. Éstos han sido usados durante miles de años para el tratamiento del dolor. Registros de antiguos papiros egipcios reportan el uso del opio para el tratamiento antiálgico (Trescot y col., 2008). En 1973, una estudiante graduada, Candace Pert, investigó con Morfina radioactiva para evaluar la localización del sitio de acción de la misma, y encontró, sorpresivamente que la droga actuaba en áreas muy específicas del cerebro, apodadas “receptores de Morfina” (Pert y Snyder, 1973). Desde ese tiempo, una gran variedad de estos receptores y subtipos han sido identificados, y han estado bajo discusión. La mayoría de los opioides de relevancia clínica tienen su actividad primaria sobre el inicial “receptor de Morfina” o “receptor- μ ” y son por lo tanto considerados “agonistas μ ”. Los receptores de opioides se encuentran en el SNC así como en tejidos periféricos, y son normalmente estimulados por péptidos endógenos (endorfinas), producidas en respuesta a estimulaciones nocivas (Trescot y col., 2008).

Estos receptores se clasifican en:

- Receptores Mu (μ): Se encuentran principalmente en el tronco cerebral y tálamo medial. Son responsables de la analgesia supra espinal, depresión respiratoria, euforia, sedación, disminuir la motilidad gastrointestinal y dependencia física a ciertos fármacos.
- Receptores Kappa (κ): Se encuentran en el sistema límbico y otras áreas del diencefalo, corteza cerebral y médula espinal y son responsables de analgesia espinal, sedación, disnea, dependencia, disforia y depresión respiratoria.
- Receptores Delta (δ): localizados a lo largo del cerebro. Podrían ser responsables de efectos psicomiméticos y disfóricos.
- Receptores Sigma (σ): Son responsables de efectos psicomiméticos, disforia y depresión inducida por el estrés. Cabe resaltar que estos receptores no son considerados receptores de opioides, sino más bien sitio blanco de Fenciclidina y sus análogos (Trescot y col., 2008).

Distintos genes controlan cada uno de los tres principales receptores de opioides. Una vez que el receptor es activado, éste libera una porción de la proteína G, que difunde dentro de la membrana hasta que alcanza su objetivo (ya sea una enzima o un canal iónico). Estos objetivos alteran la fosforilación de proteínas vía inhibición del Adenosín monofosfato cíclico (AMPc), el cual actúa como un segundo mensajero dentro de la célula resultando en la activación de proteinquinas (efectos a corto plazo) y las proteínas de la transcripción de genes (efectos de largo plazo) (Trescot y col., 2008).

Los receptores de opioides localizados en las terminales pre sinápticas de las fibras C-nocioceptivas y fibras A-delta, al ser activadas por un agonista opioide, indirectamente inhiben estos canales de Ca^{+} voltaje dependientes, disminuyendo los niveles de AMPc y bloqueando la liberación de neurotransmisores del dolor como el glutamato, sustancia P y péptido relacionado con el gen de la calcitonina de las fibras nocioceptivas, resultando en analgesia (Trescot y col., 2008).

Metadona: Es un opioide sintético, que además de su acción agonista sobre los receptores μ es antagonista de los receptores de NMDA. En seres humanos la vía principal de administración es la oral (PO), aunque también puede ser inyectada endovenosa (IV), e intramuscularmente. Por vía oral actúa entre los 30 y los 35 minutos después de su ingestión. Es una droga básica y lipofílica con un pKa de 9.2, y con una buena (pero variable) biodisponibilidad oral (40-100% en humanos). Es una mezcla racémica de dos enantiómeros, una forma R más potente y una forma S que es el antagonista de los receptores de NMDA (Garrido y Trocóniz, 2000; Trescot y col. 2008). En su forma básica es un polvo blanco cristalino, pero se puede encontrar disponible en varias presentaciones y concentraciones: comprimidos, supositorios e inyectables (líquida). La estructura molecular de la Metadona no se asemeja en nada a la de los derivados opiáceos pero a pesar de esto posee propiedades analgésicas y narcóticas, similares a las de la Morfina (Díaz Moreno).

La Metadona es metabolizada en el hígado e intestino y sus metabolitos son excretados casi en su totalidad por heces, siendo ésta una ventaja en pacientes con insuficiencia o falla renal. Su biotransformación hepática esta además sujeta a la actividad del sistema microsomal del citocromo P-450 (CYP450), por lo que las variaciones interindividuales en la expresión de CYP3A4, (integrante del sistema CYP450), van a ser el principal factor responsable de la variabilidad interindividual en el *clearance* (Garrido y Trocóniz, 2000). Dentro del metabolismo variable de la Metadona, ésta es metabolizada principalmente por CYP3A4, en humanos, y

secundariamente por CYP2D6; CYP2D6 metaboliza preferentemente la R-metadona, mientras CYP3A4 y CYP1A2 metabolizan ambos enantiómeros. Debido a su alta solubilidad en lípidos, se redistribuye en los tejidos grasos, y tiene una larga fase de eliminación, con una vida media de 12 a 150 h y alta biodisponibilidad oral en humanos. Sin embargo, en perros es eliminada de forma rápida (1.75 - 4.3 h de vida media) y tiene baja biodisponibilidad oral (Kukanich y col., 2008). Cambios en el metabolismo y eliminación de la Metadona son principalmente causados por la inhibición o inducción del CYP450, con el consiguiente aumento o disminución de los niveles de droga en sangre y tejidos (Ferrari y col., 2004). Además de estar identificada como un sustrato in vitro de la bomba de eflujo glicoproteína-P (P-gp), una proteína transmembrana que se distribuye en el epitelio intestinal y en la barrera hematoencefálica (BHE), entre otros tejidos (Rodríguez y col., 2004). Sus efectos antagonistas a los receptores NMDA la hacen potencialmente útil en cuadros de dolor neuropático y de dolor resistente a los opioides. Además al ser un opioide sintético único, sin relación con los opioides estándar, permite ser usado en pacientes con alergias a la Morfina (Trescot y col., 2008).

CYP450: Las enzimas CYP450 son una superfamilia de enzimas microsomales metabolizadoras de drogas, hormonas y químicos ambientales; por lo que son importantes en la biosíntesis y degradación de componentes endógenos, químicos, toxinas y fármacos. Han sido identificadas cientos de miembros individuales de la súper familia CYP450, siendo la isoenzima CYP3A4 la más frecuentemente involucrada en el metabolismo de drogas, y estando identificada tanto en humanos como en perros (Trepanier, 2006). Según Natalini y col., (2006), la presencia de la isoenzima intestinal CYP3A4 asociada a la P-gp, disminuye la eficacia analgésica de los fármacos opioides, debido a un aumento en el metabolismo intestinal, con una extracción de primer pasaje que ronda el 20%, lo cual influye significativamente en la disponibilidad oral de los opioides.

El Ketoconazol es un fármaco antifúngico que actúa como inhibidor reversible de la CYP3A, el cual reduce el metabolismo de la Metadona en un 70-80% in vitro (Foster y col., 1999; Wang y DeVane., 2003). In vivo también se observa la inhibición de la CYP3A12, incrementando la biodisponibilidad de la Metadona por vía oral (Benmebarek y col., 2004; Kukanich y col., 2011).

Gen MDR1 y P-gp: La absorción de la Metadona, así como la de muchos otros fármacos, va a estar a su vez influenciada por la presencia de la P-gp, cuya expresión está ligada al gen de resistencia múltiple a drogas (MDR-1), y también conocida como ATP-binding cassette sub-family B member 1 (ABCB1). La misma es un miembro de la ATP-binding cassette superfamily (ABC family), una familia de proteínas de transporte, que influyen en el transporte de drogas (Natalini C.C. y col. 2006). Las mismas se expresan sobre la superficie de varios tejidos, como el intestino, células de los túbulos renales, células de los canalículos biliares, endotelio capilar del cerebro, médula espinal, entre otros; así como se ha demostrado su presencia en algunos tipos de tumores. La P-gp se ha identificado en ratones, ratas, bovinos, equinos, caninos, primates y ha estado recibiendo una relevancia clínica particular debido a que esta expresión proteica limita el acceso al cerebro y la absorción intestinal de muchas drogas, además de expulsar activamente de las células sustancias xenobióticas (ya sean fármacos o toxinas), limitando por lo tanto la absorción oral así como la entrada al sistema nervioso de muchos fármacos (Linardi y Natalini, 2006).

Por lo tanto al momento de medicar a un paciente y crear nuevas estrategias de terapias, se puede considerar inhibir de forma farmacológica a la P-gp, lo cual podría representar una ventaja en determinadas situaciones (Choo y col., 2000; Mealey, 2004).

Bouër y col. (1999) realizaron un modelo experimental para estudiar la absorción y metabolismo de la Metadona en intestino delgado de ratas adultas. Observaron que la Metadona era absorbida e ingresaba a las células intestinales, concluyendo que la misma atraviesa el intestino delgado por vía transcelular. Otros resultados de interés obtenidos fue el hecho de que al administrar la Metadona acompañada de un inhibidor de la P-gp se produce un aumento en la absorción del fármaco. Los inhibidores de la P-gp utilizados fueron Verapamilo y Quinidina.

Por otro lado en un estudio de Rodríguez y col. (2004), estudiaron in vivo el papel que desarrollaba la modulación de la P-gp en el efecto analgésico y captación en corteza cerebral de la Metadona, utilizando ratas como modelo experimental. Los investigadores realizaron dos experimentos, un ensayo analgésico y otro con el objetivo de medir la disposición de Metadona en el cerebro y su unión a proteínas plasmáticas. En el primero al utilizar Valspodar, el cual revierte la actividad fisiológica de la P-gp, obtuvieron como resultado que para los protocolos de administración PO, con y sin Valspodar, la administración de éste produjo una importante disminución en la ED₅₀ (dosis efectiva media) de la Metadona, además de observarse niveles de analgesia significativamente más altos en los animales a los que se les administró Valspodar. En el segundo experimento la Metadona utilizada estaba radiomarcada, utilizando un grupo control y uno con administración de Valspodar. Se observó que al administrar Metadona con Valspodar la presencia del opioide a nivel cerebral era significativamente más alta.

Por su parte Kharasch y col. (2003), estudiaron el rol que juega la P-gp intestinal en la absorción de la Morfina. Para el mismo se realizaron dos estudios con voluntarios normales sanos (6 hombres y 6 mujeres). En el primer protocolo, se evaluó el diámetro de la pupila después de la administración intravenosa de la Morfina, asociada o no a Quinidina oral. En una segunda fase, se evaluaron las concentraciones plasmáticas de metabolitos de la Morfina y glucurónido, además de la medición del diámetro pupilar, en este caso luego de la administración vía oral de Morfina, asociada o no a Quinidina. Concluyeron que la administración de Quinidina previo a la Morfina, aumentó significativamente las concentraciones plasmáticas de Morfina oral en la fase de absorción, lo que soporta la hipótesis de que la P-gp medie en el transporte y la biodisponibilidad del opioide a nivel intestinal. Por otro lado la administración de Quinidina no tuvo efectos mayores en la acción de la Morfina sobre la dilatación pupilar.

Perros de los linajes de la raza Collie pueden presentar una mutación en el gen MDR1, gen que se encarga de la codificación de la P-gp, y es una de las principales barreras frente a fármacos y otras sustancias a nivel de la BHE. Debido a una mutación en este gen, la P-gp no es producida, o es producida de manera defectuosa y se teoriza que no cumple su función o lo hace de forma parcial, causando una mayor sensibilidad a los fármacos que son sustrato de dicha proteína. Dicho alelo mutante *mdr1-1Δ* hallado en los Collie fue también descrito en otras razas como los Pastores Australianos, Viejo Pastor Ingles, así como otras con ancestros comunes con los Collie en su linaje (Neff y col., 2004).

A partir del estudio de Neff y col. (2004), se investigó la sensibilidad a determinados fármacos presente en cuatro tipos de perros, razas del linaje del Collie, razas de Pastores europeos poco vinculadas al Collie, perros Rastreadores que habían exhibido sensibilidad a fármacos y un grupo multirracial compuesto por muestras de más de 90 razas, analizando en total más de 4000 muestras de perros de pura raza. Como resultado obtuvieron que dos tipos de perros segregaron el alelo mutante, razas de perros sabuesos (el Whippet de pelo largo y el Silken windhound) y siete del linaje del Collie. Por otro lado la mutación no fue encontrada en ninguna raza de pastores originaria de la Europa continental. La frecuencia de aparición del alelo varió entre las razas, siendo más alta para el Collie y el Whippet de pelo largo. Al dividir en subpoblaciones geográficas las muestras de Collies estudiadas se vio existe una alta frecuencia del alelo mutante en perros británicos y estadounidenses. Además, concluyeron que la mutación en dicho gen sucedió antes de que se diera la divergencia racial en estos perros.

Kukanich y col., (2005), realizaron un trabajo con la finalidad de estudiar el efecto de la administración de Ketoconazol, un inhibidor de la P-gp y del CYP3A4, y de Omeprazol (inhibidor de la bomba de protones), en la biodisponibilidad de la Metadona en perros cuando esta es administrada por vía oral. Para este estudio fueron utilizados 6 perros de raza Beagle, en los cuales se realizó un estudio cruzado de cuatro vías. En el primero se les administró 1mg/kg de Metadona IV; en la segunda se administró Metadona PO en dosis de 2mg/kg en forma de tabletas; para la tercera se realizaron dos dosis de Ketoconazol a dosis de 10mg/kg PO (con el alimento) 12,5 y 0,5 h previo a la administración de Metadona PO en la misma dosis que para la etapa anterior; para la última etapa se administró Omeprazol a dosis de 1mg/kg PO y Metadona en cápsula PO en la misma dosis que los anteriores. Para ambos tipos de administración de Metadona se extrajo sangre a distintos tiempos, de la que luego se analizó el plasma mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detección ultravioleta, y límites de cuantificación inferior de 20 ng/mL. Observaron que la administración IV de Metadona produjo sedación en los perros. La Metadona PO no fue detectada en sangre en ningún paciente, a no ser en un perro del grupo Metadona asociado a la administración previa de Ketoconazol, suponiendo una posible interacción en P-gp o CYP450, aumentando así la biodisponibilidad oral de la Metadona.

Kukanich y col., (2008), utilizando perros de raza Whippet estudiaron los efectos farmacodinámicos y la farmacocinética de la Metadona. Para el mismo utilizaron 6 individuos, a los que se les administró Metadona a una dosis de 0,5 mg/kg IV, seguida por 10mL de solución salina. Se colectaron muestras sanguíneas, para cuantificación plasmática por cromatografía líquida de alta eficiencia en tándem con un espectrómetro de masas (CLAE-EM), técnica previamente validada por Musshoff y col. (2006), y con un límite de cuantificación de 2 ng/mL. Como resultado el perfil plasmático de la Metadona se caracterizó por ser bifásico, con una fase de distribución rápida, así como la de eliminación. La concentración plasmática de la Metadona disminuyó por debajo de los 40 ng/mL a las dos h, en todos los individuos. La vida media de eliminación fue corta (1.53 ± 0.18 h), y el clearance plasmático fue alto. Por lo cual se concluye que tuvo alto volumen de distribución, corta vida media y rápida eliminación. Los perros de la raza Whippet tuvieron mayor volumen de distribución que los Beagles utilizados en el estudio antes descrito (Kukanich y col., 2005). Por lo tanto el volumen de distribución y la eliminación plasmática de Metadona fue más alto de lo esperado, pero la vida media de eliminación fue similar al apreciado en otras razas de perros. Se observó sedación, jadeo y defecación en

todos los perros luego de la administración del fármaco, y unas de las perras orino poco después de la administración de esta.

Kukanich en otro grupo de investigación estudió la asociación de Metadona con otros inhibidores de las CYP450: Ketoconazol, Cloranfenicol, Fluoxetina y Trimetoprim. El estudio constó de dos fases, la primera en la cual a los perros sólo se les administró Metadona PO a una dosis de 2mg/kg. Se extrajo sangre antes (15, 30 y 45 min), de la administración de Metadona y posterior a esto (1, 2, 4, 6, 8 y 12 h). Para la fase dos, que se realizó con 21 días de intervalo, a todos los perros se les administró los inhibidores CYP450 seguidos por la administración de Metadona PO a la misma dosis que para la fase uno. Para los inhibidores las dosis fueron en el caso del Ketoconazol de 10mg/kg vía oral cada 24 horas en tres dosis, Cloranfenicol 50mg/kg vía oral cada 12 horas en cuatro dosis, Fluoxetina 1mg/kg vía oral cada 24 horas en tres dosis y Trimetoprim 5mg/kg vía oral cada 24 horas en tres dosis. Una hora luego de la administración de los inhibidores, el paciente recibió Metadona PO. También se extrajo sangre antes (15, 30 y 45 min) y luego de la administración de Metadona (1, 2, 4, 6, 8, 12, 20 y 32 h). Las concentraciones de Metadona en plasma mediante el uso de la CLAE-EM. Detectaron concentraciones plasmáticas de Metadona significativamente más altas para la fase dos en el período comprendido entre 30 minutos y 6 horas, así como sedación en todos los animales, siendo que dos de ellos presentaron vómitos, bradicardia e hipotermia (Kukanich y col 2011).

En un nuevo estudio Kukanich y Kukanich, (2015) se propusieron evaluar los efectos de distintos inhibidores del CYP450 (Ketoconazol, Cloranfenicol, Trimetoprim, Fluoxetina, Cimetidina y Medetomidina) asociados entre ellos o no a Metadona PO en seis Whippet. Concluyeron que la farmacocinética de la Metadona fue significativamente afectada por algunos de los grupos con inhibidores CYP450, observando además que en los grupos que se incluía Cloranfenicol aumentó significativamente la absorción de Metadona. El mayor aumento en la absorción fue en los perros que recibieron Ketoconazol, Cloranfenicol y Fluoxetina asociados a la Metadona PO.

3 HIPÓTESIS:

- La Metadona presenta limitada biodisponibilidad por vía oral en caninos.
- La coadministración de Ketoconazol previo a la administración de Metadona por vía oral, incrementa la biodisponibilidad de la Metadona.

4 OBJETIVOS:

4.1 Objetivo general:

Evaluar la biodisponibilidad de Metadona en comprimido por vía oral en perros, asociada o no a Ketoconazol.

4.2 Objetivos específicos:

- 1- Describir los perfiles sanguíneos de la administración IV y oral de Metadona en caninos.
- 2- Establecer la biodisponibilidad absoluta de la administración oral de Metadona en caninos.
- 3- Determinar el efecto de la coadministración de Ketoconazol y Metadona sobre la biodisponibilidad de la Metadona administrada por vía oral en caninos.

5 MATERIALES Y MÉTODOS:

5.1 Materias primas:

- Clorhidrato de Metadona: Metadon comprimidos (10mg) (Cristália®).
- Metadona: Metadon inyectable (10mg/ml) (Cristália®).
- Ketoconazol: Nizoral comprimido (200mg) (Janssen-Cilag®).

5.2 Aparatos y equipamientos:

- Programa Excel® 2003 (Microsoft®)
- Programa Scientist® versión 2.0 (MicroMath®)
- Programa MassLynx® (Waters® Corporation)
- Programa Stata/IC 11.0 (Stata®)
- Columna cromatográfica: XDB-C8 (Agilent® Eclipse)
- Pre-columna: Shimadzu® C8
- Fuente de poder: Power Pac 3000 (Bio-Rad®)
- Cuba de electroforesis: Mighty Small SE250/SE260 (Hoefer®)
- Centrifuga: Hermlez 206^a (Labnet®)
- Termociclador: MultiGenell (Labnet®)
- Centrifuga a vacío: RC 10.10 – RCT 90 (Jouan®)
- Centrifuga de tubos: MR-23 (Jouan®)
- Agitador de tubos: Finemixer SH2000 (Digger®)
- Espectrómetro de masas: Cuatro LC (Micromass®)
- HPLC: marca Shimadzu con los siguientes componentes:
 - Controlador SCL 10A
 - Bomba LC 10AD
 - Degasificador DGU 14^a
 - Autosampler SIL 10AD
 - Horno CTO 10^a

5.3 Solventes y otros:

- Agua Milli-Q (Destilador/deionizador Milli Q[®] - Millipore)
- Acetato de Etilo p.a. (Nuclear[®])
- Metanol grau CLAE (Omnisolv[®])
- Ácido tricloro acético (Merck[®])
- Cateter com sistema cerrado 20 G BD[®] Saf-T-Intima
- Primers
- dNTPs: Sigma[®] Chemical Company
- Trizma: Sigma[®] Chemical Company
- EDTA: Sigma[®] Chemical Company
- Bisacrilamida 29:1: Fluka[®]
- TEMED: Gibco[®] Invitrogen
- Indicadores de pH en cinta: Universalindikator pH 0-14 (Merck[®]).

5.4 Animales:

Fueron utilizados cuatro animales de raza Cocker Spaniel (dos machos y dos hembras), con edades de entre 6 y 8 años, un peso de entre 10 y 12 kg, clínicamente saludables avalados por medio de hemograma, perfil bioquímico hepático y renal. Dichos animales pertenecieron al área de experimentación de nutrición canina (UNEC) del departamento de nutrición animal de la Facultad de Veterinaria de la Universidad de la República (UdelaR). Los mismos se encontraban en un gran canil colectivo, alimentados con ración comercial y agua *ad-libitum*.

El presente protocolo tuvo aprobación de las comisiones de ética para el uso de animales de experimentación de ambas universidades: Universidad federal de Rio Grande do Sul (UFRGS) y UdelaR.

5.4.1 Selección de animales: Análisis genético

Extracción de ADN:

Se extrajo ADN de muestra de sangre de todos los individuos mediante la técnica de Chelex 100 (Walsh y col. 1991). Se realizaron cuatro lavados con agua destilada estéril (400 µL) en 50 µL de sangre, y luego se añadieron 200 µL de resina Chelex en suspensión al 5%. Posteriormente se colocó en termociclador por 30 minutos a 56°C y durante 15 minutos a 99°C. Este método nos permite la amplificación posterior de cierta región del gen.

Amplificación

Se ha amplificado una región del gen MDR1 que incluye el lugar donde se hace presente la mutación *mdr-1Δ*, utilizando primers descritos por Neff y col. (2004).

Para realizar la amplificación por PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa), se utilizaron los siguientes programas:

Desnaturalización: 95°C, 4 minutos, en presencia de:

- Buffer pH 8: 2,5 µL
- MgCl₂ 0,75 µL
- dNTPs 2 µL
- Primers 2 µL sense, 2 µL antisense
- Agua destilada 14,6 µL
- Taq polimerasa 0,15 µL 35 ciclos: 94°C, 4 minutos
94°C, 30 segundos
56°C, 30 segundos
72°C, 45 segundos

Electroforesis en poliacrilamida:

Para la electroforesis, se utilizó 10 mL de bisacrilamida 29: 1, con 100 μ L de persulfato de amonio y 10 μ L de TEMED. La corrida se realizó a 120 voltios por 30 minutos con TBE 1x como buffer.

Coloración:

Se colocó la poliacrilamida durante 10 minutos en fijador compuesto por agua destilada, etanol y ácido acético. Después de enjuagarse con agua destilada, se sumergió por 20 minutos en nitrato de plata, y se lavó nuevamente con agua destilada. El revelador fue la solución usada en la secuencia para luego parar la reacción con el fijador y, finalmente, lavar con agua destilada.

5.5 Muestras de Sangre:

Se colectaron 5mL de sangre de cada perro una semana antes de realizar el experimento, con la finalidad de realizar un hemograma completo y perfil bioquímico además de la tipificación genética.

Previo a la administración de la Metadona a los animales se les realizó ayuno de 12 horas, de sólidos y líquidos, siendo que 2 horas luego de dicha administración se les ofrecería ración y agua. Todo el experimento se realizó a la misma hora del día (8:00 am). Las muestras para realizar el perfil farmacocinético se recogieron mediante el uso de un catéter 20G (BD Saf T-Intima), fijado de forma percutánea previamente y utilizando una entrada para la administración de Metadona y la otra para la extracción de sangre. Entre cada sesión del experimento hubo un tiempo mínimo de espera de 72 horas.

Para la toma de muestras en los momentos determinados, primeramente se extrajeron 3 mL de sangre, para luego colectar 4 mL. Los 4 mL se transfirieron a tubos con gel, y los 3 mL iniciales se volvieron a inyectar IV, seguido de la inyección de solución fisiológica heparinizada al 0,1%. Inmediatamente luego de extraídas las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1600g, y el suero obtenido acondicionado en tubos eppendorf y posteriormente congelado a -20°C hasta el día del procesamiento.

6 ESTRATEGIA DE LA INVESTIGACIÓN FARMACOCINÉTICA:

Los cuatro perros participaron de 3 sesiones experimentales (cada uno correspondiente a un grupo experimental). Después de la tricotomía de la región correspondiente a la vena cefálica se insertó por vía percutánea un sistema cerrado de catéter protegido con vendaje. Posteriormente se administró Metadona a la dosis de 0,5 mg/kg en las siguientes maneras:

- Administración IV en vena cefálica (MIV).
- Administración oral bajo forma de comprimido PO (MO).
- Administración oral bajo forma de comprimido PO con dos administraciones previas de Ketoconazol (10 mg/kg) PO: 12,5 y 0,5 horas antes de la Metadona (MKO).

Cuando se suministró la formulación en comprimido, se realizó una administración posterior de 20 ml de agua PO.

En todos los animales se recogió sangre desde el tiempo 0 (antes de la administración del opioide). Las colectas en el grupo MIV fueron a los 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 150, 240 y 360 minutos y en los otros grupos fueron excluidos los puntos de colecta a los 5 y 10 minutos.

El suero fue transportado congelado hasta el laboratorio de la Facultad de Farmacia de la UFRGS Porto Alegre, donde se procesaron. El descarte de líquidos biológicos fue hecho según los protocolos de bioseguridad de dicha institución.

6.1 Evaluación farmacocinética:

Para la evaluación del perfil farmacocinético de la Metadona en suero, mediante análisis no compartimental, fueron utilizados los programas Excel® 2003 (Microsoft®) y Scientist® versión 2.0 (MicroMath®). La determinación de Metadona en las muestras de suero se realizó por CLAE/EM, como se describe a continuación.

6.2 Metodología analítica:

6.2.1 Adaptación de la metodología analítica:

A partir de la metodología analítica para CLAE descrita por Musshoff y col. (2006) y validada por Kukanich y col. (2008), se determinaron condiciones cromatográficas para la detección de Metadona en suero. El equipo utilizado fue el LC Shimadzu® en tándem con espectrómetro de masas Micromass®. Las condiciones elegidas incluyeron el uso de una columna cromatográfica C8 de 3 por 150 mm, 5µm (XDB-C8 Agilent® Eclipse) y pre columna Shimadzu C8. La fase móvil fue compuesta por metanol y agua (90:10, v/v), gradiente de flujo de 0,5 mL/min, temperatura de horno de 30°C. Los flujos de gas de nebulización y desolvatación fueron de 75 y 750 L/h respectivamente. El espectrómetro de masas fue utilizado en electrospray positivo con los parámetros presentes en la tabla 1.

Tabla 1. Parámetros utilizados en el espectrómetro de masas para detección de Metadona en suero de perros usando Fentanilo como estándar interno (EI).

Compuesto	Ión molecular (m/z)	Fragmento hijo (m/z)	Voltaje del cono (V)	Energía de colisión (eV)
Metadona	310,1	265	25	35
Fentanilo (EI)	337,1	188	25	35

m/z-masa dividida por el número de carga, V-voltios, eV-electrón voltio

Para la cuantificación de los niveles de Metadona, se monitoreó la transición m/z 310,1 a 104,7 y para la cuantificación de los niveles de Fentanilo m/z 337,1 a 188.

6.2.2 Preparación de las muestras:

A las muestras de 500 µL de suero les fueron agregados 10 µL de solución de estándar interno (EI: Fentanilo); éstas tuvieron las proteínas precipitadas con la adición de 5 mL de acetato de etilo y posterior mezcla en el agitador de tubos por 5 min. Luego, se las centrifugó a 12.000 rpm durante 10 min a 4°C y fueron congeladas a -80°C durante 5 min. El sobrenadante fue transferido a tubos de centrifuga, se evaporó el contenido en centrifuga de vacío (2 horas), para,

finalmente, redisolver en 200 μL de metanol. Las muestras fueron inyectadas en el CLAE/EM en un volumen de 50 μL .

6.2.3 Preparación de las soluciones de la curva estándar:

Para la curva estándar, se solubilizó Metadona base en suero de perro, resultando en una solución madre de 200 $\mu\text{g/mL}$, posteriormente se la sometió a sucesivas diluciones en suero hasta alcanzar el rango de 3 a 200 $\mu\text{g/mL}$. El EI fue hecho con sal de Fentanilo diluido en metanol y agua, obteniendo una solución madre de 600 $\mu\text{g/mL}$ para una concentración final en suero de 200 ng/mL . Las alícuotas de 10 μL de las soluciones finales de Metadona y del EI se añadieron a 490 μL de suero y agitadas en el vórtex durante 10 segundos. Posteriormente, cada punto de la curva estándar fue sometido a la extracción líquido-líquido como esta descrito en el ítem de análisis estadístico para posterior análisis en el CLAE/EM.

6.2.4 Validación parcial de la metodología analítica

La metodología analítica desarrollada fue validada parcialmente de acuerdo a lo recomendado por la Food and Drug Administration (FDA, 2001), evaluando selectividad, exactitud, precisión intradía y límite inferior de cuantificación.

El rango de concentraciones de los analitos en la curva de calibración se determinó a partir de estudios piloto en perros para representar las concentraciones esperadas en las muestras.

La metodología fue validada en suero, contemplando el rango de concentración de 3 a 200 $\mu\text{g/mL}$ (3, 12, 25, 50, 150, 200 $\mu\text{g/mL}$) con controles de calidad de 180, 90 y 9 $\mu\text{g/mL}$. La validación parcial comprendió tres curvas inyectadas consecutivamente, evaluándose linealidad y límite inferior de cuantificación. El análisis de varianza se empleó para el análisis estadístico de la linealidad y la desviación de la linealidad. Los controles de calidad se evaluaron en los parámetros de precisión intradía y exactitud.

6.2.5 Evaluación no compartimental del perfil sérico de la Metadona

Los perfiles séricos de Metadona fueron evaluados por un abordaje no compartimental. Se determinaron los parámetros de factor biodisponibilidad absoluta, depuración, vida media, volumen de distribución y tiempo de residencia medio, utilizando las ecuaciones enumeradas a continuación (Gibaldi y Perrier, 1982).

La determinación de la constante de velocidad de eliminación (λ) fue calculada por la pendiente de la fase terminal de la curva log-lineal de los perfiles de concentración por tiempo de cada animal, empleando los últimos tres puntos de los perfiles. A partir del valor de λ determinado, el tiempo de vida media ($t_{1/2}$) de la Metadona fue determinado por la ecuación 1:

$$t_{1/2} = \frac{0,693}{\lambda} \quad (1)$$

El área bajo la curva se calculó por el método trapezoidal de los tiempos 0 a t (AUC_{0-t}), donde t es el último tiempo de recolección. Esta área se incrementó en el área bajo la curva extrapolada (AUC_{ext}), y se denominó $AUC_{0-\infty}$, según las ecuaciones 2 y 3:

$$AUC_{0-t} = \frac{(C_0 + C_1)}{2} \times (t_1 - t_0) + \frac{C_1 + C_2}{2} \times (t_2 - t_1) + \dots + \frac{(C_{t-1} + C_t)}{2} \times (t_t - t_{t-1}) \quad (2)$$

$$AUC_{ext} = \frac{C_t}{\lambda} \quad (3)$$

La depuración fue estimada por la ecuación 4, donde D es la dosis administrada, y F es el factor de biodisponibilidad absoluta en relación con la Metadona IV:

$$Cl = \frac{F \times D}{AUC_{0-\infty}} \quad (4)$$

El área bajo la curva del primer momento ($AUMC_{0-\infty}$) se determinó mediante el método trapezoidal (ecuaciones 5 y 6):

$$AUMC_{0-t} = \left(\frac{(C_0 \times t_0) + (C_1 \times t_1)}{2} \right) \times (t_1 - t_0) + \dots + \left(\frac{(C_{t-1} \times t_{t-1}) + (C_t \times t)}{2} \right) \quad (5)$$

$$AUMC_{ext} = \left(\frac{C_t \times t}{\lambda} \right) + \left(\frac{C_t}{\lambda^2} \right) \quad (6)$$

El tiempo de residencia medio (MRT) se calculó a partir de los valores de $AUC_{0-\infty}$ y $AUMC_{0-\infty}$ (ecuación 7):

$$MRT_{i.v.} = \frac{AUMC_{0-\infty}}{AUC_{0-\infty}} \quad (7)$$

El factor de biodisponibilidad absoluta (F) se determinó por la relación entre $AUC_{0-\infty}$ después de una dosis no sistémica (oral) y $AUC_{0-\infty}$ IV.

6.3 Análisis estadístico

Todos los datos se presentan en la forma de valores medios (media) y sus respectivas desviaciones estándar.

7 RESULTADOS:

7.1 Análisis Genético:

Se realizó PCR en todos los perros con el objetivo de ver si portaban la mutación del gen MDR1. El análisis en dicha región donde se encuentra la mutación MDR1-1 Δ indicó que ninguno de los perros Cocker Spaniel estudiados presentaba mutación para el gen MDR1. En la Figura 1, se observa el gel de poliacrilamida con las muestras de los cuatro perros, un control negativo y los marcadores moleculares.

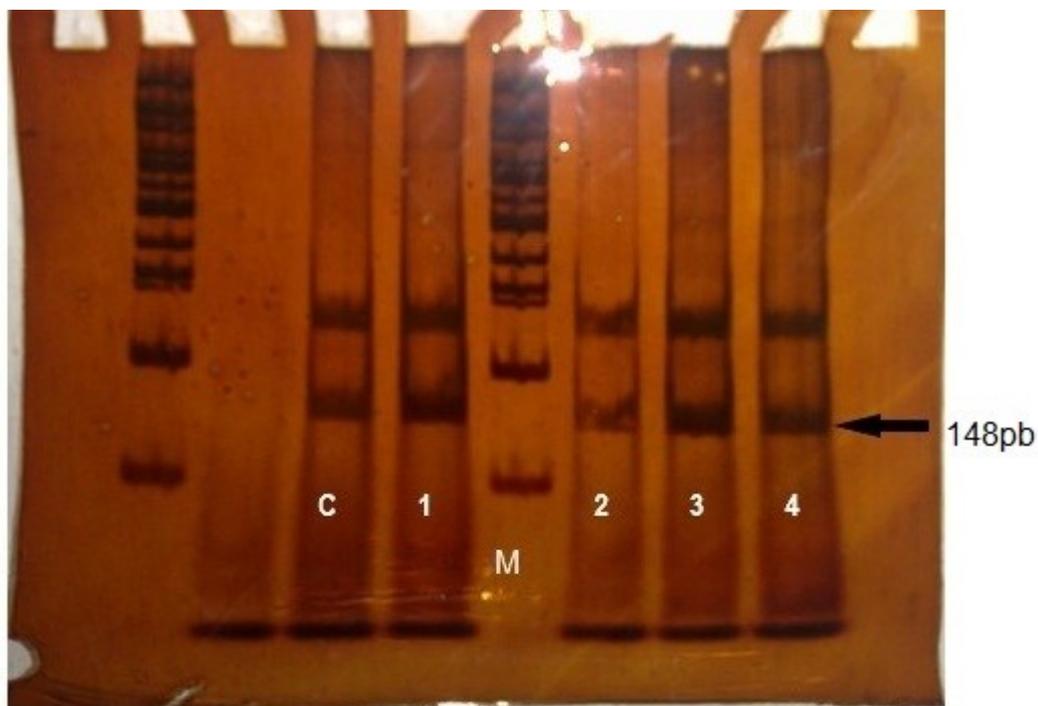


Figura 1. Gel de Poliacrilamida con la corrida de los cuatro perros (1, 2, 3 y 4), un control (C) y los marcadores moleculares (M). La flecha indica el lugar donde se encuentra el gen MDR1 (148 pb). Un perro negativo para la mutación previamente tipificada fue usado como control (C).

7.2 Validación:

Validación parcial de la metodología analítica por CLAE/EM para cuantificación de la Metadona en suero:

La validación parcial tiene como objetivo garantizar que el método previamente publicado sea reproducido con exactitud, precisión y especificidad, asegurando la credibilidad para su uso rutinario (FDA, 2001). En el presente trabajo, se realizó la validación parcial con tres curvas en un día, evaluando la selectividad, linealidad, exactitud y precisión intradía.

Los cromatogramas obtenidos por CLAE de la Metadona y del Fentanilo en suero de perros se pueden observar en la Figura 2. El tiempo de retención de los fármacos fue de 1,86 y 1,99 min., respectivamente.

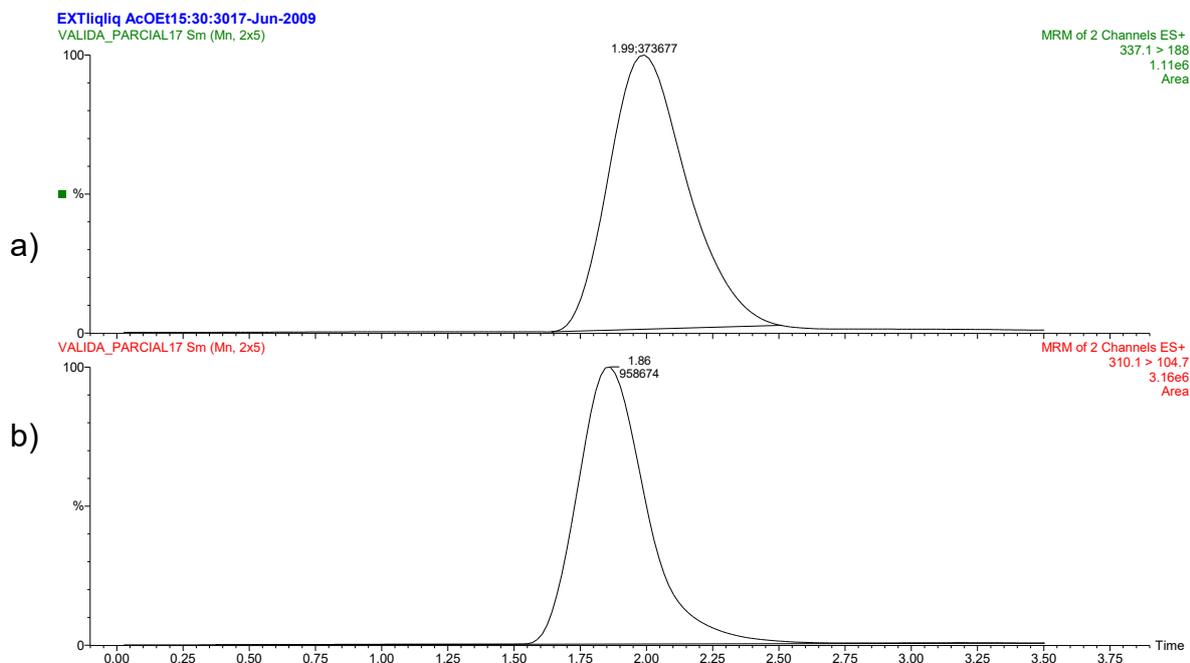


Figura 2. Cromatogramas obtenidos por CLAE/EM para Metadona y Fentanilo en suero de perros: a) muestra de la curva estándar con 100 ng/mL de Fentanilo; b) muestra de la curva estándar con 100 ng/mL de Metadona.

7.2.1 Selectividad

La selectividad de un método analítico es la capacidad de diferenciar y cuantificar un analito en presencia de otros en una muestra (FDA, 2001). La selectividad del método puede ser observada en la Figura 2, comparando los cromatogramas en que no se observaron picos interferentes en las muestras analizadas. El mismo cromatograma fue observado en muestras obtenidas de los animales después de la administración de Metadona por las diferentes vías estudiadas.

7.2.2 Precisión

La precisión del método analítico representa la concordancia de una serie de medidas resultantes de la aplicación repetida del método a muestras homogéneas.

La precisión del método fue evaluada por coeficientes de variación intradía (repetibilidad), determinados en triplicada por el análisis de tres concentraciones (controles de calidad). Los resultados de la precisión se pueden ver en la Tabla 2.

Tabla 2. Desviaciones estándar relativas intradía de las tres muestras control de calidad, utilizadas para la curva estándar de Metadona en suero de perros.

Identificación	Concentración Nominal	Concentraciones medias/Variación intradía		
		Media	D.E.	D.E.R.
LLOQ	3 ng/mL	3,1	0,3	8,6
CC	180 ng/mL	190,6	11,8	6,2
	90 ng/mL	98,8	5,1	5,3
	9 ng/mL	8,9	1,1	12,9

D.E.: Desvío Estándar; D.E.R.: Desvío Estándar Relativo; LLOQ: Límite inferior de cuantificación. CC: Control de calidad.

Los coeficientes de variación intradía deben presentar valores inferiores al 15% para cada concentración, excepto para el menor límite de cuantificación, que debe ser inferior al 20% (FDA, 2001). Los valores encontrados están de acuerdo con el valor anteriormente citado, demostrando que el método tiene repetibilidad.

7.2.3 Exactitud

La exactitud representa el grado de concordancia entre los resultados individuales encontrados y un valor aceptado como referencia (FDA, 2001). Por los resultados presentados en la Tabla 3, se concluye que el método es exacto, indicando que las concentraciones determinadas están próximas a los valores teóricos esperados.

Tabla 3. Exactitud para las muestras de control de calidad utilizadas para la curva estándar de Metadona en suero de perros.

Identificación	Concentración Nominal	Exactitud (%)	Rango Concentración (ng/mL)
LLOQ	3 ng/mL	93,0-108,3	2,8-3,3
CC	180 ng/mL	100,7-113,3	181,3-203,4
	90 ng/mL	101,4-112,7	91,3-101,4
	9 ng/mL	87,0-112,2	7,8-10,0

LLOQ: Límite inferior de cuantificación; CC: Control de calidad

7.2.4 Linealidad

El parámetro de linealidad se evalúa mediante la verificación de relación lineal entre la concentración del analito en la muestra y la respuesta producida en el detector (FDA, 2001).

La linealidad fue evaluada por medio de cinco puntos, con el rango de concentración de 3 a 200 ng/mL en suero de perro, obteniendo tres curvas estándar (Figura 3). El coeficiente de correlación calculado para las curvas estándar de Metadona presentó un valor superior a 0,98, compatible con el valor mínimo de 0,98 estipulado por la FDA (FDA, 2001).

Compound 2 name: metadona Method File: metadona
 Coefficient of Determination: 0.989607
 Calibration curve: $0.0241828 * x + 0.0299046$
 Response type: Internal Std (Ref 2), Area * (IS Conc. / IS Area)
 Curve type: Linear, Origin: Exclude, Weighting: 1/x, Axis trans: None

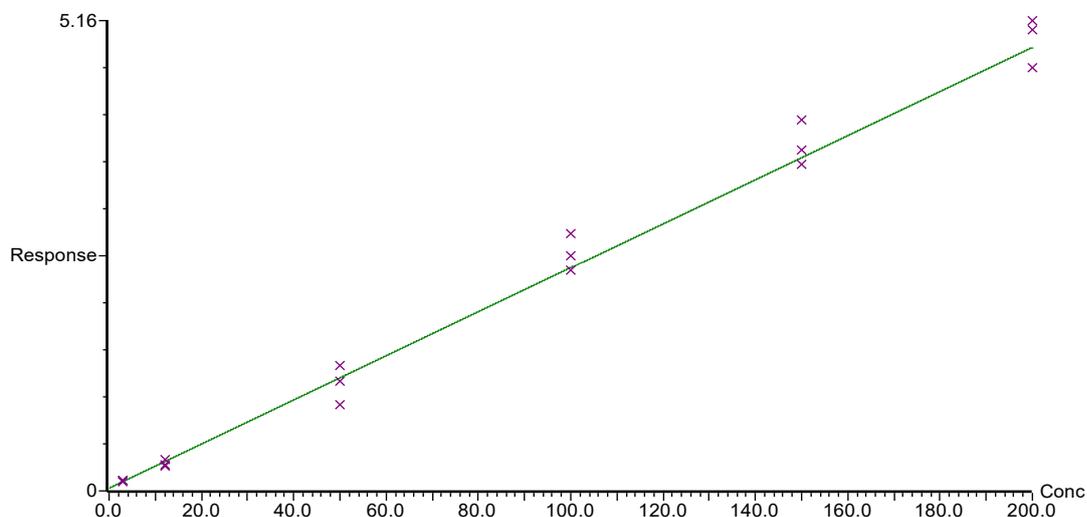


Figura 3. Curva de calibración media para Metadona en suero de perros determinada por CLAE/EM.

7.2.5 Límite de cuantificación

El límite inferior de cuantificación de la curva estándar es la menor concentración de analito en la muestra que puede determinarse con precisión del 20% y exactitud de 80 a 120% (FDA, 2001). El método analítico presentó un límite inferior de cuantificación de 3 ng/mL.

7.3 Evaluación Farmacocinética de Metadona

Se la evaluó en cuanto a su farmacocinética después de la administración oral e intravenosa en una dosis única de 0,5 mg/kg. La elección de la dosis se hizo teniendo en cuenta los perfiles séricos obtenidos en un estudio piloto.

Después de la recolección del grupo intravenoso y el análisis por CLAE/EM, se obtuvieron los perfiles de concentración sérica en relación a los tiempos individuales, y se calcularon parámetros farmacocinéticos.

Los grupos que recibieron Metadona en comprimido (siendo uno de ellos asociado al Ketoconazol), así como el grupo IV fueron analizados por el método no compartimental.

7.3.1 Evaluación Farmacocinética de Metadona después de la administración IV

El análisis farmacocinético no compartimental se basa en la aplicación de criterios estadísticos para el análisis de las curvas séricas, de modo que se obtengan parámetros representativos de las mismas, sin considerar el concepto de distribución por compartimentos.

El perfil sérico de Metadona obtenido tras la administración intravenosa en la dosis de 0,5 mg/kg se muestra en la Figura 4. Los valores de concentración sérica y los parámetros farmacocinéticos de cada individuo determinados se encuentran en el Anexo 1.

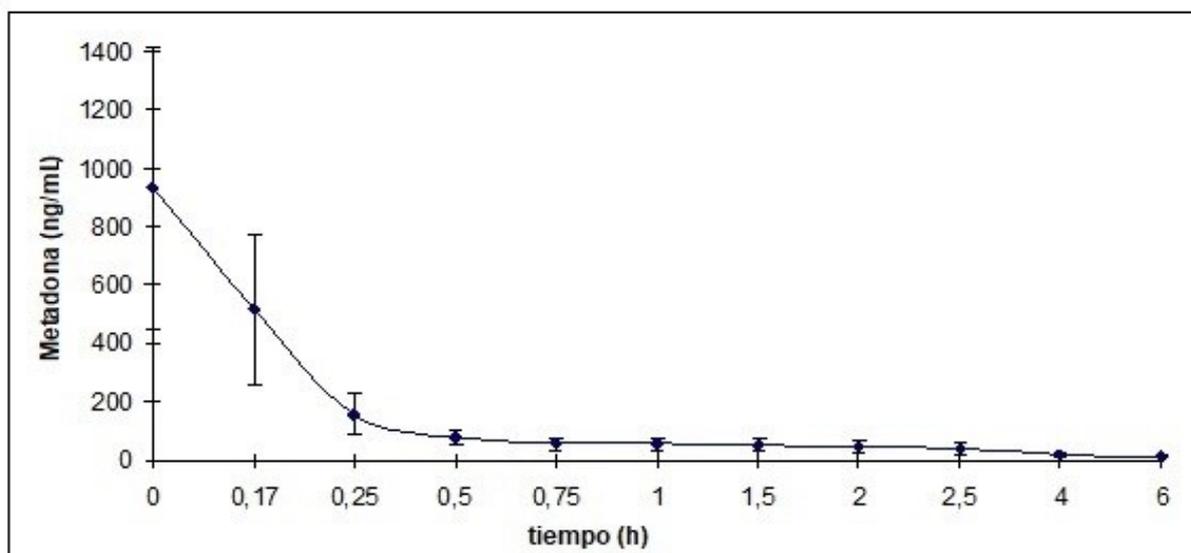


Figura 4. Perfil de la concentración sérica media de Metadona tras la administración intravenosa de 0,5 mg/kg a perros Cocker Spaniel (n=4, media \pm error estándar).

En la Tabla 4 se presentan los parámetros farmacocinéticos medios obtenidos por abordaje no compartimental. La constante de eliminación presentó valor de $0,27 \pm 0,12 \text{ h}^{-1}$, la AUC $0-\infty$ fue $421 \pm 314 \text{ ng}\cdot\text{h/mL}$ y el tiempo de vida media de 3,0 h. La depuración fue de $2,08 \pm 1,72 \text{ L/h/kg}$ y el Vd $7,09 \pm 5,84 \text{ L/kg}$. Estos resultados están de acuerdo con los que se pueden encontrar en la literatura (Kukanich y col., 2005, Kukanich y col., 2008). Los valores de volumen de distribución entre $3,46 \pm 1,09$ y $9,2 \pm 3,3 \text{ L/kg}$ se comunicaron a Metadona IV, así como valores de vida media entre

1,53 ± 0,18 y 3,9 ± 1,0 h y AUC 0-∞ 150,76 ± 21,92 y 741 ± 249,83 ng.h/mL (Kukanich y col., 2005, Kukanich y col., 2008).

Tabla 4. Parámetros farmacocinéticos medios obtenidos por un enfoque no compartimental a partir de los datos serológicos resultantes de la administración de Metadona IV 0,5 mg/kg y de la administración de 0,5 mg/kg de Metadona PO co-administrada asociada a 10 mg/kg de Ketoconazol PO, previamente administrado (12,5 y 0,5 h antes) (n = 4).

Parámetros Farmacocinéticos	IV		PO	
	Media	D.E.	Media	D.E.
λ (h ⁻¹)	0,3	0,1	1,1	0,2
t _{1/2} (h)	3,0	1,5	0,6	0,2
AUC _{0-t} (ng·h/mL)	360	286	71	4
AUC _{extr} (ng·h/mL)	62	44	2	0,9
AUC _{0-∞} (ng.h/mL)	421	314	73	4
% extrapolado de AUC	16,2	7,2	3,3	1,2
CL (L/h/kg)	2,1	1,7	1,2	0,1
AUMC _{0-∞} (ng·h ² /mL)	1185	891	139	49
MRT (h)	3,2	1,4	1,9	0,7
Vd (L/kg)	7,1	5,8	2,2	0,9
Biodisponibilidad (%)			18	

D.E.: desvío estándar, λ : constante de velocidad de eliminación, t_{1/2}: tiempo de vida media, AUC_{0-t}: área bajo la curva del tiempo 0 hasta el tiempo t, AUC_{extr}: área bajo la curva extrapolada, AUC_{0-∞}: área bajo la curva del tiempo 0 a tiempo infinito, AUC: área bajo la curva, CL: *clearance*, AUMC_{0-∞}: área bajo la curva del primer momento, MRT: tiempo de residencia media, Vd: volumen de distribución, y Biodisponibilidad.

7.3.2 Análisis farmacocinético de Metadona en comprimido por vía oral

Metadona vía oral fue evaluada en cuanto a su farmacocinética después de la administración PO en una dosis única de 0,5 mg/kg; en uno de los dos grupos, se administró posteriormente con dos dosis de Ketoconazol 10 mg/kg con 12,5 y 0,5 horas de antelación.

En el Anexo 2, se adjunta una tabla con las concentraciones séricas detectadas en cada perro.

El perfil sérico de Metadona obtenido después de la administración del comprimido asociado a Ketoconazol se muestra en la Figura 5. Los perfiles individuales permitieron la determinación de los parámetros farmacocinéticos medios por enfoque no compartimental presentados en la Tabla 4.

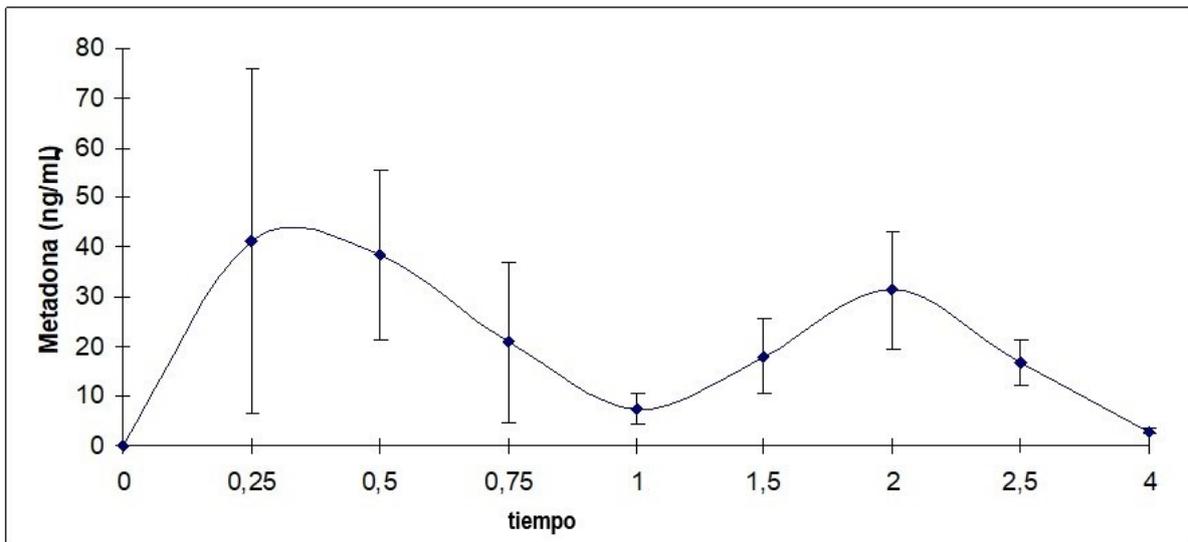


Figura 5. Perfil de la concentración sérica media de Metadona tras la administración de la dosis de 0,5 mg/kg asociada a Ketoconazol (10 mg/kg PO 12,5 y 0,5 h antes, 2 dosis) en perros Cocker Spaniel (n=4, media \pm desvío estándar).

La administración de Metadona en comprimido aislado PO en la dosis de 0,5 mg/kg no permitió la cuantificación en ningún momento, lo que está de acuerdo con los resultados de Kukanich y col. (2005).

En el grupo que recibió la Metadona en comprimido asociada a comprimido de Ketoconazol oral, se detectaron concentraciones desde los 15 minutos hasta las 4 horas en todos los animales, después de ese período, los niveles no fueron más detectables.

En este último grupo, la constante de eliminación presentó un valor de $1,13 \pm 0,24 \text{ h}^{-1}$ y el tiempo de vida media $0,64 \pm 0,15 \text{ h}$. La depuración fue de $1.16 \pm 0,06 \text{ L/kg/h}$ y el volumen de distribución $2,22 \pm 0,08 \text{ L/kg}$. Todos los parámetros de la Metadona oral con Ketoconazol fueron significativamente superiores al grupo de Metadona aislado.

8 DISCUSIÓN:

El presente estudio se desarrolló sin efectos indeseables mayores en todos los animales, como sedación profunda, bradicardia o vómitos. Además, se consiguió una validación parcial para una técnica de cuantificación Metadona en suero canino partiendo de una extracción líquido/líquido. Se verificó la hipótesis, logrando detectar en sangre Metadona cuando es co-administrada vía oral con Ketoconazol.

Como ya hemos mencionado antes la P-gp ha demostrado, tanto *in vivo* como *in vitro* afectar la absorción de varios fármacos, actuando como una bomba de eflujo que elimina en forma activa una gran cantidad de compuestos, desde el interior de la célula hacia el espacio extracelular. Dicha proteína, limita a nivel intestinal la absorción y difusión transepitelial provocando modificaciones en la biodisponibilidad de fármacos administrados por vía oral. Cabe destacar que, debido a que la P-gp presenta una amplia especificidad de fármacos, es posible que ocurran interacciones entre algunas de estas drogas reconocidas como sustratos (inhibidores o inductores) cuando éstas son administradas juntas (Lin y Yamazaki 2003).

La Metadona administrada en humanos con inhibidores de la P-gp produce concentraciones séricas significativamente mayores cuando se compara con la metadona oral aislada (Kharasch y col., 2004).

La acción del sistema de CYP450 es otro factor que influye en la biodisponibilidad de la Metadona, ya que se ha demostrado en varios estudios la participación de CYP3A4 en su metabolismo; midiendo *in vitro* la formación de su metabolito principal (2-etilideno 1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina o EDDP), usando ya sea extractos de hígado (humano) o microsomas con CYP450s (Iribarne y col., 1996; Moody y col., 1997; Foster y col., 1999). Estudios indirectos muestran aumento o disminución de las concentraciones plasmáticas de Metadona, en pacientes que se encontraban en tratamiento de mantenimiento con la misma, después de la introducción de drogas que son inhibidores o inductores de CYP3A4, respectivamente. La administración del inductor CYP3A4, Rifampicina, para el tratamiento de la tuberculosis en pacientes con tratamiento de mantenimiento con Metadona mostró como resultado una alta incidencia de síntomas de abstinencia de opiáceos (Borg y Kreek, 1995).

Hay que tener en cuenta por lo tanto que la Metadona es transportada por la P-gp y biotransformada por el sistema CYP intestinal, atribuyéndose a estos factores la gran variabilidad en la biodisponibilidad de ese fármaco cuando se administra por vía oral (Boouër y col., 1999; Foster y col. 1999; Wang y DeVane, 2003).

En el presente trabajo no se observaron concentraciones cuantificables de Metadona PO en ningún momento, mientras que al administrarla con Ketoconazol previo, sí se pudo cuantificar ($F=18\%$), desde los 15 minutos y hasta por un período de 4 h, lo cual coincide con datos reportados por Kukanich y col., (2008) donde el opioide fue eliminado de forma rápida (1.75 - 4.3 h de vida media) y presentó baja biodisponibilidad oral.

En Beagles que recibieron Metadona oral (2 mg/kg) asociada a dos administraciones previas de Ketoconazol (10 mg/kg 12,5 y 0,5 h antes de la Metadona), la misma fue detectada solo en 1 de entre los 6 perros; pero no queda claro si la biodisponibilidad en los otros perros fue afectada ya que el límite de detección por CLAE fue de 20 ng/mL (Kukanich, 2005). En nuestro trabajo el límite de cuantificación establecido fue de 3ng/mL lo que nos puede haber permitido detectar concentraciones con mayor precisión, además de que en su trabajo ellos administraron el Ketoconazol junto con el alimento, mientras que en nuestro trabajo se realizó ayuno, lo cual puede haber influenciado también.

El perfil farmacocinético obtenido en los grupos en que fueron detectados niveles de Metadona mostró un visible efecto de doble pico en todos los animales, separado por un intervalo. Este perfil de doble pico ya ha sido descrito en varios fármacos, Langguth y col., (1994), estudiaron, en perros, la influencia del vaciamiento gástrico y del complejo motor migratorio digestivo en la absorción de Cimetidina administrada en comprimido (PO), concluyendo que el vaciamiento gástrico influye en la aparición de un doble pico. Teniendo en cuenta que la metadona es un fármaco que afecta la motilidad gastrointestinal, puede ser una explicación para el doble pico observado.

Además al haber realizado un grupo IV se puede determinar la biodisponibilidad de Metadona, y los efectos que produce en la misma la co-administración de inhibidores CYP en la biodisponibilidad oral. Esto no lo pudieron hacer en su experimento Kukanich y col. (2011), al realizar solo administración PO con y sin inhibidores.

9 CONCLUSIONES:

A partir de los resultados obtenidos en este experimento, podemos concluir que:

- La metodología analítica utilizada por CLAE-EM para la determinación de Metadona en suero de perro es adecuada para la cuantificación del analito.
- La administración PO de Metadona en comprimido no presenta niveles séricos cuantificables en perros con la presente metodología analítica, cuando se la administra en esquema monodroga.
- La Metadona co-administrada con Ketoconazol tiene una biodisponibilidad absoluta del 18%.

BIBLIOGRAFÍA

- 1) Benmebarek M., Devaud C. (2004). Effects of grapefruit juice on the pharmacokinetics of the enantiomers of methadone. *Clin Pharmacol Ther*; 76: 55–63.
- 2) Boouër R., Barthe L.; Philibert C., Tournaire C., Woodley J., Houin G. (1999). The roles of P-glycoprotein and intracellular metabolism in the intestinal absorption of methadone: in vitro studies using the rat everted intestinal sac. *Fundam Clin Pharmacol*; 13: 494-500.
- 3) Borg L., Kreek M.J. (1995). Clinical problems associated with interactions between methadone pharmacotherapy and medications used in the treatment of HIV-1-positive and AIDS patients. *Curr Opin Psychiatry*; 8 (3): 199-202.
- 4) Choo E.F., Leake B., Wandel C., Imaura H., Wood A.J., Wilkinson G.R., Kim R.B. (2000). Pharmacological inhibition of P-glycoprotein transport enhances the distribution of HIV-1 protease inhibitors into brain and testes. *Drug Metab Dispos*; 28(6): 655-660.
- 5) Díaz Moreno B. Metadona. Uso analgésico. Tesis Instituto de Neurociencias de Castilla y León Universidad de Salamanca, 27 p. Disponible en: [https://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/74555/1/TFM Neurociencias %20Diaz Morena Beatriz](https://gredos.usal.es/jspui/bitstream/10366/74555/1/TFM_Neurociencias_%20Diaz_Morena_Beatriz) . Fecha de consulta: 25/6/2018.
- 6) Ferrari A, Coccia C.P, Bertolini A., Sternieri E. (2004). Methadone-metabolism, pharmacokinetics and interactions. *Pharmacol Res*; 50: 551–559.
- 7) FDA. Guidance por Industry. Bionalaytical Method Validation. May 2001. Disponible en: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM070107.pdf>. Fecha de consulta: 7/2/2010.
- 8) Foster D.J., Somogyi A.A., Bochner, F. (1999). Methadone N-demethylation in human liver microsomes: lack of stereoselectivity and involvement of CYP3A4. *Br J Clin Pharmacol*; 47(4): 403-412.
- 9) Garrido M.J., Trocóniz I.F. (1999). Methadone: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *J Pharmacol Toxicol*; 42: 61–66.
- 10) Gibaldi M., Perrier D. (1982). *Pharmacokinetics*. 2a. ed. New York, Ed. Marcel Dekker, 494 p.
- 11) Guedes A. (2017). Pain Management in Horses. *Vet Clin North Am - Equine Pract*; 33(1): 181-211.
- 12) Hellyer P.W., Sheilah A.R., Fails A.D. (2007) Pain and its Management. En: Lumb & Jones *Veterinary Anesthesia and Analgesia*. 4a. ed. Iowa, Blackwell, pp. 31-57.
- 13) Iribarne C., Berthou F., Baird S., Dreano Y., Picart D., Bail J.P., Beaune P., Menez J.F. (1996). Involvement of cytochrome P450 3A4 enzyme in the N-demethylation of methadone in human liver microsomes. *Chem Res Toxicol*; 9: 365-373.

- 14) Kharasch E.D., Hoffer C., Whittington D., Sheffels P. (2003). Role of P-glycoprotein in the intestinal absorption and clinical effects of morphine. *Clin Pharmacol Ther*; 74(1): 543-554.
- 15) Kharasch E.D., Hoffer C., Whittington D. (2004). The effect of quinidine, used as a probe for the involvement of P-glycoprotein, on the intestinal absorption and pharmacodynamics of methadone. *Br J Clin Pharmacol*; 57(5): 600- 610.
- 16) Klaumann P.R., Wouk A.F.P.F., Sillas T. (2008). Patofisiología del dolor. *Archives of Veterinary Science*; 13(1): 1-12.
- 17) KuKanich B., Lascelles B.D.X., Aman A.M., Mealey K.L., Papich M.G. (2005). The effects of inhibiting cytochrome P450 3A, p-glycoprotein, and gastric acid secretion on the oral bioavailability of methadone in dogs. *J Vet Pharmacol Therap*; 28: 461-466.
- 18) KuKanich B., Borum S.L. (2008). The disposition and behavioral effects of methadone in Greyhounds. *Vet Anaesth Analg*; 35:242–248.
- 19) KuKanich B., KuKanich K.S., Rodriguez J.R. (2011). The effects of concurrent administration of cytochrome P-450 inhibitors on the pharmacokinetics of oral methadone in healthy dogs. *Vet Anaesth Analg*; 38: 224–230.
- 20) KuKanich B., KuKanich K. (2015). Chloramphenicol significantly affects the pharmacokinetics of oral methadone in Greyhound dogs. *Vet Anaesth Analg*; 42: 597–607.
- 21) Lamont L.A., Mathews K.A. (2007) Opioids, Nonsteroidal Anti-inflammatories, and Analgesic Adjuvants. En: Lumb & Jones Veterinary Anesthesia and Analgesia. 4a. ed. Iowa, Blackwell, pp. 241-271.
- 22) Langguth P., Lee K.M., Spahlangguth H., Amidon G.L. (1994). Variable gastric-emptying and discontinuities in drug absorption profiles-dependence of rates and extent of cimetidine absorption on motility phase and pH. *Biopharma drug dispos*; 15: 719- 746.
- 23) Linardi R.L., Natalini C.C. (2006). Multi-drug resistance (MDR1) gene and P-glycoprotein influence on pharmacokinetic and pharmacodynamic of therapeutic drugs. *Cienc Rural*, (Santa Maria); 36: 336-341.
- 24) Lin J.H., Yamazaki M. (2003). Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet*; 42(1): 59-98.
- 25) López Forniés A., Iturralde García de Diego F., Clerencia Sierra M., Galindo Ortiz de Landázuri J. (2007) Dolor. En: Tratado de geriatría para residentes. Madrid, Ed. Manuel Antón Jiménez, pp 721-731. Disponible en: http://ibdigital.uib.es/greenstone/collect/portal_social/index/assoc/segg0022.dir/segg0022.pdf. Fecha de consulta: 10/03/2018
- 26) Mealey K.L. (2004). Therapeutic implications of the MDR-1 gene. *J Vet Pharmacol Therap*; 27: 257-264.
- 27) Moody D.E., Alburges M.E., Parker R.J., Collins J.M., Strong J.M. (1997). The involvement of cytochrome P450 3A4 in the n-demethylation of 1- α -Acetylmethadol (LAAM), norLAMB, and methadone. *J Pharm Pharmacol Exp Ther*; 25: 1347-1353.

- 28) Muir W.W. (2015). Fisiologia e fisiopatologia da dor. En: Gaynor J.S. y Muir III W.W. Manual de controle da dor em medicina veterinária. 2a ed. São Paulo, Ed. MedVet, pp.13-41.
- 29) Musshoff F., Trafkowski J., Kuepper U., Madea B. (2006). An automated and fully validated LC-MS/MS procedure for the simultaneous determination of 11 opioids used in palliative care, with 5 of their metabolites. J Mass Spectrom; 41: 633-640.
- 30) Natalini C.C., Fávares da Cunha A., Lehn Linardi R. (2006). Multi-drug resistance gene (MDR1) and opioid analgesia in horses. Cienc Rural, (Santa Maria); 36(1): 330-335.
- 31) Neff M.W., Robertson K.R., Wong A.K., Safra N., Broman K.W., Slatkin M., Mealey K.L., Pedersen N.C., (2004). Breed distribution and history of canine mdr1-1Δ, a pharmacogenetic mutation that marks the emergence of breeds from the collie lineage. Proc Natl Acad Sci; 101(32): 11725-11730.
- 32) Pert C.B., Snyder S.H., (1973). Opiate receptor: Its demonstration in nervous tissue. Science; 179: 1011-1014.
- 33) Riedel W., Neeck G. (2001). Nociception, pain, and antinociception: current concepts. Z Rheumatol; 60(6): 404-415.
- 34) Rodríguez M., Ortega I., Soengas I., Suarez E., Lukas J.C., Calvo R. (2004). Effect of P-glycoprotein inhibition on methadone analgesia and brain distribution in the rat. J Pharm Pharmacol; 56: 367-374.
- 35) Trepanier L.A. (2006). Cytochrome P450 and its role in veterinary drug interaction. Vet Clin North Am Small Anim Pract; 975-985.
- 36) Trescot A.M., Datta S., Lee M., Hansen H. (2008). Opioid Pharmacology. Pain Physician; 11 (2 suppl): S133-S153.
- 37) Walsh P.S., Metzger D.A., Higuchi R. (1991). Chelex[®] 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-Based Typing from Forensic Material. Biotechniques; 10(4): 506-513.
- 38) Wang J.S., DeVane C.L. (2003). Involvement of CYP3A4, CYP2C8, and CYP2D6 in the metabolism of (r)- and (s)-methadone in vitro. Drug Metab Dispos; 31 (6): 742-747.

ANEXO 1

Concentraciones séricas (ng/mL) de la Metadona administrada por vía IV a la dosis de 0,5 mg/kg para cada animal, con su media y desviación estándar.

Tiempo (h)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Media	D.E.
0	51,92	143,26	1714,42	1812,91	930,63	963,47
0,17	47,10	110,64	1035,85	879,39	518,25	512,01
0,25	29,78	55,41	258,89	286,58	157,67	133,76
0,5	26,46	39,23	132,32	103,70	75,43	50,81
0,75	20,52	30,22	129,65	42,20	55,65	50,13
1	21,98	33,43	125,42	44,97	56,45	46,93
1,5	21,38	29,04	111,21	43,52	51,29	40,99
2	20,38	24,71	100,59	33,18	44,72	37,63
2,5	20,80	18,53	88,63	27,95	38,98	33,34
4	10,44	17,89	32,99	19,04	20,09	9,41
6	5,50	9,51	23,08	16,84	13,73	7,80

D.E.: Desvío estándar

Parámetros farmacocinéticos obtenidos por un enfoque no compartimental a partir de los datos serológicos resultantes de la administración de Metadona IV 0,5 mg/kg (n = 4).

Parámetros Farmacocinéticos	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Media	D.E.
λ (min ⁻¹) 3 ult	0,38	0,20	0,37	0,14		
correl 3 ult	0,99	0,92	0,94	0,93		
λ (h ⁻¹)	0,38	0,20	0,37	0,14	0,27	0,12
t _{1/2} (min)	1,84	3,51	1,86	4,94	3,04	1,49
AUC _{0-t} (ng·h/mL)	100,65	151,27	705,79	481,11	359,70	285,81
AUC _{extr} (ng·h/mL)	14,60	48,19	61,83	120,07	61,17	44,00
AUC _{0-∞} (ng·h/mL)	115,25	199,46	767,62	601,17	420,87	313,67
% extrapolado del AUC	12,66	24,16	8,05	19,97	16,21	7,22
CL (L/h/kg)	4,34	2,51	0,65	0,83	2,08	1,72
AUMC _{0-t} (ng·h ² /mL)	212,12	57,06	0,00	0,00	67,30	100,23
AUMC _{extr} (ng·h ² /mL)	126,30	846,03	1058,50	2438,05	1117,22	966,69
AUMC _{0-∞} (ng·h ² /mL)	338,42	903,09	1058,50	2438,05	1184,51	891,12
MRT (h)	2,94	4,53	1,38	4,06	3,22	1,40
Vd (L/kg)	12,74	11,35	0,90	3,37	7,09	5,84

D.E.: desvío estándar, λ : constante de velocidad de eliminación, t_{1/2}: tiempo de vida media, ASC_{0-t}: área bajo la curva del tiempo 0 hasta el tiempo t, AUC_{extr}: área bajo la curva extrapolada, AUC_{0-∞}: área bajo la curva del tiempo 0 a tiempo infinito, AUC: área bajo la curva, CL: *clearance*, AUMC_{0-∞}: área bajo la curva del primer momento, MRT: tiempo de residencia media, Vd: volumen de distribución.

ANEXO 2

Concentraciones séricas (ng/mL) de la Metadona en comprimido PO a la dosis de 0,5 mg/kg, co-administrada con Ketoconazol (n=4).

Tiempo (h)	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Media	D.E.
0	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
0,25	5,37	7,49	6,84	145,05	41,19	69,25
0,5	16,47	86,55	12,52	38,49	38,51	34,01
0,75	2,48	4,59	7,25	69,13	20,86	32,24
1	1,92	12,19	13,00	2,29	7,35	6,07
1,5	4,86	33,16	29,35	4,70	18,02	15,36
2	63,79	24,60	30,25	7,01	31,41	23,75
2,5	23,54	10,64	25,78	6,64	16,65	9,44
4	3,91	1,86	3,70	1,54	2,75	1,23

D.E.: Desvío Estándar

Parámetros farmacocinéticos obtenidos por un enfoque no compartimental a partir de los datos serológicos resultantes de Metadona en comprimido por vía oral 0,5 mg/kg co-administrada con Ketoconazol (n=4).

	Animal 1	Animal 2	Animal 3	Animal 4	Media	D.E.
λ (min^{-1}) 3 ult	1,35	1,26	1,11	0,81	1,13	0,24
correl 3 ult	0,99	1,00	0,98	0,98	0,99	0,01
λ (h^{-1})	1,35	1,26	1,11	0,81	1,13	0,24
$t_{1/2}$ (min)	0,51	0,55	0,63	0,86	0,64	0,15
AUC _{0-t} (ng·h/mL)	67,60	70,14	69,88	77,68	71,33	4,39
AUC _{extr} (ng·h/mL)	2,90	1,47	3,34	1,91	2,41	0,86
AUC _{0-∞} (ng·h/mL)	70,49	71,62	73,23	79,58	73,73	4,06
% extrapolado del AUC	4,11	2,06	4,57	2,40	3,28	1,24
CL (L/h/kg)	1,21	1,19	1,16	1,07	1,16	0,06
AUMC _{0-t} (ng·h ² /mL)	141,59	98,37	136,04	59,45	108,86	38,13
AUMC _{extr} (ng·h ² /mL)	13,73	22,26	61,25	22,91	30,04	21,23
AUMC _{0-∞} (ng·h ² /mL)	155,32	120,62	197,29	82,36	138,90	49,02
MRT (h)	2,20	1,68	2,69	1,03	1,90	0,71
Vd (L/kg)	2,66	2,00	3,13	1,11	2,22	0,88
Biodisponibilidad %					18	

D.E.: desvío estándar, λ : constante de velocidad de eliminación, $t_{1/2}$: tiempo de vida media, AUC_{0-t}: área bajo la curva del tiempo 0 hasta el tiempo t, AUC_{extr}: área bajo la curva extrapolada, AUC_{0-∞}: área bajo la curva del tiempo 0 a tiempo infinito, AUC: área bajo la curva, CL: *clearance*, AUMC_{0-∞}: área bajo la curva del primer momento, MRT: tiempo de residencia media, Vd: volumen de distribución, y Biodisponibilidad.