

METADONA: RELACIÓN DOSIS RESPUESTA.

A. Delgado¹; C.M. Negrín¹; R. Moratalla²; C.M. Évora¹.

¹ Dpto. Ingeniería Química y Tecnología Farmacéutica. Facultad de Farmacia. Universidad de La Laguna. 38200, La Laguna. Tenerife. España. ² Consejo Superior de Investigaciones Científicas. Instituto Cajal. Madrid.

Introducción

Aún hoy en día los mecanismos por los cuales los opiáceos alteran las funciones neuronales, incluyendo las funciones neuroendocrinas, no están bien definidos.

No obstante, se sabe que las neuronas responden al estímulo que les llega a la membrana con cambios a corto plazo, que vienen mediados por canales iónicos o por segundos mensajeros, y con cambios a largo plazo, involucrando nuevos patrones de expresión genética como son los protooncogenes, los cuales no necesitan síntesis proteica para su inducción.

La mayoría de estos protooncogenes nucleares o genes tempranos o inmediatos (IEG) codifican proteínas reguladoras que controlan la expresión de otros genes. El prototipo de estos genes inmediatos y quizá el más estudiado es el c-fos, cuya proteína forma heterodímeros específicos con otras proteínas nucleares de la familia del jun a través de una interacción "leucine-zipper" y de esta forma se fija al DNA de los genes cuya expresión regula [1].

El estudio de la inducción del c-fos por un determinado estímulo es importante porque forma parte de la cascada intracelular de señalizaciones químicas que finalmente unen el estímulo que llega a la membrana celular con la respuesta neuronal de los órganos efectores en el núcleo.

La expresión del c-fos ha sido empleada como un índice marcador de la actividad neuronal en el estriado y otras estructuras cerebrales de interés, a la administración crónica de heroína, morfina, anfetamina y cocaína [2, 3, 4, 5].

El objetivo de este trabajo es comprobar, en primer lugar, si la metadona es capaz de inducir la expresión del c-fos y, en segundo lugar, establecer una relación entre la intensidad de dicha expresión y la dosis de metadona administrada. Dicha relación nos servirá de referencia en la evaluación de la respuesta obtenida con la administración de metadona en formulaciones de cesión sostenida.

Materiales y Métodos

Administración de metadona

Los experimentos se llevaron a cabo en animales Swiss de aproximadamente 30g.

La metadona fue administrada en forma de clorhidrato disuelta en 50 µl de suero fisiológico por vía subcutánea en el lomo. A los tiempos de muestreo preestablecidos se procede a la toma de muestra de sangre y extracción de cerebro tras ser anestesiados con pentobarbital sódico (Normon) (200 mg/Kg) por vía intraperitoneal.

Fijación de los cerebros

Los cerebros fueron fijados por perfusión transcardiaca de paraformaldehído al 4% en tampón fosfato isotónico de pH 7.4 (PBS) y cortados en secciones coronales de 30 µm de grosor (vibrotomo Leica, modelo VT -1000 M) Las secciones se almacenaron en PBS con azida sódica al 0.02% a 4°C hasta su posterior procesado inmunocitoquímico.

Inmunohistoquímica

Los estudios de distribución de los receptores opioides se llevaron a cabo procesando series

rostrocaudales completas de secciones flotantes, según el método convencional de la avidina-biotina peroxidasa [6].

Las secciones fueron tratadas previamente con H₂O₂ al 3% en PBS para inactivar la peroxidasa endógena del tejido y posteriormente con una disolución de suero de cabra (NGS) al 10% y Tritón X-100 al 0.02% en PBS para bloquear los sitios de unión inespecíficos del primer anticuerpo

La incubación con el anticuerpo primario, un antisuero policlonal de conejo anti cFos, fue llevada a cabo durante 16-22 horas a 4°C. Dicho anticuerpo se utilizó diluido (1:15000) con una disolución de tritón X-100 al 0.02%, azida sódica al 0.1% y NGS al 1% en PBS.

Después se procedió a la incubación, durante 1 hora a temperatura ambiente, en el anticuerpo secundario, un anti-IgG de conejo biotinilado desarrollado en cabra (Vector), diluido 1:500 con una disolución de tritón X-100 al 0.2% y NGS al 1% en PBS.

Por último, los cortes se incubaron en estreptavidina acoplada a la enzima peroxidasa de rábano (HRP) (Zymed Laboratories Incorporated) diluida 1:5000 en PBS con Tritón X-100 al 0.2%.

El revelado de la actividad peroxidasa se llevó a cabo con 3-3' diamino benzidina (DAB) (Sigma) al 0.05% y H₂O₂ al 0.002%. La reacción se intensificó con sulfato amónico de níquel al 0.08% (Carlo Erba) [7].

Determinación de niveles de metadona en suero

Para cada punto muestreado, se obtuvieron al mismo tiempo muestras de sangre por punción cardíaca. Se separó el suero por centrifugación y se determinaron los niveles de metadona mediante análisis por TDX. Para ello se realizó una adaptación del método descrito por Desalles et al. [8] para la utilización del Kit actualmente disponible (ABBOT) para la determinación de metadona en orina.

Resultados y Discusión

Tras la administración de una dosis única de metadona equivalente a 12 mg/kg de metadona base, se pudo comprobar que la metadona

inducía la expresión de c-fos en distintas áreas cerebrales.

Para determinar el momento, desde la administración del fármaco, en el que la expresión de c-fos era máxima, se evaluó la intensidad de la respuesta en distintas regiones cerebrales (núcleo accumbens, corteza cingular y estriado) al cabo de 1, 2, 4, 8, 10 y 24 horas desde la administración de una dosis única de metadona equivalente a 12 mg/kg de metadona base. Cada una de las expresiones de c-fos estudiadas han sido evaluadas por comparación con un blanco.

Tal y como se aprecia en la figura 1 el máximo de respuesta en todas las zonas estudiadas se alcanza entre 1 y 2 horas desde la administración. Por tanto, se fijó el tiempo al cual debía ser evaluada la expresión de c-fos, en las anteriormente señaladas zonas cerebrales, en 1 hora desde la administración de metadona.

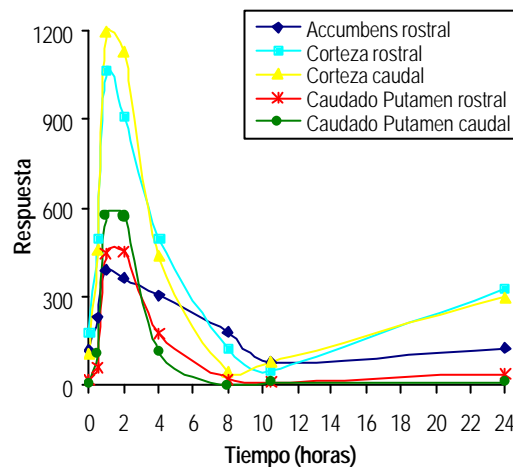


Figura 1. Evolución de la expresión de c-fos tras la administración sc de 12 mg/kg de metadona.

En la figura 2 se recoge la expresión de c-fos obtenida tras la administración de dosis de metadona equivalentes a 1, 2, 4, 8, 12 y 16 mg/kg de metadona base. Se observa como, en general, la intensidad de la respuesta aumenta con la dosis de metadona hasta alcanzarse un máximo con una dosis de 4 mg/kg, a partir de la cual la intensidad de la respuesta disminuye o se mantiene constante.

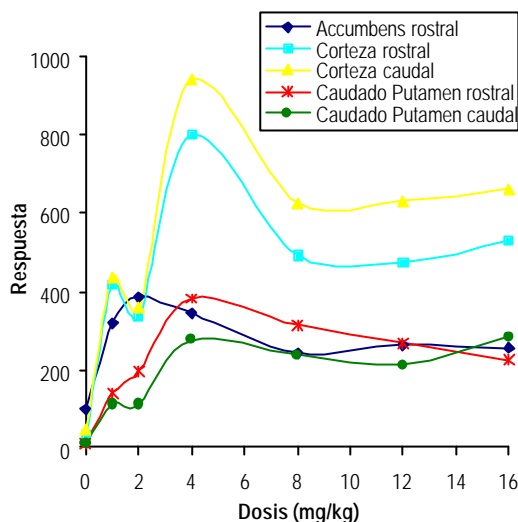


Figura 2. Relación entre la dosis de metadona y expresión de c-fos.

Por otro lado, se comprobó que existía una relación lineal entre la dosis de metadona administrada y la concentración sérica alcanzada (figura 3), por lo que no existen variaciones en los niveles séricos con las dosis más altas que pudieran explicar la rotable disminución en la respuesta observada en determinadas zonas cerebrales.

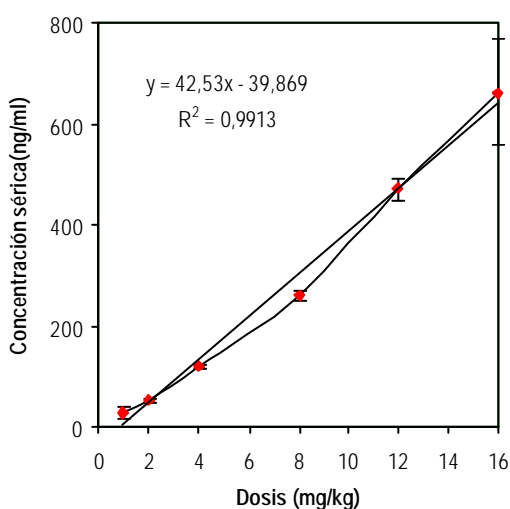


Figura 3. Relación entre la dosis de metadona y la concentración sérica alcanzada.

Bibliografía

- [1] P. Hughes y M. Dragunow. Induction of immediate-early genes and the control of neurotransmitter-regulated gene expression within the nervous system. *Pharmacological Rev.* 47, 133-178 (1995).
- [2] S.L. Chang y R.E. Harlan. The fos protooncogene protein: regulation by morphine in the rat hypothalamus. *Life Sci.*, 46, 1825-1832 (1990).
- [3] G. Torres y C. Rivier. Differential effects of intermittent or continuous exposure to cocaine on the hypothalamic-pituitary-adrenal axis and cfos expression. *Brain Res.*, 571, 204-211 (1992).
- [4] R. Moratalla, B. Elibol, M. Vallejo y A.M. Graybiel. Network-level changes in expression of inducible Fos-jun proteins in the striatum during chronic cocaine treatment and withdrawal. *Neuron*. 17, 147-156 (1996).
- [5] A.M. Graybiel, R. Moratalla y H.A. Robertson. Amphetamine and cocaine induce drug-specific activation of the c-fos gene in striosome-matrix compartments and limbic subdivisions of the striatum. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 87 6912-6916 (1990).
- [6] S.M. Hsu, L.Raine y H. Fanger. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J. Histochem. Cytochem.*, 29, 577-580 (1981).
- [7] J.C. Adams. Heavy metal intensification of DAB-based HRP reaction product. *J. Histochem. Cytochem.* 29, 775 (1981).
- [8] M.C. Dessalles, S. Gasdeblay, G. Mahuzier. Détermination de la méthadone sérique à l'aide d'une trousse immunologique et comparaison avec une méthode en chromatographie liquide. *Ann. Biol. Clin.*, 54, 203-209 (1996).

Autor de contacto:

Araceli Delgado Hernández
 adelgado@ull.es
 Universidad de La Laguna
 C/ Astrofísico Francisco Sánchez s/n.
 La Laguna
 Telf.: 922 318507
 Fax: 922 318506