



Aportación al conocimiento de la farmacocinética de metadona en plasma y saliva humanos

Eric Miguez Díez

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) i a través del Dipòsit Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX ni al Dipòsit Digital de la UB. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX o al Dipòsit Digital de la UB (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) y a través del Repositorio Digital de la UB (diposit.ub.edu) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR o al Repositorio Digital de la UB. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR o al Repositorio Digital de la UB (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service and by the UB Digital Repository (diposit.ub.edu) has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized nor its spreading and availability from a site foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service or to the UB Digital Repository is not authorized (framing). Those rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

UNITAT DE FARMÀCIA CLÍNICA I FARMACOTERÀPIA

**APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA FARMACOCINÉTICA DE
METADONA EN PLASMA Y SALIVA HUMANOS**

ERIC MIGUEZ DÍEZ

2014



FACULTAT DE FARMÀCIA

DEPARTAMENT DE FARMÀCIA I TECNOLOGIA FARMACÈUTICA

UNITAT DE FARMÀCIA CLÍNICA I FARMACOTERÀPIA

PROGRAMA DE DOCTORAT EN RECERCA, DESENVOLUPAMENT I
CONTROL DE MEDICAMENTS

**APORTACIÓN AL CONOCIMIENTO DE LA FARMACOCINÉTICA DE
METADONA EN PLASMA Y SALIVA HUMANOS**

Memoria presentada por Eric Miguez Díez para optar al título de Doctor por la
Universitat de Barcelona

Los Directores de tesis:

Prof. Dr. Eduardo L. Mariño Hernández

Dra. Pilar Modamio Charles

El tutor de la tesis:

El doctorando:

Prof. Dr. Eduardo L. Mariño Hernández

Eric Miguez Díez

ERIC MIGUEZ DÍEZ

2014

A mis padres, Ana y Jacinto.

A mi hermano, Albert.

A mi mujer, Lorena.

AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento:

Al Profesor Eduardo L. Mariño, por concederme la oportunidad de iniciarme en el campo de la investigación científica, por aceptar la dirección de la presente tesis, por los sabios consejos proporcionados tanto científicos como humanos y sobre todo por la confianza depositada en mi persona para el desarrollo del presente proyecto.

A la Doctora Pilar Modamio, por su constante dedicación y ayuda en la co-dirección de la presente tesis, por la perseverancia e inagotable espíritu de trabajo que me ha sabido transmitir, así como por la orientación, apoyo y corrección en mi labor científica.

A la Profesora Cecilia Fernández, por su valiosa ayuda en la realización de la presente tesis, por sus siempre acertadas recomendaciones científicas y su gran calidad humana brindada a lo largo de estos años.

A todos los miembros de la Unidad de Farmacia Clínica y Farmacoterapia del Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universitat de Barcelona con los que he compartido horas de trabajo, por haberme hecho sentir como en una gran familia, y en especial a mi compañera Anna Pitarch, en su paso por la Unidad, por la colaboración y toda la ayuda proporcionada al inicio del proyecto.

Al Profesor Pietro Fagiolino, la Profesora Marta Vázquez y el doctorando Manuel Ibarra de la Universidad de la República (Montevideo), por sus atenciones a nivel humano y por sus consejos y enseñanzas en el campo de la farmacocinética clínica.

ÍNDICE

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	15
1. Actividad farmacológica.....	17
1.1. Sistema nervioso central	18
1.2. Sistema cardiovascular.....	20
1.3. Sistema gastrointestinal.....	20
1.4. Sistemas renal y urinario.....	20
1.5. Sistema inmunitario	20
1.6. Otros efectos.....	21
2. Propiedades farmacocinéticas.....	21
2.1. Absorción y distribución	21
2.2. Metabolismo y excreción	23
3. Efectos adversos	26
4. Advertencias y precauciones especiales de empleo.....	27
4.1. Tolerancia y dependencia.....	27
4.2. Sobredosificación.....	28
4.3. Embarazo y lactancia	29
5. Interacciones	30
5.1. Factores que pueden modificar la efectividad y seguridad del tratamiento con metadona en la práctica clínica	31
5.2. Interacciones medicamento-medicamento	32
5.3. Interacciones con sustancias de abuso	35
5.4. Interacciones con alimentos y suplementos	36
5.5. Interacciones fisiológicas y fisiopatológicas.....	37

6. Indicaciones y recomendaciones terapéuticas	38
6.1. Tratamiento del síndrome de abstinencia a opioides	39
6.1.1. Recomendaciones terapéuticas en el tratamiento del síndrome de abstinencia a opioides	40
6.2. Manejo del dolor	41
6.2.1. Recomendaciones terapéuticas en el manejo del dolor.....	42
7. Programas de mantenimiento con metadona	45
7.1. Antecedentes históricos y epidemiología.....	45
7.2. Características de los programas de mantenimiento con metadona.....	49
7.3. Otros.....	52
8. Monitorización terapéutica de metadona	54
8.1. Fases de la monitorización terapéutica	55
8.1.1. Fase pre-analítica	55
8.1.2. Fase analítica.....	57
8.1.3. Fase post-analítica.....	57
8.2. Utilización de las concentraciones plasmáticas de metadona para su monitorización	59
8.3. Saliva como matriz biológica en la monitorización terapéutica de metadona	60
8.3.1. Saliva versus sangre.....	60
8.3.2. Fisiología de la saliva.....	62
8.3.3. Estimulación salival	64
8.3.4. Transferencia de fármacos hacia la saliva.....	66
9. Transportadores de eflujo	68
10. Justificación	69

II. OBJETIVO	71
1. Objetivo principal	73
2. Objetivos secundarios	73
III. MATERIAL Y MÉTODOS	75
1. Material.....	77
1.1. Fármacos	77
1.1.1. Fármaco objeto de estudio	77
1.1.2. Fármacos a tener en cuenta en la práctica clínica	79
1.2. Reactivos	83
1.3. Material auxiliar de laboratorio.....	83
2. Métodos	85
2.1. Desarrollo de las metodías analíticas	85
2.2. Condiciones cromatográficas	86
2.3. Preparación de las soluciones estándar y patrones de control de calidad	86
2.4. Pretratamiento de las muestras.....	87
2.5. Validación de las metodías analíticas.....	87
2.5.1. Validación completa	89
2.5.2. Validación parcial	95
2.6. Determinación de la función del error analítico.....	95
2.7. Estudio de los niveles de metadona en plasma y saliva humanos.....	98
2.7.1. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en PMM	98
2.7.2. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en terapia del dolor	104

IV. RESULTADOS	109
1. Desarrollo de las metódicas analíticas	111
2. Condiciones cromatográficas.....	119
3. Validación de las metódicas analíticas	120
3.1. Validación completa.....	120
3.2. Validación parcial	132
4. Determinación de la función del error analítico	135
5. Estudio de los niveles de metadona en plasma y saliva humanos	137
5.1. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en PMM.....	137
5.2. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en terapia del dolor.....	144
V. DISCUSIÓN	151
1. Desarrollo de las metódicas analíticas	153
2. Condiciones cromatográficas.....	155
3. Pretratamiento de las muestras	155
4. Validación de las metódicas analíticas	158
4.1. Validación completa.....	158
4.2. Validación parcial	161
5. Determinación de la función del error analítico	162
6. Estudio de los niveles de metadona en plasma y saliva humanos	165
6.1. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en PMM.....	165
6.2. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en terapia del dolor.....	171
VI. CONCLUSIONES	179
VII. BIBLIOGRAFÍA	185
VIII. DIFUSIÓN.....	209

I. INTRODUCCIÓN

I. INTRODUCCIÓN

1. ACTIVIDAD FARMACOLÓGICA

Metadona es un analgésico sintético cuyo mecanismo de acción, igual que morfina, está mediado por la activación de los receptores opioides, principalmente del tipo μ . El clorhidrato de metadona fue sintetizado por primera vez en Alemania en 1945 en los laboratorios farmacéuticos Hoechst, en el contexto de un proyecto de investigación que tenía como objetivo buscar alternativas a la morfina, con propiedades analgésicas similares, pero con menos efectos secundarios o, por lo menos, más leves [1].

Las propiedades farmacológicas de metadona son cualitativamente semejantes a las de morfina. Sin embargo, metadona se diferencia por poseer una actividad adicional como antagonista no competitivo del receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA). El receptor NMDA juega un papel importante en la transmisión del dolor, y su bloqueo explicaría el potente efecto analgésico de metadona en pacientes que no responden a otros opioides agonistas μ . Esta es una característica interesante, puesto que el antagonismo del receptor de NMDA atenúa el desarrollo de tolerancia a los opioides sin alterar sus propiedades analgésicas. Metadona es también un fuerte inhibidor de la recaptación de serotonina y de la recaptación de norepinefrina, lo que podría contribuir también a su actividad antinociceptiva [2,3].

La eficacia clínica de metadona y de los agonistas opioides en general está relacionada con la estimulación de los receptores opioides μ . Estos fármacos afectan a una amplia gama de sistemas fisiológicos: producen analgesia, influyen sobre el estado de ánimo y el comportamiento de recompensa, y alteran las funciones respiratoria, cardiovascular, gastrointestinal y neuroendocrina. Tal hecho no sorprende a la vista de la amplia distribución de sus receptores, tanto en el encéfalo como en el sistema nervioso periférico.

A continuación, se presenta una descripción de los efectos farmacoterapéuticos de metadona, enumerados de forma breve en la **Tabla 1** [4].

1.1. Sistema nervioso central

***Analgesia.** Los analgésicos opioides actúan en las vías de dolor del sistema nervioso central (SNC), ya que todos los congéneres estudiados, debido a su alta liposolubilidad, atraviesan fácilmente la barrera hematoencefálica y llegan al cerebro y a la médula espinal. Los opioides reducen los componentes sensoriales y afectivos (emocionales) del dolor. La analgesia es la propiedad terapéutica más importante de los opioides, siendo ésta dosis dependiente. Alivian o suprimen dolores de gran intensidad (agudos o crónicos) y de múltiples localizaciones. También poseen acciones sobre el sistema central (límbico y cortical), atenuando la percepción del tono desagradable o angustioso del dolor. Recientemente, se ha descrito la acción sobre terminaciones nerviosas periféricas (nociceptores), tras su administración local en lugares en los que existe un componente inflamatorio, como por ejemplo, en articulaciones.

***Sedación.** La sedación varía en función del estado del paciente (grados de dolor e insomnio). A dosis elevadas, los agonistas opioides producen estupor, sueño profundo y coma. Empeoran, por tanto, el rendimiento psicomotor. Si se administran dosis muy elevadas pueden aparecer convulsiones.

***Euforia.** Los agonistas opioides producen euforia, placer y sensación de bienestar, con reducción de la ansiedad. Este efecto es muy intenso y rápido por vía intravenosa y menor por vía fumada o inhalada. Es el efecto principal que justifica su abuso, aunque muchas veces no se observa en las primeras administraciones, ya que aparecen náuseas y vómitos. En la abstinencia, sin embargo, aparecen alteraciones del estado de ánimo, inquietud y malestar general.

***Miosis.** La mayor parte de agonistas μ generan contracción de la pupila por acción excitadora en el nervio parasimpático que la inerva. La miosis no presenta tolerancia; es decir, no desaparece con la administración terapéutica o de carácter repetido y, por ello, es útil para predecir el uso reciente de opioides y la intoxicación aguda. En casos de hipoxia grave, la miosis se convierte en midriasis paralítica.

***Depresión respiratoria.** Los agonistas opioides deprimen la actividad del centro respiratorio bulboprotuberancial y reducen la sensibilidad al CO₂ y a la hipoxia. Provocan una reducción del número de respiraciones por minuto, pudiendo llegar a la apnea. Este efecto es dosis dependiente y parece estar relacionado con la acción sobre el receptor μ , pudiendo ser clínicamente relevante en sujetos con patología respiratoria crónica (bronquitis crónica, etc.).

***Supresión de la tos.** Los opioides relacionados con la morfina suprimen el reflejo de la tos, posiblemente al afectar al conjunto de neuronas respiratorias que integran y dirigen los movimientos convulsivos de la tos. No se conoce con exactitud el mecanismo, pero las acciones antitusivas no se correlacionan con las analgésicas o con la depresión respiratoria.

***Náuseas y vómitos.** Esta acción se debe a la activación de la zona quimiorreceptora del área postrema del bulbo raquídeo, que es emetógena. Se observan más frecuentemente tras las primeras administraciones. En pacientes heroínómanos, los vómitos no son interpretados como un efecto negativo, sino como un signo de la eficacia de la droga.

***Efectos hipotalámicos.** Los opioides alteran el punto de equilibrio de los mecanismos hipotalámicos reguladores del calor, de modo que la temperatura corporal puede disminuir generando hipotermia. Sin embargo, una dosificación elevada y a largo plazo puede incrementar la temperatura corporal.

***Efectos neuroendocrinos.** Por su acción sobre el hipotálamo y la hipófisis, los opioides estimulan la secreción de hormona adrenocorticotropa o corticotropina (ACTH), la hormona del crecimiento (GH), la hormona estimulante de los melanocitos (β -MSH) y la hormona antidiurética (ADH), e inhiben la secreción de la hormona tiroestimulante (TSH) y las gonadotropinas luteinizante (LH) y foliculoestimulante (FSH).

1.2. Sistema cardiovascular

Pueden provocar hipotensión por acción sobre el centro vasomotor, así como por vasodilatación arterial y venosa, efecto al que también puede contribuir la liberación de histamina. También puede aparecer bradicardia de origen vagal. Debido al aumento de la presión parcial de CO₂, se produce vasodilatación cerebral que eleva la tensión intracraneal.

1.3. Sistema gastrointestinal

Los agonistas opioides provocan un aumento del tono muscular en el tracto gastrointestinal, incluidos los esfínteres, y una reducción de la motilidad. Como consecuencia, se retrasa el vaciamiento gástrico, disminuye el peristaltismo intestinal y se contraen los esfínteres. Clínicamente, todo ello se manifiesta con la aparición de estreñimiento y un aumento de la presión en las vías biliares con hipertonia del esfínter de Oddi, disminuyendo las secreciones biliares y pancreáticas. Estas acciones se deben fundamentalmente al efecto sobre los receptores μ .

1.4. Sistemas renal y urinario

Incrementan el tono del músculo detrusor de la vejiga con sensación de urgencia miccional y aumentan el tono del esfínter, por lo que dificultan la micción (retención urinaria). Reducen el flujo renal y poseen un efecto antidiurético.

1.5. Sistema inmunitario

Los opioides administrados de forma crónica son inmunosupresores. Se ha observado aumento de la sensibilidad a la infección y a la diseminación de neoplasias. Estos efectos han sido inconstantes en situaciones clínicas, por lo que una mejor comprensión de estas propiedades ayudará a guiar el uso racional de opioides en pacientes con cáncer o en riesgo de infección o alteración inmunitaria.

1.6. Otros efectos

***Liberación de histamina.** Se produce en zonas de la cara y parte superior del tronco. Como consecuencia, aparece sensación de calor, enrojecimiento facial y prurito. La liberación de histamina puede producir cierto grado de broncoconstricción.

***Útero.** Reducen el tono uterino y por ello, alargan el trabajo del parto. En situaciones en que el útero se ha vuelto hiperactivo por acción de agentes oxitócicos, los agonistas opioides tienden a restaurar el tono, la frecuencia y la amplitud de las contracciones hacia valores normales.

Tabla 1. Efectos farmacoterapéuticos de metadona.

Centrales	Periféricos
<ul style="list-style-type: none">• Analgesia• Sedación• Euforia• Miosis• Depresión respiratoria• Supresión de la tos• Náuseas y vómitos• Efectos hipotalámicos• Acciones neuroendocrinas - estimula la secreción de ACTH, GH, β-MSH y ADH, e inhibe la secreción de TSH, LH y FSH*	<ul style="list-style-type: none">• Cardiovasculares: hipotensión, bradicardia, aumento de la tensión intracraneal• Gastrointestinales: estreñimiento, disminución de las secreciones biliares y pancreáticas• Renales y urinarios: reducción del flujo renal y efecto antidiurético• Inmunosupresión en tratamientos crónicos• Liberación de histamina: sensación de calor, enrojecimiento facial, prurito, broncoconstricción• Reducción del tono uterino

*ACTH = corticotropina; GH = hormona del crecimiento; β -MSH = hormona estimulante de los melanocitos; ADH = hormona antidiurética; TSH = hormona tiroestimulante; LH = gonadotropina luteinizante; FSH = gonadotropina foliculoestimulante.

2. PROPIEDADES FARMACOCINÉTICAS

2.1. Absorción y distribución

Metadona se absorbe rápidamente por vía oral, pudiendo ser detectada en sangre entre 15-45 minutos después de su administración y alcanzando una concentración máxima en plasma entre 2.5 y 4 h post-dosis. También puede detectarse un segundo pico en plasma, aproximadamente 4 horas después de la administración, atribuido habitualmente a un fenómeno de recirculación enterohepática [5].

Metadona presenta una biodisponibilidad oral media alrededor del 75% (rango 36-100%) y se une fuertemente a proteínas plasmáticas (86%), incluyendo glicoproteína ácida alfa-1 (AGP), lipoproteínas y albúmina [3].

En individuos no tolerantes, metadona se elimina del plasma siguiendo una cinética biexponencial, con una semivida de disposición rápida alrededor de 14 h y una semivida de disposición lenta de aproximadamente 55 h. En individuos tolerantes, la semivida de disposición lenta es variable y oscila entre las 13-47 h, siendo la media de 25 h [5].

En el estado de equilibrio estacionario, el volumen aparente de distribución durante la fase de eliminación oscila entre 2 y 5 L/kg. Sin embargo, estos valores son mucho mayores que los volúmenes fisiológicos reales, lo que indica que metadona es objeto de una amplia unión a tejidos corporales que actúan como reservorio, incluyendo cerebro, intestino, riñón, hígado, músculo y pulmón, una distribución que predomina sobre la unión a proteínas plasmáticas [3]. Esta extensa distribución contribuye a que los niveles de metadona en la leche materna sean muy bajos. Por consiguiente, la lactancia materna en mujeres en programas de mantenimiento con metadona (PMM) es bastante segura para los bebés, según confirma la propia Academia Americana de Pediatría [6].

Las variaciones en la unión a proteínas plasmáticas, tales como las producidas por cambios en los niveles de la alfa-1-glicoproteína ácida plasmática (AGP), pueden alterar significativamente la farmacocinética de metadona. Metadona se une principalmente a AGP, mientras que la unión a albúmina no es significativa. Cuando los niveles de AGP aumentan, la disminución de los niveles de metadona en plasma puede traducirse en manifestaciones típicas del síndrome de abstinencia a opioides, ya que solamente la fracción libre de metadona puede atravesar la barrera hematoencefálica y desempeñar su efecto farmacoterapéutico [7]. Otros fármacos administrados conjuntamente pueden también competir para unirse a AGP. Si un fármaco tiene mayor afinidad por AGP en el mismo sitio de unión, metadona quedará desplazada, pudiendo conducir a un aumento de los niveles de metadona libres en plasma, lo que a su vez puede causar síntomas de sobredosis. Las variantes de la propia AGP también deben tenerse en cuenta, ya que cada variante tiene una afinidad de unión diferente a metadona [8].

Las proteínas transportadoras también tienen un papel importante en la regulación de la absorción, distribución y eliminación de muchos fármacos, y la glicoproteína P (P-gp) se considera uno de los transportadores más importantes dentro de este grupo. Metadona es sustrato del transportador de eflujo P-gp, el cual es codificado por el gen ABCB1, que regula la exposición del sistema nervioso central. En relación a esto, se ha visto que la variabilidad genética en ABCB1 puede hacer que un paciente requiera una dosis de metadona mayor a 150 mg/día [9]. Por otro lado, la inhibición de P-gp a nivel intestinal y cerebral ha demostrado aumentar las concentraciones plasmáticas de metadona oral en la fase de absorción a través del grado de miosis como indicador de toxicidad [10]. P-gp puede ser importante también durante el embarazo, ya que influye en el paso de metadona a través de la placenta [11]. No obstante, aunque se han realizado muchos estudios con P-gp, los resultados para metadona son poco concluyentes y en muchas ocasiones, contradictorios [5].

2.2. Metabolismo y excreción

Existen grandes diferencias interindividuales en el metabolismo de metadona, lo cual, en parte, contribuye a la elevada variabilidad observada en la efectividad clínica del fármaco. La principal vía metabólica de metadona implica una N-desmetilación y ciclación espontánea seguida de una deshidratación para formar el metabolito principal, 2-etilideno-1,5-dimetil-3,3-difenilpirrolidina (EDDP). La N-desmetilación de EDDP forma otro metabolito, 2-etil-5-metil-3,3-difenilpiralina (EMDP). Ambos metabolitos son inactivos, aunque también se producen cantidades muy pequeñas y clínicamente insignificantes de metabolitos activos [5].

Metadona es metabolizada ampliamente por el citocromo CYP 3A4, y en menor medida por el CYP 1A2, 2D6, 2D8, 2C9/2C8, 2C19 y 2B6. El metabolismo se produce básicamente a nivel hepático, aunque probablemente también a nivel intestinal. La inhibición farmacológica del CYP 3A es generalmente reversible una vez que la administración del fármaco que interacciona se suspende y éste es eliminado del cuerpo. Sin embargo, en el caso de algunos inhibidores enzimáticos (por ejemplo, diltiazem, antibióticos macrólidos y mifepristona), el efecto puede durar incluso después de que dicho fármaco haya sido mayoritariamente eliminado, ya que generan un complejo cuya disociación es más lenta [5].

Existe una alta variabilidad interindividual en las concentraciones sanguíneas de metadona para una misma dosis dada; por ejemplo, con el fin de obtener una concentración plasmática de metadona de 250 ng/mL, pueden requerirse dosis de metadona desde 55 mg/día hasta 921 mg/día para un paciente de 70 kg sin comedicación. Esta variabilidad se debe, en parte, a la existencia de polimorfismos en las enzimas CYP que metabolizan metadona. Fenotípicamente, se han descrito para CYP 2D6 metabolizadores lentos, metabolizadores intermedios y metabolizadores ultra rápidos. Si bien el impacto de estas variaciones sobre los PMM no está claro, es cierto que los metabolizadores ultra rápidos de CYP 2D6 han manifestado tener un nivel más alto de insatisfacción con la terapia [12]. Precisamente se ha observado que metadona inhibe el CYP 2D6, hecho que puede conducir a una toxicidad inesperada de aquellos fármacos que son sustrato de esta enzima, como dextrometorfano [5].

También existe una gran variabilidad interindividual en la actividad de las enzimas hepáticas CYP 3A4, hecho que resulta en consecuencias metabólicas variables para aquellos pacientes mantenidos con metadona. Sin embargo, la variabilidad en la actividad del CYP 3A4 no está vinculada a los polimorfismos genéticos descritos para esta enzima. Adicionalmente, se ha visto que polimorfismos en CYP 2C9 y 2C19 no afectan a los niveles plasmáticos de metadona [5].

Metadona se excreta por la bilis y la orina. La excreción por la orina (entre el 15% y el 35%) es pH dependiente; aumenta con pH ácido y disminuye con pH alcalino. A dosis superiores a 55 mg/día, metadona se elimina fundamentalmente por vía urinaria, habiéndose llegado a detectar hasta nueve metabolitos en orina [3].

En relación al aclaramiento, en un estudio con 12 pacientes dependientes de opioides [13], se observó una reducción significativa en la contribución del aclaramiento renal a la eliminación de metadona, pasando del 23.8 % en los primeros 1-3 días de tratamiento al 13.7 % en los días 24-26 ($p = 0,047$). Adicionalmente, se observó un pequeño aumento, aunque no significativo (20 %), en el aclaramiento total entre los dos períodos (media, 5.7 L/h frente a 6.9 L/h). En otro estudio con 35 pacientes [14], se determinó un aumento mucho mayor (350 %) en el aclaramiento total entre la primera dosis de metadona y las dosis de mantenimiento tras 30 días en tratamiento. Sin embargo, el aumento del aclaramiento de metadona durante las

primeras semanas de tratamiento no se observa en todos los pacientes y, por tanto, los parámetros que describen las concentraciones plasmáticas de metadona después de una dosis oral única en voluntarios sanos no se pueden utilizar como base para la predicción y el ajuste de la dosis en usuarios de opioides que reciben tratamiento con metadona [15].

Es importante destacar también otro estudio realizado en un grupo numeroso de pacientes con cáncer [16], donde se obtuvo una amplia variabilidad en el aclaramiento de metadona (1.4 – 126.0 L/h, n = 184). Tal variabilidad puede explicarse, en parte, por las interacciones metabólicas con otros fármacos que tomaban los pacientes. A modo de ejemplo, se ha comprobado que amitriptilina disminuye el aclaramiento de metadona, mientras que fenitoína, espironolactona, verapamilo, estrógenos y barbitúricos lo incrementan. Así pues, el valor de aclaramiento más elevado (126 L/h) se obtuvo en un paciente que tomaba barbitúricos, conocidos por presentar fuertes propiedades inductoras.

También se ha observado que metadona induce su propio metabolismo, encontrándose valores de aclaramiento significativamente menores durante el inicio del tratamiento que en condiciones de estado estacionario [17]. Recientemente se ha demostrado que esta auto-inducción metabólica es concentración-dependiente, y está mediada por la inducción de las enzimas CYP 2B6 y 3A4, generando un aumento en la N-desmetilación de metadona [18].

En la tabla siguiente (**Tabla 2**) se incluyen a modo de resumen las principales características farmacocinéticas de metadona [3,5].

Tabla 2. Resumen de las características farmacocinéticas de metadona.

Foral	0.36 - 1 (media, 0.75)
Tmax (h)	2.5 - 4
Vd (L/kg)	2 - 5 (media, 4)
UPP (%)	86
t_{1/2β} (h)	13 - 47 (media, 25)
Cl_t (L/h)	4.5 - 8.9 (media, 6.7)

Foral = biodisponibilidad oral; Tmax = tiempo al que se alcanza la concentración máxima; Vd = volumen de distribución; UPP = unión a proteínas plasmáticas; t_{1/2β} = semivida de eliminación en la fase beta; Cl_t = aclaramiento total.

3. EFECTOS ADVERSOS

Metadona posee numerosos efectos adversos relacionados con sus efectos terapéuticos, los cuales son dosis-dependiente [2]. Los efectos adversos que puedan aparecer dependen de varios factores, como la dosis, duración del tratamiento, dosis, vía de administración, edad del paciente, función hepática y renal, medicación concomitante o el uso de otras sustancias [1].

Las reacciones adversas más graves, como sucede también con otros opioides, son la depresión respiratoria y, en menor medida, la hipotensión, con casos asociados de parada respiratoria, shock y paro cardíaco. Sin embargo, en términos generales, estos efectos adversos son mínimos y relativamente tolerables [19].

En general, parece que los efectos adversos son más intensos en los pacientes ambulatorios y en los que no presentan dolor crónico intenso. En aquellos usuarios que inician tratamiento, los efectos adversos más comunes incluyen somnolencia, náuseas y estreñimiento, mientras que los menos habituales son vómitos, prurito y mareos [4]. Por otra parte, en pacientes en tratamiento a largo plazo, los dos efectos adversos más frecuentes son estreñimiento, cuya tolerancia se desarrolla a los 3 años, y diaforesis, que suele persistir aproximadamente en el 50% de los pacientes [20]. Asimismo, durante el tratamiento se han notificado casos de prolongación del intervalo QT en el electrocardiograma y *torsades de pointes* (un tipo de arritmia ventricular polimórfica), especialmente a dosis altas (>200 mg/día). Por este motivo se debe administrar con precaución en pacientes con antecedentes de prolongación del intervalo QT, enfermedad cardíaca avanzada o pacientes que reciban un tratamiento con medicamentos que puedan prolongar el intervalo QT o medicamentos que incrementen la concentración plasmática de metadona [21].

4. ADVERTENCIAS Y PRECAUCIONES ESPECIALES DE EMPLEO

4.1. Tolerancia y dependencia

La aparición de tolerancia y dependencia física con el uso repetido es una propiedad característica de todos los opioides. La tolerancia y la dependencia son reacciones fisiológicas que se observan en todos los pacientes y no son predictivas de adicción, ya que los mecanismos implicados parecen ser bastante distintos. De hecho, la adicción es un comportamiento que se caracteriza por el consumo compulsivo de un fármaco e implicación abrumadora en su obtención y consumo [4].

La tolerancia al efecto de los opioides u otros fármacos implica que, con el tiempo, el fármaco pierde su eficacia, y se requiere una dosis aumentada para producir el mismo efecto fisiológico. La tolerancia a los efectos adversos de metadona se desarrolla de forma muy variable, pudiendo producirse tras unos pocos días, semanas o años. Es por ello que la dosificación debe ajustarse convenientemente en función de la tolerancia de cada paciente para evitar la aparición de somnolencia, signo temprano de depresión del SNC. De hecho, como ocurre con todos los opioides, metadona debe utilizarse con prudencia en pacientes con la función respiratoria comprometida [2]. Además, es necesario destacar que, en la mayoría de casos, los pacientes desarrollan una tolerancia parcial a los efectos antieméticos, anoréxicos, mióticos, sedantes y depresores de metadona [19].

La dependencia se refiere a una serie de cambios complejos y poco entendidos de la homeostasia del organismo. Esta alteración queda a menudo de manifiesto cuando se interrumpe de manera repentina la administración de un opioide, lo cual da por resultado la aparición de síndrome de abstinencia (**Tabla 3**). Además, la administración de dosis habituales de un antagonista opioide a un paciente con dependencia física de metadona u otros opioides precipita un síndrome de abstinencia agudo. La gravedad de los síntomas dependerá del grado de dependencia del sujeto y de la dosis de antagonista administrada. El síndrome de abstinencia a opioides, pese a ser muy desagradable, no pone en peligro la vida del sujeto. Se inicia en un plazo de 6 a 12 h después de la última dosis de un opioide de acción breve (heroína, morfina), y hasta 72 a 84 h después de la de un opioide de acción muy prolongada (metadona) [4].

Ni las presencias de tolerancia y dependencia ni el temor a que puedan aparecer deben interferir en el uso apropiado de metadona. Ésta puede suspenderse en individuos dependientes una vez que la necesidad clínica haya terminado, mediante un esquema terapéutico que supone la disminución de la dosis entre un 10-20% cada dos días y sin que aparezcan signos y síntomas de abstinencia [4].

4.2. Sobredosificación

Las manifestaciones clínicas de una sobredosis (**Tabla 3**) consisten en la aparición de depresión respiratoria, caracterizada por disminución de la frecuencia respiratoria y del volumen ventilatorio, cianosis y respiración de Cheyne-Stokes; somnolencia extrema, que puede evolucionar hacia el estupor y coma; miosis intensa, flaccidez muscular, frialdad cutánea y, en ocasiones, hipotensión y bradicardia. En caso de intoxicación extrema puede aparecer apnea, colapso circulatorio, fallo cardíaco y muerte.

El tratamiento consistirá en el restablecimiento de la función ventilatoria adecuada, mediante la instauración de una vía aérea permeable y respiración asistida. Debe administrarse un antagonista opioide (naloxona o nalorfina), por vía intravenosa o intramuscular, a dosis similares a las requeridas en la intoxicación morfínica. Puesto que la duración de acción de los antagonistas opioides es mucho más corta que la de metadona, éstos deberán administrarse en dosis repetidas, según la evolución clínica. No debe administrarse un antagonista si no existen signos de depresión respiratoria o cardiovascular. Si el diagnóstico es correcto y la depresión respiratoria se debe solamente a la intoxicación por metadona, no está indicado el uso de estimulantes respiratorios. Pueden utilizarse otras medidas de soporte vital y tratamiento sintomático habitual: oxigenoterapia, vasopresores, fluidos intravenosos, etc. [19].

A continuación se detallan los síntomas característicos del síndrome de abstinencia a opioides y de la sobredosificación por metadona (**Tabla 3**) [22].

Tabla 3. Síntomas de abstinencia a opioides y de sobredosificación por metadona.

Síntomas de abstinencia		Síntomas de sobredosificación / intoxicación
Subjetivos	Objetivos	
<ul style="list-style-type: none"> • Ansiedad • Irritabilidad • Mialgias • Espasmos musculares • Enrojecimiento facial • Dolor abdominal • Insomnio 	<ul style="list-style-type: none"> • Gastrointestinales: náuseas, vómitos y diarrea • Agitación • Diaforesis • Secreción lacrimal • Rinorrea • Midriasis (dilatación pupilar) • Bostezos • Hipertensión arterial • Piloerección • Taquicardia • Temblores • Fiebre 	<ul style="list-style-type: none"> • Sedación / letargia • Depresión respiratoria • Miosis (contracción pupilar) • Bradicardia • Hipotermia • Estupor • Coma

4.3. Embarazo y lactancia

Metadona atraviesa la membrana placentaria. Sin embargo, la evidencia publicada sobre la exposición del lactante a metadona a través de la leche materna es escasa. Se conoce que las concentraciones de metadona en la leche materna son bajas y se mantienen estables a lo largo del tiempo [23-25]. Dosis de 25 a 180 mg/día de metadona producen concentraciones en leche materna entre 27-260 ng/mL, lo que corresponde a una ingesta diaria de metadona de 0.05 mg (considerando que el consumo de leche de un bebé es de aproximadamente 500 mL/día) [26]. Para un bebé de 5 kg, esta cantidad sería igual a la administración de menos del 1% de la dosis ajustada al peso materno (la dosis típica para adultos es de 40-180 mg/día) [26]. Incluso después de corregir para una tasa de aclaramiento de metadona más lenta en el recién nacido, en comparación con el adulto, la dosis relativa del bebé no superaría el 5% de la dosis ajustada al peso de la madre.

Metadona ofrece importantes beneficios terapéuticos a la población embarazada dependiente, los cuales superan con creces el bajo riesgo que supone la excreción del fármaco a través de la leche materna [27]. Durante 18 años, la *American Academy of Pediatrics* recomendaba la compatibilidad de metadona con la lactancia a dosis maternas inferiores a 20 mg/día [28]; en septiembre de 2001, en base a la evidencia

disponible, la propia Academia suprimió dicha restricción, considerando desde entonces que metadona es compatible con la lactancia a cualquier dosis materna [6].

Los bebés nacidos de mujeres en terapia de mantenimiento con metadona pueden desarrollar el síndrome de abstinencia neonatal (NAS), atribuible a la retirada de metadona en los primeros días de vida [29]. El retraso observado entre la retirada y la aparición del NAS, en comparación con otros opioides, se explica por el hecho de que en el período neonatal precoz las concentraciones de metadona en el bebé y en la madre son similares, y a partir de entonces, los niveles de metadona disminuyen lentamente en el bebé de acuerdo con la larga semivida de eliminación. Malpas et al. han sugerido que la lactancia materna puede ser beneficiosa en el tratamiento del NAS [30], aunque no está claro si ello es debido a los efectos favorables de la propia lactancia o a las bajas concentraciones de metadona presentes en la leche materna que mitigan el efecto de retirada del fármaco.

En definitiva, las bajas concentraciones de metadona presentes en leche materna descritas en la literatura apoyan la recomendación de no desalentar el uso de la terapia de mantenimiento con metadona en madres lactantes, independientemente de la dosis [31,32].

5. INTERACCIONES

Los pacientes que toman metadona para la dependencia a opioides o para el dolor crónico suelen tener prescritos una variedad de medicamentos adicionales relacionados con sus comorbilidades, pudiendo generar la aparición de interacciones clínicamente relevantes. Además, la introducción progresiva de nuevos principios activos, juntamente con el uso de múltiples regímenes farmacoterapéuticos, ha hecho aumentar la probabilidad de interacciones farmacoterapéuticas significativas, complicando la evaluación clínica del paciente y la toma de decisiones por parte del médico [1]. Los médicos prescriptores de metadona deben informarse de forma periódica sobre cualquier sustancia nueva que pueda tomar el paciente (incluyendo drogas de abuso, productos naturales, alimentos y medicamentos tanto de prescripción como de venta libre), especialmente si un paciente que permanece estable experimenta repentinamente

intoxicación, síntomas de abstinencia o ansia por consumir metadona. De este modo podrán valorar si el tratamiento requiere de una modificación de la dosis o si es necesaria la prescripción de otros medicamentos que no tengan interacciones farmacocinéticas y/o farmacodinámicas con metadona [5].

De acuerdo con sus características, las interacciones farmacocinéticas de metadona se deben fundamentalmente a varios factores ya comentados anteriormente [33]:

- Fármacos o sustancias capaces de inducir o inhibir la actividad de las enzimas CYP P450 involucradas en el metabolismo de metadona, la mayoría relacionados con el CYP 3A4 y CYP 2D6. Los inductores disminuyen las concentraciones plasmáticas de metadona, mientras que los inhibidores las aumentan.
- Fármacos que alteran la unión a proteínas plasmáticas, aumentando o disminuyendo la fracción de metadona libre en plasma.
- Factores que afectan al pH urinario (por ejemplo, las sustancias acidificantes, como la vitamina C, aceleran la eliminación urinaria).

5.1. Factores que pueden modificar la efectividad y seguridad del tratamiento con metadona en la práctica clínica

Los pacientes tratados con metadona requieren de una vigilancia especial en relación a las interacciones de relevancia clínica, ya que sus consecuencias son potencialmente peligrosas e, incluso, pueden modificar el cumplimiento del tratamiento. Entre los factores que pueden modificar la efectividad del tratamiento con metadona destacan [34]:

- **Polimedicación y comorbilidad.** La polimedicación debida al tratamiento concomitante de enfermedades asociadas (comorbilidad). Es necesario destacar las enfermedades infecciosas como el VIH o la hepatitis B o C, dada la alta incidencia y el historial de conductas de riesgo (la mayoría de pacientes incluidos en terapia de mantenimiento con metadona han sido usuarios de drogas por vía parenteral), además del tratamiento de las enfermedades psiquiátricas asociadas que puedan requerir el uso de antipsicóticos, antidepresivos o benzodiazepinas. Por otro lado, la coexistencia de lesiones en órganos implicados en la eliminación de los fármacos del organismo, sobre todo hígado y también riñón, como consecuencia de la historia

toxicológica (efectos hepatotóxicos de sustancias de abuso y adulterantes) o patológica (hepatitis crónicas por infección vírica, cirrosis, etc.). En estos casos, la permanencia del fármaco en el organismo, sus concentraciones plasmática y tisular se pueden ver afectadas.

- **Medicamentos no prescritos, sustancias de abuso, alimentos y suplementos.** La ingesta de medicamentos no prescritos, como el consumo de psicoestimulantes u otras sustancias de abuso como el alcohol, las anfetaminas o la cocaína, que junto con la presencia de un cuadro de politoxicomanía, modifican el efecto terapéutico de los fármacos. De igual forma, la ingesta de determinados alimentos o suplementos vitamínicos pueden incrementar o disminuir la concentración plasmática de metadona y modificar su efecto.

5.2. Interacciones medicamento-medicamento

A partir de mecanismos conocidos sobre el metabolismo y eliminación de metadona se han identificado varios fármacos que interaccionan y que provocan variaciones importantes en su biodisponibilidad y, por tanto, en su acción sobre el organismo. Estas interacciones se han demostrado en estudios clínicos, estudios de casos o de experimentación en animales y, a veces, a partir de principios farmacoterapéuticos generales. Estos fármacos se pueden clasificar en:

- Fármacos contraindicados en pacientes en tratamiento con metadona. Los fármacos incluidos en la **Tabla 4** pueden desplazar a metadona de su unión con los receptores μ y, consecuentemente, pueden disminuir su eficacia y provocar un síndrome agudo de abstinencia [1,5].

Tabla 4. Fármacos contraindicados en pacientes en tratamiento con metadona.

Grupo terapéutico	Fármaco
Analgésicos opioides agonistas / antagonistas	Buprenorfina, Butorfanol, Nalbufina, Pentazocina
Antagonistas opioides	Naltrexona, Naloxona, Nalmefeno
Analgésicos sintéticos	Tramadol

- Fármacos que pueden interferir con el metabolismo de metadona (**Tabla 5**). En estos casos se pueden producir efectos adversos imprevisibles y muy diversos relacionados con la administración de metadona y también con la del fármaco que se ha utilizado para tratar la enfermedad concomitante [1,5,35].

Tabla 5. Fármacos que pueden interferir en el metabolismo de metadona.

Fármaco	Mecanismo de interacción y efecto
Alprazolam, diazepam, estazolam, flurazepam, midazolam, triazolam	Interacción potencial, ya que estos fármacos comparten la vía metabólica del citocromo P450. El diazepam incrementa los efectos de metadona y puede causar una depresión del SNC potencialmente mortal.
Dextrometorfano	Metadona puede incrementar la concentración plasmática y el efecto de dextrometorfano. Alteraciones cardiovasculares: riesgo de prolongación del intervalo QT.
Fentanilo, morfina, oxicodona, dextropropoxifeno, petidina	Efecto sinérgico de los opioides. Acción prolongada de los metabolitos que alcanzan concentraciones tóxicas de opioides.
Inhibidores de la monoamino oxidasa (IMAO): tranilcipromina, moclobemida, isocarboxazida	Pueden potenciar y prolongar los efectos depresores de metadona. También pueden estimular el SNC. Evitar la administración de metadona conjuntamente con IMAO, debiendo transcurrir dos semanas entre la interrupción del tratamiento con un IMAO y el inicio del tratamiento con metadona.
Amitriptilina, desipramina, imipramina, nortriptilina	Metadona incrementa la toxicidad de los antidepresivos. Estudios mixtos de incremento o descenso de los niveles de metadona. Posible efecto pro-arrítmico.
Nifedipino	Metadona puede incrementar la concentración plasmática de nifedipino y potenciar su efecto.
Octreótida	Puede reducir el efecto analgésico de metadona y morfina.
Difenoxilato, loperamida	Su uso concomitante con metadona puede provocar estreñimiento grave y una depresión mayor del SNC.
Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido (ITIAN): zidovudina, abacavir, didanosina, estavudina, lamivudina, zalcitabina	Los ITIAN no se metabolizan por la vía enzimática del citocromo P450. Metadona actúa sobre la absorción, glucuronización y metabolismo de primer paso de los ITIAN. Además, incrementa los efectos tóxicos dependientes de los antirretrovirales.

- Fármacos que pueden disminuir la concentración plasmática de metadona y, por tanto, disminuir los efectos, e incrementar así el riesgo de aparición del síndrome de abstinencia y disminuir su actividad analgésica (**Tabla 6**) [1,5,35].

Tabla 6. Fármacos que pueden disminuir la concentración plasmática de metadona.

Fármaco	Mecanismo de interacción y efecto
Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósidos (ITINAN): neviraparina, efavirenz, delavirdina	Son inductores y sustratos de la vía del CYP 3A4, y pueden disminuir la efectividad de metadona. Aparición de síndrome de abstinencia (se recomienda incrementar la dosis de metadona en un 10-20 %).
Inhibidores de la proteasa (IP): abacavir, indinavir, ritonavir, saquinavir, nelfinavir, telaprevir, boceprevir	Son sustratos e inhibidores del CYP 3A4 e inductores de la glucuroniltransferasa. Posible falta de efectividad y aparición de síndrome de abstinencia.
Fenobarbital	Inducen la vía metabólica del citocromo P450, pudiendo causar un fuerte descenso de la concentración de metadona.
Carbamazepina	Potente inductor del CYP 3A4 y CYP 2B6. Puede causar síndrome de abstinencia.
Dexametasona	Inductor de los CYP 3A4 y CYP 2B6.
Espironolactona	Inductor del CYP 3A4. Aumenta el aclaramiento de metadona. Potencial aparición de síndrome de abstinencia.
Fenitoína	Inductor del CYP 3A4 y CYP 2B6. Disminución de la concentración de metadona. Aparición de síndrome de abstinencia.
Rifampicina, isoniazida	Inductores del CYP 3A4. Se han descrito casos graves de aparición de síndrome de abstinencia.

- Fármacos que pueden incrementar la concentración plasmática de metadona y, por tanto, potenciar sus efectos, e incrementar el riesgo de sedación y de depresión respiratoria (**Tabla 7**) [1,5,35].

Tabla 7. Fármacos que pueden incrementar la concentración plasmática de metadona.

Fármaco	Mecanismo de interacción y efecto
Inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina (ISRS): fluoxetina, paroxetina, fluvoxamina, sertralina	Inhibición del CYP 2D6. Efecto relevante con fluvoxamina, que también inhibe el CYP 1A2, por lo que no se deben coadministrar.
Verapamilo	Inhibición del citocromo P450. En combinación con metadona, produce efectos potencialmente adversos como arritmias.
Eritromicina, claritromicina	Fuerte inhibición del CYP 3A4.
Metronidazol	Inhibición del CYP 3A4.
Cimetidina	Inhibición de la vía del citocromo P450.
Ergotamina	Inhibición selectiva del CYP 3A4.
Fluconazol, ketoconazol, miconazol, itraconazol	Inhibición del citocromo P450. Incrementan la concentración de metadona.
Bicarbonato sódico	La orina alcalina disminuye la eliminación renal de metadona.
Omeprazol	Estudios en animales. Posiblemente afecta la absorción de metadona por aumento del pH gástrico. Incrementa la concentración de metadona.
Zafirlukast, pranlukast, montelukast	Inhiben el citocromo P450. Clínicamente no verificado.
Amiodarona, diltiazem, quinidina	Inhibición del CYP 3A4. Amiodarona también inhibe el CYP 2D6. Quinidina también inhibe la P-gp. Clínicamente no verificado.

5.3. Interacciones con sustancias de abuso

Pese a que el tratamiento con metadona ha demostrado ser efectivo, una parte de los pacientes mantiene el consumo de otras sustancias con capacidad adictiva. En relación con estos patrones de consumo, las principales interacciones observadas se resumen en la **Tabla 8** [1,5,35].

Tabla 8. Sustancias de abuso que pueden alterar los niveles o efectos de metadona.

Fármaco	Mecanismo de interacción y efecto
Alcohol: Consumo agudo	Inhibidor del citocromo P450. Incremento de la concentración de metadona, pudiendo producir sedación intensa y depresión respiratoria fatal.
Consumo crónico	Inductor del citocromo P450. Disminución de la concentración de metadona, pudiendo provocar una aparición precoz del síndrome de abstinencia.
Cocaína	Inducción del CYP 3A4. Disminución de la concentración de metadona. Su consumo junto con metadona es un factor de riesgo de recaída en el consumo de heroína u otras sustancias como el alcohol o benzodiazepinas.
Heroína	Desplaza metadona de su unión a los receptores μ . Disminución de los efectos de metadona. Valorar un aumento de la dosis de metadona.
Anfetamina, metanfetamina, metilfenidato	Ausencia de interacciones importantes. Su consumo junto con metadona es un factor de riesgo de recaída en el consumo de heroína u otras sustancias como el alcohol o benzodiazepinas.
Nicotina	Inductor del CYP 1A2. Disminución del efecto de metadona en pacientes fumadores y posible aparición del síndrome de abstinencia.

5.4. Interacciones con alimentos y suplementos

Las tablas siguientes recogen los principales alimentos (incluidas bebidas) y suplementos descritos en la bibliografía que interaccionan o pueden interaccionar con metadona, ya que incrementan (**Tabla 9**) o disminuyen (**Tabla 10**) el efecto de ésta [1,5].

Tabla 9. Principales alimentos y suplementos que pueden incrementar el efecto de metadona.

Alimento/suplemento	Mecanismo de interacción
Pomelo	Inhibe el CYP 3A4 y la P-gp intestinal. Este efecto no ha sido demostrado en otras frutas.
Ajo	Inhibe la actividad del CYP 3A4.
Apiáceas (apio, perejil, zanahoria)	Disminuyen la actividad enzimática del CYP 1A2.
Suplementos naturales: uña de gato, manzanilla, <i>Echinacea angustifolia</i> , <i>Hydrastis canadensis</i>	Fuerte inhibición del CYP 3A4. No se ha estudiado específicamente con metadona.
Vino y otras bebidas de baja graduación	Puede inhibir la actividad del CYP 3A4, además de actuar como sustrato.

Tabla 10. Principales alimentos y suplementos que pueden disminuir el efecto de metadona.

Alimento/suplemento	Mecanismo de interacción
Suplementos de vitamina C	Aumentan la eliminación de metadona al disminuir el pH de la orina.
Brasicacias o crucíferas (col, coliflor, brócoli)	Incrementan la actividad del CYP 1A2.
Café	Determinados compuestos pueden inducir el CYP 3A4.
Suplementos naturales: <i>Hypericum perforatum</i>	Inductor del CYP 3A4.
Zumo de uva	Puede inducir la actividad del CYP 1A2.

5.5. Interacciones fisiológicas y fisiopatológicas

Otras interacciones a tener en cuenta son las inherentes a la propia fisiología del individuo (**Tabla 11**), así como las relacionadas con determinadas patologías (**Tabla 12**) [1,5].

Tabla 11. Interacciones fisiológicas de metadona.

Factor fisiológico	Mecanismo de interacción y efecto
Ciclo menstrual (4º día)	↓ concentraciones plasmáticas por aumento de AGP. Puede provocar la aparición de síntomas de abstinencia a opioides.
Edad (>65 años)	↑ concentraciones plasmáticas por disminución del aclaramiento de metadona. Puede provocar la aparición de efectos opioides tóxicos.
Embarazo	↓ concentraciones plasmáticas por inducción del citocromo P450. Puede provocar la aparición de síntomas de abstinencia a opioides, por lo que puede ser necesario dividir la dosis de metadona para administrarla dos veces al día.
Género	Ausencia de sintomatología. Interacción clínicamente no significativa.
Hematocrito elevado	↓ concentraciones plasmáticas por aumento del aclaramiento de metadona. Puede provocar la aparición de síntomas de abstinencia a opioides.
Obesidad	↓ concentraciones plasmáticas por aumento de AGP. Puede provocar la aparición de síntomas de abstinencia a opioides.

Tabla 12. Interacciones fisiopatológicas de metadona.

Factor fisiopatológico	Mecanismo de interacción y efecto
Cáncer	↓ concentraciones plasmáticas por aumento de AGP. Puede provocar la aparición de síntomas de abstinencia a opioides.
Hepatopatía	↑ concentraciones plasmáticas por disminución del metabolismo del citocromo P450. Puede provocar la aparición de efectos opioides tóxicos.
Quemaduras	↓ concentraciones plasmáticas por aumento de AGP. Puede provocar la aparición de síntomas de abstinencia a opioides.
Sepsis	↓ concentraciones plasmáticas por aumento de AGP. Puede provocar la aparición de síntomas de abstinencia a opioides.
Trasplantes	↓ concentraciones plasmáticas por aumento de AGP. Puede provocar la aparición de síntomas de abstinencia a opioides.

6. INDICACIONES Y RECOMENDACIONES TERAPÉUTICAS

Metadona está indicada en el tratamiento del síndrome de abstinencia a opioides, así como en el dolor intenso de cualquier etiología, incluyendo dolores post-operatorios, postraumáticos, neoplásicos, neuríticos o por quemaduras, siempre que no respondan a analgésicos menores [19].

En España, el clorhidrato de metadona se emplea en una variedad de formulaciones que permiten que metadona pueda ser administrada en varias formas farmacéuticas diferentes. La **Tabla 13** muestra los preparados farmacéuticos que actualmente están autorizados en España [36].

Tabla 13. Medicamentos autorizados en España que incluyen metadona.

Medicamento	Número de registro
Eptadone® 20 mg solución oral	69913
Eptadone® 100 mg solución oral	69909
Eptadone® 5 mg/ml solución oral	69910
Metasedin® 5 mg comprimidos	17129
Metasedin® 30 mg comprimidos	62422
Metasedin® 40 mg comprimidos	62423
Metasedin® inyectable	17128

En general, en la bibliografía internacional se hace referencia a la preparación oral líquida con más frecuencia que a la sólida. Probablemente, ello se deba a que, por un lado, con la forma líquida resulte más fácil administrar una amplia gama de dosificaciones y, por otro, a que al parecer sería menos susceptible de tráfico ilegal que la forma sólida [37].

No obstante, la administración de metadona por vía oral en forma sólida (comprimidos) es una alternativa útil, aunque requiere tener en cuenta ciertas consideraciones para su correcto uso, desde el punto de vista técnico. En este sentido, los comprimidos de 30 y 40 mg están ranurados para facilitar su fraccionamiento y permitir una gama más amplia de dosis mediante las diferentes combinaciones de comprimidos enteros y fraccionados. El laboratorio fabricante ofrece una tabla para facilitar la dosificación de Metasedin® (no incluida en la memoria) desde 15 mg hasta 150 mg, con incrementos de 5 mg, utilizando combinaciones de comprimidos enteros y fraccionados. Asimismo, explica que los comprimidos de 30 y 40 mg son solubles (se pueden administrar diluidos fácilmente en agua o zumos), mientras que los de 5 mg son poco solubles, por lo cual, al ponerlos en agua o zumos dejan el residuo de excipientes insolubles. La aparición de este residuo, sin embargo, no altera la dosis preparada [37].

6.1. Tratamiento del síndrome de abstinencia a opioides

Metadona reúne dos criterios importantes para ser utilizada en el manejo de la dependencia a opioides: una alta biodisponibilidad sistémica cuando se administra por vía oral y una larga semivida de eliminación tras alcanzar el estado estacionario (normalmente después de 4-6 días). Debido a su elevada actividad intrínseca y acción prolongada, suprime durante 16-36 horas el deseo incontrolable de consumir en individuos dependientes, permitiéndoles mejorar su funcionalidad. La ruta de administración oral evita el riesgo asociado a la administración parenteral, su larga semivida hace posible una única administración diaria y su acumulación en tejido corporal permite que, tras administraciones repetidas, se consigan concentraciones plasmáticas estables. Además, cuando se administra metadona durante la terapia de mantenimiento, no produce los marcados efectos narcóticos observados en opioides u opiáceos de acción corta como la heroína o la morfina [5].

6.1.1. Recomendaciones terapéuticas en el tratamiento del síndrome de abstinencia a opioides

La efectividad de la terapia de mantenimiento con metadona depende, en gran medida, de la dosis administrada, y por eso es importante una correcta dosificación durante el tratamiento. El proceso de inducción al tratamiento es especialmente relevante, porque presenta un riesgo de muerte que puede ser hasta siete veces superior al riesgo de antes de iniciar el tratamiento. Los pacientes que empiezan con una dosis de metadona demasiado alta pueden intoxicarse y morir, pero si la dosis es demasiado baja y el paciente presenta abstinencia, puede desembocar en el consumo de opioides ilegales (heroína) u otras sustancias (benzodiazepinas) para mejorar la sintomatología, y la mezcla de metadona con estas otras sustancias puede producirle también la intoxicación y la muerte. Sin embargo, en la fase de estabilización o mantenimiento tras las primeras dos semanas de tratamiento, el riesgo de muerte por sobredosis disminuye sustancialmente en comparación con el riesgo al inicio del tratamiento.

En el manual de práctica clínica para el tratamiento de mantenimiento con metadona de la Generalitat de Catalunya [37], se realizan las recomendaciones siguientes respecto a los procesos de inducción y mantenimiento:

a) Proceso de inducción

- En general, la dosis inicial debe estar entre los 10 y los 30 mg/día. Sin embargo, si la tolerancia a los opioides es alta se pueden utilizar dosis de entre 25 y 40 mg/día, y si la tolerancia es baja o dudosa se pueden utilizar dosis de 10 a 20 mg/día. Si la dosis inicial es baja (10 mg) después de unas horas (3-4 horas) se pueden añadir pequeñas dosis de metadona según la gravedad de los síntomas de abstinencia. No obstante, también se recomienda mantener al paciente en observación durante unas horas (2-3 horas) después de la primera dosis con el fin de observar si aparecen signos de intoxicación.
- Es aconsejable empezar la terapia de mantenimiento por la mañana, y si puede ser al inicio de la semana (si el centro está cerrado durante el fin de semana), para que cuando aparezcan las concentraciones de metadona más altas, el centro esté abierto y el personal pueda intervenir, en caso necesario.

- El paciente debe acudir cada día al centro para tomar la dosis de metadona hasta que se establezca la dosis de mantenimiento. Los incrementos de dosis de metadona hasta llegar a la estabilización deben ser de un máximo de 5 a 10 mg/día y sin pasar de 20 mg a la semana.

b) Dosis de mantenimiento

- El tiempo necesario para llegar a la estabilización puede ser de seis semanas o más.
- El rango terapéutico de referencia para metadona en plasma es de 400-600 ng/mL [38].
- Habitualmente, las dosis de mantenimiento se sitúan entre los 50 y los 120 mg/día, aunque hay personas que se pueden mantener con dosis inferiores, y otras que necesitan dosis superiores (hasta 1200 mg/día). No existe, por lo tanto, una dosis de metadona óptima para todos los pacientes. La dosis de mantenimiento adecuada de metadona es aquella que consigue prevenir el inicio del síndrome de abstinencia a opioides durante 24 horas, eliminar el deseo de consumo de heroína y bloquear sus efectos euforizantes.
- Con el fin de controlar el intervalo QT, deben realizarse electrocardiogramas periódicos si se utilizan dosis de metadona superiores a 200 mg/día, sobre todo si el paciente recibe tratamientos concomitantes (especialmente antirretrovirales y/o antipsicóticos).

6.2. Manejo del dolor

Como ya se ha comentado anteriormente, metadona posee un efecto analgésico muy potente gracias a su acción antagonista sobre los receptores NMDA, por lo que es un fármaco muy utilizado en pacientes con dolor crónico asociado a cáncer u otras morbilidades. En estos casos, y a diferencia de su utilización como tratamiento para la dependencia de opioides, suelen administrarse dosis entre 2.5 y 10 mg cada 6-8 horas o, incluso, cada 3-4 horas para conseguir un efecto analgésico. Estas dosis pueden llegar a incrementarse hasta 30 mg [39].

6.2.1. Recomendaciones terapéuticas en el manejo del dolor

a) Pacientes en terapia de mantenimiento con metadona

El dolor agudo o crónico en pacientes en terapia de mantenimiento, o con antecedentes de dependencia a drogas, a menudo no recibe una correcta evaluación ni tampoco un correcto enfoque terapéutico. Este hecho está relacionado con varios factores: existe la falsa creencia de que los pacientes en mantenimiento con metadona que presentan dolor ya reciben una analgesia suficiente y que no son necesarias otras medidas analgésicas. Sin embargo, estos pacientes presentan una tolerancia que les hace perder el efecto analgésico del fármaco. Además, hay estudios que detectan un umbral más bajo en la percepción y la tolerancia al dolor en dichos pacientes.

No existe un protocolo establecido para el manejo del dolor en estos pacientes, pero sí una serie de recomendaciones que hay que tener en cuenta a la hora de instaurar el tratamiento [40]:

- La dosis de metadona debe ser adecuada. Una dosis subóptima con la presencia de una mínima sintomatología de abstinencia hará muy difícil el manejo del dolor, y el incremento de las dosis de metadona no suele ser efectivo para conseguir el efecto analgésico. La utilización de dosis de metadona que produzcan un bloqueo completo de los receptores μ , habitualmente 80-120 mg/día o superiores, hará que, en caso de ser necesarios otros agonistas opioides, éstos no presenten el efecto euforizante que los caracteriza.
- Debido a la tolerancia a los opioides y al umbral más bajo en la percepción del dolor, en caso de ser necesaria la utilización de otros opiáceos u opioides, éstos a menudo deberán utilizarse a dosis más elevadas que las habituales. Si hay que utilizar otros opiáceos u opioides como analgésicos, son de elección los que sean agonistas μ puros (cloruro mórfico, morfina, fentanilo), ya que no generan la necesidad de incrementar la dosis de metadona cuando son retirados.
- Está contraindicada la utilización de fármacos con efecto antagónico μ (pentazocina, buprenorfina, tramadol, naloxona), ya que pueden provocar sintomatología de abstinencia. También debe evitarse el uso de meperidina y propoxifeno, ya que se necesitan dosis muy elevadas para conseguir analgesia, con el consiguiente riesgo de producirse efectos secundarios graves.

- Hay que valorar la posibilidad de utilizar fármacos no opiáceos u opioides, como antiinflamatorios no esteroideos, antidepresivos tricíclicos, antiepilépticos, corticoides y anestésicos locales. Los antidepresivos tricíclicos y antiepilépticos como la gabapentina son de gran utilidad en el manejo del dolor de origen neuropático. Estos fármacos deben utilizarse a las mismas dosis y con las mismas pautas que se utilizan en los pacientes sin dependencia a opioides. En caso de existir alguna patología psiquiátrica, el correcto enfoque facilitará el tratamiento del dolor (por ejemplo, la ansiedad a menudo acompaña al dolor en estos pacientes, por lo que su correcto tratamiento mejorará el manejo del dolor).

b) Pacientes adictos a opioides que no estén en terapia de mantenimiento con metadona

Para el tratamiento del dolor en esta población, hay que tener en cuenta su situación, diferenciando entre si se trata de pacientes con o sin dependencia activa a opioides o bien pacientes en tratamiento con antagonistas opioides [37]. De acuerdo con cada situación, se realizan las siguientes recomendaciones:

- Pacientes sin dependencia activa: es preferible evitar la utilización de opioides y, en caso de ser necesario, utilizar inicialmente fármacos con efecto agonista parcial, como buprenorfina o pentazocina, sin olvidar que un mal control del dolor puede conducir a una recaída en la adicción.
- Pacientes en tratamiento con antagonistas opioides, como la naltrexona: está contraindicado el uso de opioides y habrá que recurrir a otras alternativas terapéuticas. Si éstas no tuvieran éxito y fuera necesario el uso de opioides, debe retirarse la naltrexona y esperar 2-3 días antes de utilizarlos.
- Pacientes con dependencia activa: para estos pacientes, el contacto con el medio sanitario por un síntoma como el dolor, puede ser una buena oportunidad para ofrecer un tratamiento de su dependencia con metadona, con el apoyo analgésico necesario, a fin de mejorar la situación del paciente.

c) Pacientes con dolor crónico no oncológico

La última revisión sistemática realizada para evaluar la eficacia analgésica y seguridad de metadona en el tratamiento del dolor crónico no oncológico [41] destaca la falta de evidencias para determinar tanto la eficacia analgésica como la seguridad de metadona en este tipo de pacientes. De acuerdo con los criterios de inclusión empleados, ninguno de los tres estudios analizados, en los que participaron un total de 181 participantes, abordaban adecuadamente las cuestiones de seguridad, tales como depresión respiratoria, arritmias cardíacas o adicción. Tampoco permiten sacar conclusiones con respecto a las mejoras en la calidad de vida o el funcionamiento del paciente ni presentan datos que contribuyan a la evaluación de las posibles ventajas de metadona en el tratamiento del dolor crónico no oncológico.

d) Pacientes con dolor crónico oncológico

El dolor es un síntoma común y debilitante de la enfermedad del cáncer, el cual puede ser tratado con metadona por vía oral en forma líquida o comprimidos, por vía rectal mediante supositorios, o por la vía parenteral (intravenosa, intramuscular o subcutánea) [42].

La eficacia analgésica y seguridad de metadona en el tratamiento del dolor crónico oncológico se evaluó en otra revisión sistemática [42]. De acuerdo con los criterios de inclusión empleados en ésta, se analizaron 8 estudios en los que participaron un total de 388 pacientes. La revisión contiene nuevos datos que apoyan que metadona tiene una eficacia analgésica similar a la morfina en el tratamiento del dolor oncológico en general y también en el tratamiento del dolor neuropático relacionado con el cáncer. En cuanto a la seguridad, el perfil de efectos secundarios de metadona y morfina también fue similar, aunque estos efectos secundarios podrían llegar a ser más importantes con dosis repetidas de fármaco. En este sentido, se observó que tras la administración de metadona durante los primeros días de tratamiento, ésta parece acumularse en el organismo, retrasando la aparición de efectos adversos hasta aproximadamente 28 días después de iniciar el tratamiento. Esta observación refuerza el consejo de que los médicos experimentados deben asumir la responsabilidad total del inicio del tratamiento y llevar a cabo un cuidadoso ajuste de la dosis y monitorización de metadona.

7. PROGRAMAS DE MANTENIMIENTO CON METADONA

La dependencia a la heroína es un síndrome crónico y recurrente que está fuertemente asociado a una alteración de la conducta y a la delincuencia. Los programas de sustitución de opioides con supervisión médica surgieron de la necesidad de minimizar los daños asociados al consumo de heroína tras el fracaso de las sanciones criminales, la desintoxicación y la psicoterapia en el manejo de este problema. En las últimas dos décadas se ha utilizado buprenorfina, agonista parcial de los receptores μ , como tratamiento de mantenimiento para la adicción a la heroína, e incluso ha habido un resurgimiento del interés en la prescripción médica de heroína con el mismo propósito. También se dispone de una combinación de buprenorfina y naloxona, autorizada en 2008 e incluida en el sistema público de salud en 2010. Sin embargo, el régimen más ampliamente aceptado a nivel internacional desde la década de los años 60 es la terapia de mantenimiento con metadona, suministrada por vía oral [43,44].

7.1. Antecedentes históricos y epidemiología

Los PMM fueron desarrollados inicialmente en 1964 por un equipo de investigación de la Universidad Rockefeller de Nueva York, constituido por los doctores Dole, Nyswander y Kreek. Dichos programas surgieron tras la Segunda Guerra Mundial (1939-1945) con el objetivo de tratar la adicción a la heroína, en respuesta al aumento desorbitado del consumo y muertes relacionadas con esta droga que tuvo lugar a finales de 1950 y comienzos de 1960 en Nueva York [2,45].

En España, la “epidemia” de consumo problemático de heroína comenzó una década más tarde, a finales de 1970, y alcanzó su incidencia máxima en 1980 [46]. La transición política de la dictadura hacia la democracia jugó un papel importante en la aparición de dicha “epidemia”, dejando paso a un gran vacío cultural en la sociedad española [47]. Ello coincidió con la llegada del movimiento psicodélico y la generación “hippie” desde los países en que se iniciaron a finales de los años 60, que tuvo un efecto de llamada de atención muy notable en la población española. En este contexto de transición política, la falta de normas y la incapacidad de la estructura democrática para dotar a la sociedad de nuevos contenidos culturales propició indirectamente el desarrollo y expansión del consumo de sustancias psicotrópicas [48]. La reaparición de

la heroína se verificó con gran rapidez y supuso notables cambios en los estratos socio-culturales consumidores. Al principio, la adquisición del producto era difícil y costosa, pues todavía no existía un mercado negro callejero bien abastecido y articulado. Su empleo, por tanto, resultaba minoritario, y se reducía a determinados círculos más o menos selectos. De hecho, casi todos los usuarios pertenecían a familias bastante tolerantes y que gozaban de una educación y un nivel cultural elevado [49]. Pero rápidamente aparecieron lugares y vías para obtener de forma permanente esta droga, lo cual exportó la adicción a zonas pobres y conflictivas, convirtiendo los suburbios miserables en un problema de inseguridad ciudadana [50].

A lo largo de los ochenta y principios de los noventa el consumo de heroína ocasionó en España un gran aumento de la mortalidad juvenil, la demanda de atención sanitaria y la delincuencia contra la propiedad, generando una intensa alarma social [51]. Al incremento de la mortalidad contribuyó la rápida expansión de la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) asociada a la inyección de la droga por vía intravenosa, que comenzó en los años 80 y alcanzó su máxima incidencia entre 1985 y 1987, con aproximadamente 14500 infecciones anuales (**Fig. 1**) [52].

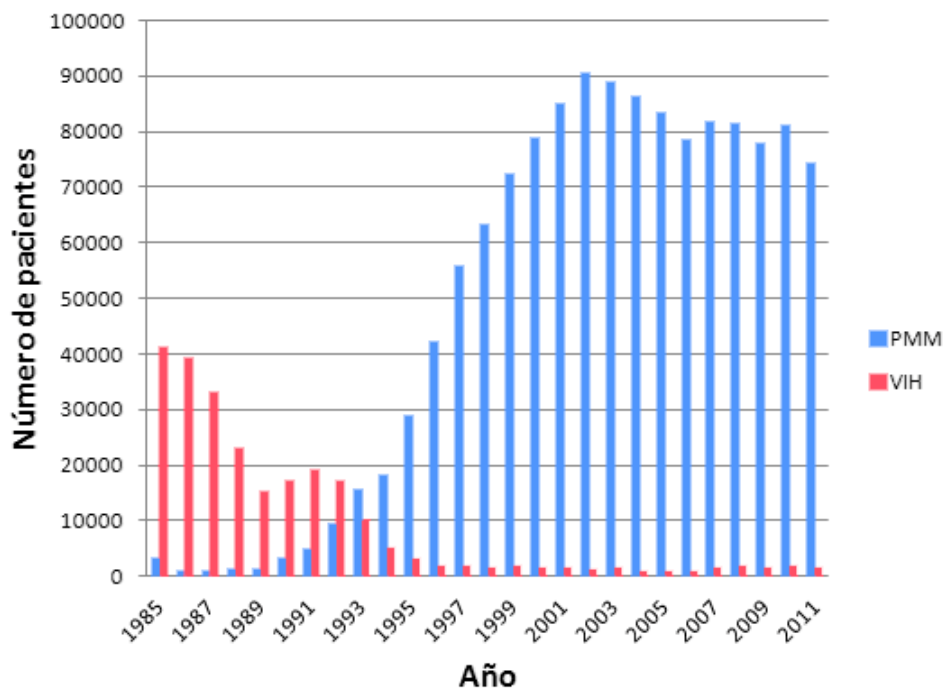


Figura 1. Pacientes en programas de mantenimiento con metadona (PMM) y nuevos casos de infección por VIH en usuarios de drogas por vía parenteral en España (1985-2011).

Las respuestas para aminorar y controlar los problemas no llegaron hasta 1985, cuando se creó el Plan Nacional Sobre Drogas (PNSD) [53], que contribuyó a estructurar una red de atención a estos problemas. No obstante, las estrictas leyes españolas [54-56] limitaban por aquel entonces el acceso de la población adicta al tratamiento. Metadona, único agonista opioide que podía ser empleado en el tratamiento de la dependencia a heroína, debía ser prescrita exclusivamente en centros de tratamiento autorizados por las Comunidades Autónomas. Los centros dispensadores de metadona eran escasos y las listas de espera de más de 12 meses. Efectivamente, la normativa con respecto a los PMM era tan restrictiva que en 1987 únicamente 1000 pacientes permanecían en tratamiento (**Fig. 1**) [57]. Sin embargo, con las nuevas leyes de 1990 y 1996 [58-60], el tratamiento de la dependencia a la heroína cambió. Los centros de salud empezaron a distribuir de forma gratuita metadona en forma de jarabe a los pacientes diagnosticados como heroínómanos, entonces el único requerimiento para ser admitido en los programas. A partir de 1992, los PMM se desarrollaron ampliamente, aunque de forma desigual según las Comunidades Autónomas [61]. El número de pacientes admitidos a tratamiento comenzó a incrementarse notablemente en la década de los años 90 hasta 2002, momento en que las cifras empezaron a estabilizarse (**Fig. 1**). De hecho, según los indicadores utilizados por el Observatorio Español sobre Drogas (OED), el número de usuarios atendidos en PMM pasó de los 3043 en 1990 a los 90488 en 2002 [62], incrementándose en casi un 3000%.

No obstante, la puesta en marcha de estas medidas llegó después de que lo peor ya hubiese pasado. El mayor impacto de mortalidad por sobredosis se produjo en 1991-1992 con más de 1.700 muertes anuales, en más del 90% de las cuales estaba implicada la inyección de heroína [61]. Por otro lado, los nuevos diagnósticos de síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) ligados a inyección de drogas alcanzaron su máximo en 1993-1995 con más de 3500 casos anuales, lo que llevó a España a convertirse en el país europeo con más casos de SIDA asociados al uso de drogas por vía intravenosa. A pesar de ello, la aparición del SIDA y la presencia en el mercado de los diferentes tipos de heroína modificó las pautas de consumo, y se pasó de un consumo mayoritario por vía intravenosa a su uso mayoritario por vía fumada [63]. Ello contribuyó a que en 1994 comenzaran a disminuir progresivamente las muertes por sobredosis relacionadas con heroína, y poco después los diagnósticos de SIDA en

usuarios de drogas por vía intravenosa, aunque la incidencia de VIH ligada a inyección había comenzado a disminuir mucho antes, a mediados de los ochenta (**Fig. 1**) [61].

Los PMM y los programas de intercambio de jeringas (PIJ), que se extendieron a partir de mediados de los noventa, reforzaron la evolución positiva de estos problemas, y en la actualidad se ha mejorado y extendido ostensiblemente la oferta de tratamientos para la persona adicta, que contemplan la asistencia ambulatoria, el eventual ingreso hospitalario para desintoxicación, las comunidades terapéuticas y el trabajo de reinserción social a través de formación profesional orientada al empleo, compensación escolar y asesoría legal [53].

La población que inicia ahora el consumo de heroína suele ser policonsumidora de muchas otras sustancias y su perfil no tiene nada que ver con aquel otro de marginalidad, delincuencia, desarraigo socio-familiar, fracaso escolar de larga duración y en el límite de la exclusión social que caracterizó a la de los años 80. De hecho, el mayor problema para el policonsumidor son la cocaína y el alcohol, dejando la heroína en términos más residuales [53]. No obstante, pese a que recientemente se ha observado que los policonsumidores de cocaína y heroína tienen una tasa de mortalidad 14.3 veces mayor que la población [64], las admisiones a tratamiento por heroína han descendido de forma importante en los últimos años. Un ejemplo de ello es que en 2005, la heroína dejó de ser la droga que motivaba un mayor número de admisiones a tratamiento para ceder su puesto a la cocaína [53].

La heroína es todavía un problema de salud pública, pero según el informe de 2011 del OED pocos jóvenes caen ya “en sus redes”. Menos aún se la inyectan. Un ejemplo: en 1992, más de 20000 personas fueron tratadas por primera vez en su vida por una dependencia a esta sustancia; en 2009, apenas 3500, y de ellas, sólo el 14.5% utilizaba la vía intravenosa. La gran mayoría fumaba. En 1992 se registraron 544 muertes por sobredosis de heroína; en 2009, 228. [62].

Es importante señalar que el consumo de heroína en EE UU creció un 80% entre 2007 y 2012, así como las muertes por sobredosis (entre los años 2006 y 2010 murieron 3038 personas). El abaratamiento de la droga podría explicar el nuevo auge del consumo de heroína en la nación, así como el parón en el suministro de opioides por

parte de los sanitarios y el encarecimiento de estos medicamentos (un frasco de oxiconona o vicodina cuesta cerca de 120 euros) [65]. En España, los opioides y tranquilizantes ni se recetan ni se consumen tanto como en EE UU y están mucho más regulados. En cuanto a la heroína, la opinión es contradictoria. Algunos expertos consideran que la demanda en España está estabilizada y un repunte sería poco probable, puesto que es una droga que no está bien vista por su vinculación a la marginalidad y la delincuencia [66]. Varios especialistas en desintoxicación, sin embargo, apuntan a que unos 6000 españoles habrían comenzado a consumirla en los últimos tres años [67]. De hecho, en 2013 el valor de la heroína prácticamente se duplicó en España, incremento que podría estar asociado a un aumento en el consumo de esta sustancia, no sólo en zonas marginales sino también en otras esferas sociales. Esta realidad ha sido relacionada con la crisis económica y las bolsas de desempleo, a lo que contribuye el hecho de que la heroína sea, pese al incremento de su precio, actualmente más barata que la cocaína [68].

Los efectos de la presente crisis económica son impredecibles. En el momento actual, el tratamiento con metadona sigue siendo financiado por el gobierno español, pero el agravamiento de la crisis podría resultar en una disminución de la financiación pública y un cambio en las tendencias epidemiológicas del uso de opioides por vía parenteral.

7.2. Características de los programas de mantenimiento con metadona

Los objetivos de los PMM son tratar como pacientes a las personas que sufren dependencia a los opioides y considerar el tratamiento con metadona igual que cualquier otro tratamiento farmacoterapéutico, con el fin de normalizar la situación del paciente, desde un punto de vista sanitario y social [34]. Basados en una filosofía de reducción de daños asociados al consumo de drogas, los PMM son actualmente los tratamientos más utilizados en la adicción a opioides y los que dan mejores resultados [37]. Además de ser tratamientos efectivos, bien establecidos y rentables para la dependencia a opioides, permiten al paciente recuperar la normalidad en su funcionamiento fisiológico, psicológico y social. Cada paciente debe ser evaluado, tratado y controlado de forma individual. Algunos pacientes pueden permanecer en PMM toda la vida, mientras que otros pueden llegar a ser capaces de obtener el alta y mantener la abstinencia. El éxito

de los PMM reside en el conocimiento, la experiencia, la vigilancia y la diligencia por parte del equipo médico, del paciente y de todas las personas involucradas en el tratamiento [69].

El desarrollo y expansión de los PMM ha generado un aumento progresivo en la cobertura de los mismos, pasando de un 21% en 1996 a un 43% en 1999, y alcanzando el 60% en 2010 [70]. Gracias a ello, España es en la actualidad uno de los países con mayor porcentaje de cobertura a pacientes drogodependientes del mundo [71].

Los PMM ofrecen beneficios importantes, no solamente para la persona afectada, sino también para la salud pública. En este sentido, han demostrado su eficacia en un amplio número de estudios, ya que:

- Conllevan un elevado porcentaje de retención de los pacientes [72,73].
- Eliminan o reducen el consumo de opioides ilegales [72].
- Reducen el riesgo de adquirir y transmitir enfermedades como el SIDA, la hepatitis B o C, infecciones bacterianas, endocarditis, infecciones de tejidos blandos, tromboflebitis, tuberculosis o enfermedades de transmisión sexual debido a la vía de administración [70,74,75].
- Disminuyen las actividades ilícitas y conductas delictivas en relación con la adquisición de estupefacientes ilegales [75].
- Reducen la tasa de mortalidad en personas dependientes de opioides y también el riesgo de sufrir sobredosis [76].
- Mejoran la calidad de vida de los pacientes, de forma directa en su salud e indirecta en relación a la estabilidad familiar o laboral [77].

Metadona está disponible en toda la geografía española, principalmente en el sistema público de salud (de forma totalmente gratuita) y también en centros privados. La distribución y organización de los centros con PMM difiere según la región, y pueden clasificarse de acuerdo con su actividad: centros prescriptores y dispensadores, sólo prescriptores, o sólo dispensadores. Los centros prescriptores y dispensadores realizan una serie de actividades relacionadas con el tratamiento, desde la prescripción de metadona al ajuste de la dosis y la duración del tratamiento, realización de análisis de orina periódicos, prestación de servicios de asesoramiento y dispensación del medicamento. Los centros que solamente prescriben metadona realizan también todas

las actividades anteriormente mencionadas excepto la dispensación, mientras que los centros que sólo dispensan no hacen otra cosa que proporcionar a los pacientes la dosis prescrita de metadona. Metadona puede dispensarse en centros de atención a las drogodependencias, centros de atención primaria, centros de salud mental, prisiones y farmacias [53,57].

En España, los PMM se caracterizan por los siguientes puntos [37]:

- i. El diagnóstico de la dependencia de opioides es el único requisito legal para la inclusión en un PMM.
- ii. La dosis de metadona será individualizada según la evolución clínica del paciente, sin ningún límite máximo.
- iii. El tratamiento durará tanto como sea necesario, siendo recomendable el tratamiento a largo plazo.
- iv. El paciente podrá acudir diariamente al centro para tomar la metadona o podrá recibir el frasco con las dosis de medicación para consumirla en casa, siendo este último caso más recomendable, aunque la decisión se tomará de forma individual.
- v. En la mayoría de los centros, la violencia, el consumo y el tráfico en el propio centro son los únicos criterios para el alta forzosa, en cuyo caso el personal del centro hará esfuerzos para transferir al paciente a otro centro para la continuación del tratamiento.
- vi. La suspensión del tratamiento se decidirá por mutuo acuerdo entre los miembros del equipo del centro y el paciente, en función de las consideraciones personales y sociales y los parámetros clínicos correspondientes.

Por último, es necesario destacar que la prevención de la propagación de la infección por el VIH requiere, además de los PMM, de otras estrategias de reducción de daños, como el establecimiento de PIJ y de centros de inyección supervisados, la distribución gratuita de preservativos y la provisión de tratamiento antirretroviral de gran actividad (TARGA) para reducir la carga viral en personas con VIH, y por lo tanto el riesgo de transmisión viral. El TARGA está al alcance de todas las personas con VIH en España desde finales de 1996 de forma gratuita, y su uso se ha asociado con una reducción en la progresión hacia el SIDA y en la mortalidad relacionada con dicha enfermedad [76,78].

7.3. Otros

Buprenorfina

Buprenorfina es un agonista parcial de los receptores opioides μ con débiles efectos agonistas parciales sobre los receptores opioides δ y κ . En el tratamiento de la dependencia a opioides, buprenorfina se administra por vía sublingual en forma de comprimidos [79].

La literatura sobre la evaluación de la seguridad de la terapia de mantenimiento con buprenorfina está menos desarrollada que en el caso de metadona, aunque resultados de ensayos clínicos en fase III indican que es bastante seguro, con efectos adversos equivalentes a los generados por metadona [80,81]. Igual que sucede con metadona, buprenorfina alivia los síntomas del síndrome de abstinencia y el deseo por consumir, y favorece el establecimiento de conductas saludables por parte de los pacientes en tratamiento [79].

Naloxona

Naloxona es un antagonista de los receptores opioides μ . Cuando se administra por vía oral o sublingual, en las dosis habituales, a pacientes que sufren síndrome de abstinencia a opioides, naloxona presenta un efecto farmacoterapéutico pequeño o nulo por su metabolismo de primer paso casi completo. Sin embargo, cuando se administra por vía intravenosa a personas dependientes de los opioides, la presencia de naloxona produce unos marcados efectos antagonistas de los opioides y precipita la aparición del síndrome de abstinencia de los opioides, mediante los cuales se disuade del abuso por vía intravenosa. Por ello, el uso de naloxona por vía intravenosa se reserva a situaciones de intoxicación por opioides, así como para comprobar la eficacia de la desintoxicación [53].

La combinación buprenorfina/naloxona administrada por vía sublingual busca reducir el potencial de abuso de la buprenorfina. La naloxona, al absorberse por vía sublingual sólo en pequeñas cantidades, no puede precipitar en un síndrome de abstinencia, aunque sí prevenir de un posible abuso de buprenorfina por vía intravenosa, por lo que sí produciría su efecto antagonista opiáceo [79].

Naltrexona

Naltrexona es un antagonista de los receptores opioides μ y κ . En el tratamiento de la adicción a los opiáceos, naltrexona se administra por vía oral en forma de comprimidos o por vía intramuscular mediante formulaciones de liberación prolongada [79].

El uso de la naltrexona en el tratamiento de la adicción a los opiáceos es mecanísticamente muy diferente de los de metadona y buprenorfina. Cuando las concentraciones de naltrexona alcanzan el estado de equilibrio estacionario tras su administración oral, el medicamento es capaz de ocupar aproximadamente el 95% de los receptores opioides μ . A diferencia de metadona y buprenorfina, naltrexona no posee actividad opioide intrínseca, por lo que el riesgo de abuso por parte del paciente es mínimo [79].

Finalmente, conviene recordar que los sujetos en PMM no continúan en tratamiento con metadona de forma indefinida, sino que se procura hacer el cambio de tratamiento de metadona a naltrexona. Previamente al inicio de la terapia con naltrexona debe haber transcurrido un período de 7-10 días de abstinencia a estupefacientes (que tiene que ser verificado por análisis de orina). En este sentido, no debe iniciarse la administración de naltrexona sin haberse realizado previamente un test de naloxona con resultado negativo. El test de naloxona consiste en administrar por vía subcutánea 0.8 mg de naloxona. Si el resultado del test es negativo (no aparecen signos ni síntomas de abstinencia a opiáceos) se puede comenzar la terapia de inducción, que se inicia con dosis bajas de naltrexona, las cuales se incrementan de forma progresiva a razón de 25-50 mg/día hasta alcanzar la dosis de mantenimiento, de aproximadamente 350 mg/semana [53].

8. MONITORIZACIÓN TERAPÉUTICA DE METADONA

La monitorización terapéutica de un fármaco consiste en la determinación periódica de la concentración plasmática, con la finalidad de mejorar la eficacia y seguridad del tratamiento en cada paciente. La monitorización es útil cuando se sospecha de una falta de adherencia al tratamiento, una falta de respuesta a dosis terapéuticas o una interacción farmacocinética que afecta al fármaco. Sin embargo, los beneficios potenciales de la monitorización terapéutica para la optimización de la farmacoterapia sólo pueden obtenerse si el método se integra adecuadamente en la práctica clínica [38].

A continuación se resumen las indicaciones típicas para la monitorización terapéutica de un fármaco a través de la determinación de sus concentraciones plasmáticas (**Tabla 14**) [38].

Tabla 14. Indicaciones para realizar la monitorización terapéutica de un fármaco.

- Optimización de la dosis tras la prescripción inicial o tras un cambio de dosificación.
 - Fármacos en los que la monitorización es obligatoria por razones de seguridad (por ejemplo, litio).
 - Sospecha de falta de adherencia al tratamiento.
 - Falta de mejoría clínica bajo tratamiento con dosis recomendadas.
 - Presencia de efectos adversos y mejoría clínica bajo tratamiento con dosis recomendadas.
 - Combinación del tratamiento con un fármaco conocido por su potencial de interacción o sospecha de interacción farmacoterapéutica.
 - Monitorización terapéutica en programas de farmacovigilancia.
 - Prevención de recaídas durante el tratamiento de mantenimiento.
 - Paciente recurrente bajo dosis adecuadas.
 - Presencia de particularidades genéticas en relación con el metabolismo del fármaco (deficiencia genética, multiplicación genética).
 - Paciente embarazada o lactante.
 - Paciente pediátrico o adolescente
 - Paciente de edad avanzada (> 65 años).
 - Paciente con discapacidad intelectual.
 - Paciente con comorbilidades farmacocinéticamente relevantes (insuficiencia hepática o renal, enfermedad cardiovascular).
 - Paciente forense.
 - Aparición de problemas tras cambiar un medicamento original por un medicamento genérico (y viceversa).
-

8.1. Fases de la monitorización terapéutica

La monitorización terapéutica es una actividad multidisciplinar y se compone de tres fases: pre-analítica, analítica y post-analítica. En la fase pre-analítica, es necesario adquirir muestras biológicas válidas, esto es, recogidas en momentos específicos en las que se prevea una buena determinación del fármaco que se quiere estudiar. La fase analítica consta del desarrollo y validación del método analítico, evaluando también posibles sustancias interferentes. Finalmente, el objetivo de la fase post-analítica es la elaboración de un informe farmacoterapéutico que deberá incluir una interpretación correcta de los resultados obtenidos en la fase analítica, así como todo el asesoramiento posible con respecto al tratamiento. Llegados a este punto, una interpretación farmacocinética adecuada evitará costes innecesarios y conducirá a la obtención de beneficios clínicos [82].

8.1.1. Fase pre-analítica

Recogida de muestras

Las concentraciones de fármaco en sangre varían a lo largo del intervalo de dosificación, por lo que, para permitir una interpretación apropiada de los resultados, deben conocerse tanto el tiempo de toma de muestras como el tiempo de administración del fármaco [82].

Generalmente, la monitorización terapéutica se lleva a cabo en muestras de plasma o suero. Pese a que no hay consenso sobre si es preferible utilizar unas u otras, las pocas comparaciones disponibles indican que los valores obtenidos a partir de suero o plasma se pueden utilizar indistintamente.

Las muestras de sangre deben recogerse una vez que la concentración de fármaco ha alcanzado el estado de equilibrio estacionario, por lo menos después de, al menos, 5 semividas de eliminación tras el inicio del tratamiento o un cambio de dosis, y especialmente para fármacos con una semivida de eliminación larga, como metadona. Además, para reducir el número de pruebas inapropiadas y redundantes, existe un

intervalo de tiempo óptimo para la toma de muestras de sangre, el cual depende de la semivida del fármaco.

La monitorización suele depender habitualmente de las concentraciones plasmáticas basales en estado estacionario, también llamadas concentraciones “valle”. Este tipo de muestras son las utilizadas cuando se sospecha de una falta de eficacia en el tratamiento. Para obtener unos niveles basales representativos, la muestra sanguínea debe extraerse durante la fase de eliminación terminal (fase β), en general inmediatamente antes de la administración de la siguiente dosis. Sin embargo, la determinación de una única concentración plasmática es a menudo insuficiente para la resolución de problemas, por lo que se puede requerir la realización de una serie de determinaciones a intervalos apropiados para aclarar, por ejemplo, si una concentración plasmática baja se debe a una falta de cumplimiento, a una reducción en la biodisponibilidad del fármaco o a una eliminación anormalmente rápida.

En el caso de observar efectos adversos inesperados (sospecha de toxicidad), es preferible realizar la monitorización a partir de muestras extraídas en el momento en el que se prevee que la concentración de fármaco es máxima, también denominadas muestras “pico” [82].

Otra alternativa es recoger una muestra plasmática al azar durante el intervalo de dosificación y estimar la concentración basal o “valle” o la disposición total del fármaco usando un modelo farmacocinético poblacional [82].

Conservación y transporte de muestras

En general, las muestras para monitorización de fármacos deben ser analizadas lo más rápidamente posible. De lo contrario, deben conservarse refrigeradas o congeladas, a la espera de su transporte y/o procesamiento. En este sentido, es necesario manipular el suero o plasma antes de proceder a la congelación, ya que no es posible obtener suero o plasma a partir de sangre congelada porque los eritrocitos se hemolizan [38].

8.1.2. Fase analítica

Análisis en laboratorio

Para el buen desarrollo de la monitorización terapéutica de un fármaco, es esencial disponer de métodos analíticos selectivos y sensibles para la evaluación cuantitativa, los cuales deben ser convenientemente validados. La validación establece pruebas documentales que demuestran que un método analítico utilizado para la determinación cuantitativa de un analito en una matriz biológica dada es fiable y reproducible para su uso previsto. Los parámetros fundamentales para esta validación están establecidos en las guías de validación de métodos bioanalíticos [83-85] e incluyen: (1) selectividad; (2) linealidad y rango de calibración; (3) efecto de la dilución; (4) exactitud y precisión; (5) recuperación, y (6) estabilidad. La aceptabilidad de los resultados obtenidos en los análisis se corresponde directamente con los criterios utilizados para validar el método. Para fármacos psicoactivos, es preferible la utilización de técnicas cromatográficas como la cromatografía de gases (GC) o la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC), en combinación con métodos de detección adecuados. Estas técnicas son suficientemente precisas, exactas y robustas y se pueden adaptar al análisis de un gran número de fármacos. La principal desventaja de la GC, sin embargo, es la necesidad de derivatización del analito para asegurar su volatilidad antes de proceder a la separación cromatográfica. En cambio, los métodos HPLC ofrecen una gran versatilidad, sensibilidad y especificidad en la monitorización terapéutica de fármacos, y además suelen requerir de una mínima preparación de la muestra previa al análisis, por lo que se consideran una alternativa práctica a la GC [38,82].

8.1.3. Fase post-analítica

Interpretación de resultados

Los informes farmacoterapéuticos elaborados deben incluir una correcta interpretación de los resultados y proporcionar asesoramiento basado en la mejor evidencia científica disponible. Para la interpretación de los resultados, es necesario disponer del diagnóstico/s del paciente y de la dosis de toda la medicación que toma. Además, no sólo debe considerarse si la concentración plasmática del fármaco se

encuentra dentro la franja terapéutica, sino también si ésta se corresponde con la dosis y si la dosis diaria de fármaco se administra en una o varias tomas. Para dilucidar si un resultado es o no plausible, a menudo es necesario tener en cuenta las propiedades farmacocinéticas de todos los medicamentos que toma el paciente, incluyendo las rutas metabólicas, enzimas implicadas y propiedades inductoras o inhibidoras, para así valorar las posibles interacciones entre medicamentos. Por otra parte, se debe controlar si la recogida de muestras se ha realizado en las condiciones establecidas, especialmente cuando las concentraciones plasmáticas obtenidas son inesperadamente altas en un paciente ambulatorio [38].

Cualquier concentración de analito fuera de su rango de referencia relacionado con la dosis debe alertar de una posible disposición farmacocinética distinta a la de la media poblacional, provocada a su vez por interacciones farmacoterapéuticas, polimorfismos en genes que dan lugar a un metabolismo lento o ultrarrápido, alteraciones en órganos eliminadores (hígado, riñones), cambios asociados a la edad o a comorbilidades, problemas de adherencia al tratamiento, un estado no estacionario e incluso interferencias de productos naturales o alimentos que el paciente puede no haber comunicado al médico (por ejemplo, *Hypericum perforatum* o zumo de pomelo). En ocasiones, puede ser necesaria la toma de muestras adicionales transcurrido cierto tiempo, ya que en caso de concentraciones plasmáticas inusuales, la repetición de los análisis puede ayudar a determinar si el paciente es inconstante en cuanto a la adherencia (toma el fármaco de forma irregular), o si su estatus metabolizador está alterado [38].

Comunicación de resultados

La comunicación de las concentraciones de fármaco, así como las de los metabolitos activos que contribuyen al efecto terapéutico, debe ir acompañada de los límites de la franja terapéutica. Cuando las concentraciones de fármaco son inferiores al límite de cuantificación (concentración más baja de la curva de calibrado que se puede determinar con un valor máximo de inexactitud e imprecisión del 20%) no tienen la fiabilidad analítica necesaria para poderlos considerar. Para un servicio de monitorización efectivo, los resultados deben estar disponibles para la toma de decisiones en un plazo razonable de 48 h [38].

8.2. Utilización de las concentraciones plasmáticas de metadona para su monitorización

En la mayoría de situaciones en las que se utiliza la monitorización terapéutica para la optimización de la dosis, el fármaco se administra en una serie de dosis repetidas para lograr una concentración plasmática en estado estacionario, dentro de una franja terapéutica de referencia definida. El estado de equilibrio estacionario se alcanza cuando la cantidad de fármaco eliminada durante un intervalo de dosificación es igual a la dosis administrada, es decir, la velocidad de entrada de fármaco al organismo se iguala a la velocidad de salida y se obtienen valores de concentraciones plasmáticas “constantes”. El tiempo en alcanzarse el estado estacionario depende del valor de la semivida de eliminación del fármaco ($t_{1/2}$), y es independiente de la dosis y de la forma de administración utilizada. En un régimen de dosis múltiples y utilizando una dosis de mantenimiento, el 94% del estado estacionario se alcanza después de 4 semividas de eliminación, el 97% después 5 semividas y el 100% generalmente se alcanza al cabo de 6-7 semividas [38].

En el caso de metadona, la monitorización terapéutica es recomendable para realizar ajustes en la dosis, así como en indicaciones especiales o resolución de problemas, ya sea porque el paciente presenta signos de intoxicación o de abstinencia [38]. Sin embargo, hasta ahora no hay medidas objetivas que permitan decidir cuál es la dosis más adecuada de metadona para cada paciente [86]. En este sentido, la determinación de las concentraciones plasmáticas de metadona se constituye en la medida más estudiada [37].

Según varios estudios publicados [87-89], no se ha descrito una buena correlación entre una determinada concentración de metadona y la respuesta terapéutica. Por otra parte, en ausencia de interacciones farmacoterapéuticas, la correlación entre la dosis de metadona administrada y la concentración plasmática es buena, por lo que la monitorización de las concentraciones de metadona puede ser útil para evaluar el cumplimiento del tratamiento, comprobar si el paciente toma dosis extra de metadona o si, por el contrario, toma menos dosis de la pauta [88]. Con todo, preguntar al paciente su opinión sobre la dosis de metadona que se le administra es, hoy por hoy, una posible manera de adecuar la dosis de mantenimiento [37].

8.3. Saliva como matriz biológica en la monitorización terapéutica de metadona

Pese a que la matriz biológica de referencia para realizar la monitorización terapéutica de metadona es el plasma, en los últimos tiempos han surgido otras matrices biológicas alternativas con el mismo propósito, como la saliva, la orina o el sudor. Entre ellas, la saliva se considera una matriz prometedora, debido a su facilidad de obtención y su supuesta representación de la fracción libre de metadona en plasma [90].

Igual que para metadona, la matriz salival se ha estudiado como alternativa al plasma para la monitorización de muchos otros fármacos. En la tabla siguiente (**Tabla 15**) se listan los principales fármacos más ampliamente analizados en saliva para su monitorización terapéutica, los cuales incluyen fundamentalmente antiepilépticos, antipsicóticos, psicoestimulantes y opioides.

Tabla 15. Principales fármacos monitorizados en saliva.

Fármaco	Ref	Fármaco	Ref	Fármaco	Ref	Fármaco	Ref
Ácido micofenólico	91	Etosuximida	92,94	Metadona	103	Quetiapina	93
Ácido valproico	92	Fenitoína	92,94	Metilfenidato	104	Quinidina	94
Amisulprida	93	Fenobarbital	92	Metotrexato	94	Risperidona	93
Aripiprazol	93	Gabapentina	92	Morfina	94	Sulpirida	93
Carbamazepina	92,94	Lacosamida	92	Neviparina	105	Teofilina	108
Clobazam	92	Lamotrigina	92	Nicotina	94,95	THC	94,97
Clozapina	93	Levetiracetam	92	Nitrazepam	94	Topiramato	92
Cocaína	94	Litio	98	Oxcarbazepina	92	Voriconazol	109
Cotinina	94,95	Maraviroc	99	Oxicodona	106	Warfarina	110
Cortisol	96	MDMA	100	Prednisolona	107	Zonisamida	92
Digoxina	94	Mefloquina	101	Prednisona	107		
Dronabinol	97	Melatonina	102	Primidona	92		

Ref = Referencia bibliográfica; MDMA = 3,4-metilendioxitmetanfetamina; THC = Tetrahidrocannabinol.

8.3.1. Saliva versus sangre

La sangre es un fluido corporal complejo conocido por contener una amplia gama de componentes moleculares, incluyendo enzimas, hormonas, anticuerpos y factores de crecimiento. Sin embargo, los procedimientos necesarios para recolectar y analizar

muestras sanguíneas pueden resultar costosos, problemáticos y físicamente invasivos. El empleo de fluidos salivales permite, en cambio, evitar la molestia del paciente mediante la utilización de un método no invasivo de toma de muestras [111].

Para muchas poblaciones de pacientes, los beneficios de la saliva, como la posibilidad de evitar la punción venosa relacionada con la extracción de sangre, son mayores que el riesgo de inexactitud que puede resultar de la estimación de los niveles salivales de fármaco. Esto incluye su uso clínico en la población pediátrica y geriátrica, y también en la población seropositiva, constituida habitualmente por usuarios de drogas por vía intravenosa [112].

Comparativamente, la saliva posee numerosas ventajas con respecto a la sangre, entre las que se incluyen las siguientes [111]:

- El proceso de recogida de muestras es poco exigente. Mientras que la extracción de sangre requiere de personal altamente capacitado, la adquisición de saliva puede ser realizada por cualquier persona, incluyendo la recolección por el propio paciente.
- El procedimiento no es invasivo. La adquisición de muestras es indolora, reduciendo la incomodidad de aquellos pacientes que deben someterse a extracciones de sangre repetidas.
- Las muestras se manejan con más seguridad. Las secreciones salivales contienen factores que inhiben la infectividad del VIH, que resulta en tasas extremadamente bajas o insignificantes de transmisión oral [113].
- Las muestras salivales son más fáciles de transportar y almacenar. La saliva no coagula y requiere menos manipulación que la sangre.
- El procedimiento es económico. La saliva se recoge, envía y almacena fácilmente, lo que resulta en una disminución del coste general para el sistema sanitario.

Además, la saliva ha demostrado ser una matriz fiable en la detección de drogas de abuso en comparación con la orina y el sudor [114], ya que impide su alteración o sustitución gracias a la posibilidad, en caso necesario, de supervisión directa del paciente en el momento de la toma de muestras [115].

8.3.2. Fisiología de la saliva

Existen tres pares de glándulas ubicadas alrededor de la boca y la garganta, encargadas de la producción salival, que son: las parótidas, submandibulares y sublinguales (Fig. 2).

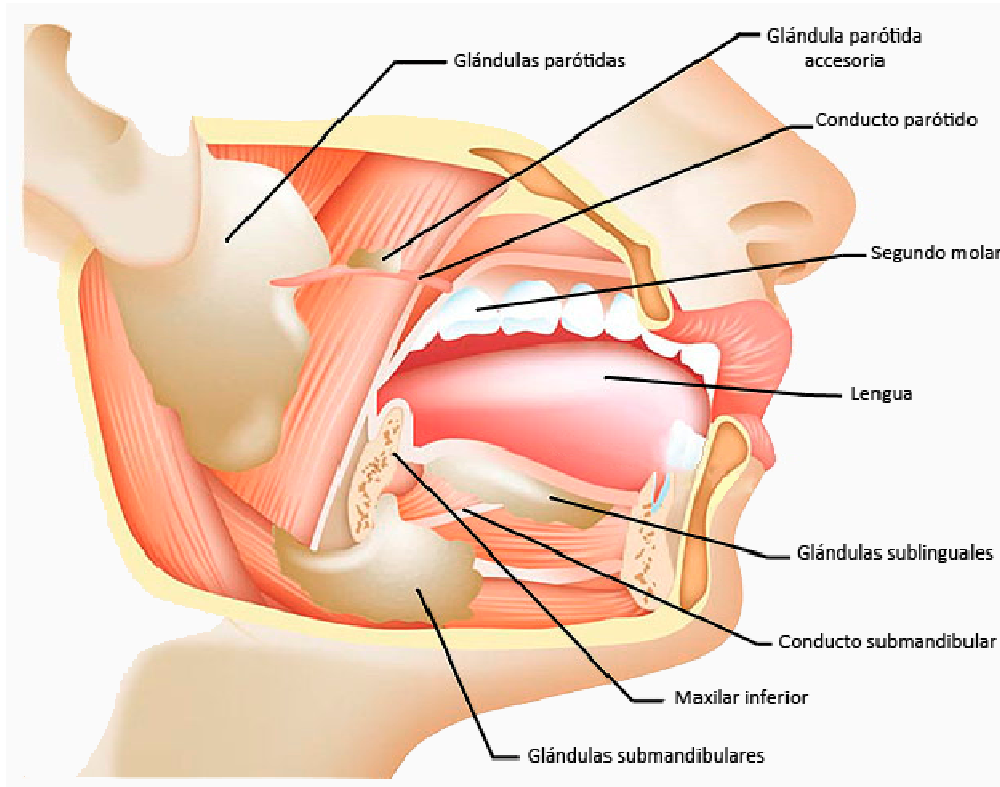


Figura 2. Glándulas encargadas de la producción salival [116].

La saliva humana es un fluido biológico claro, heterogéneo y ligeramente ácido (pH 6.0 a 7.0) compuesto por agua (99 %), proteínas (0.3 %) y sustancias inorgánicas (0.2 %). En promedio, la salivación del individuo puede variar de 0.3 a 0.7 mL de saliva por minuto, produciendo aproximadamente de 1 a 1.5 L diarios. La saliva es multifuncional, ya que no sólo sirve para facilitar la digestión, tragar, saborear y lubricar el tejido de la cavidad oral, sino que también funciona como barrera protectora contra agentes patógenos. La saliva se genera dentro de las glándulas salivales por las células acinares, y llega a la cavidad oral a través de los conductos salivales. Además de las tres grandes glándulas salivales antes indicadas, existen numerosas glándulas menores (aproximadamente unas 450-750), situadas en las zonas labial, bucal, lingual y palatina. Cada glándula está inervada autónomicamente, y están sujetas a la estimulación

parasimpática y simpática, y se considera que poseen una función exocrina. Los tres pares principales de glándulas salivales (parótidas, submandibulares y sublinguales) contribuyen en la producción del 90 % de la saliva total, mientras que las glándulas menores (labial, bucal, lingual y palatina) suministran el 10 % restante [111].

Otra fuente salival es la que procede del intersticio, especialmente importante cuando se estimula la salivación. Este aporte salival depende de la cantidad de agua corporal, la cual puede verse comprometida en caso de fiebre o diarrea, situaciones en las que hay menos disponibilidad de agua en el organismo, lo que resulta en un bajo volumen de saliva y se traduce en el síndrome de la boca seca [117].

La saliva es hipotónica en comparación con el suero y se almacena en los gránulos secretorios localizados en las células acinares de las glándulas salivales. Los gránulos se llenan con agua, en la que se disuelven los electrolitos y proteínas que compondrán también la secreción salival. El proceso de llenado de los gránulos se consigue mediante la saturación de las glándulas salivales con la sangre circulante [117]. Cada glándula salival es altamente permeable y está envuelta por capilares sanguíneos (**Fig. 3**). La gran vascularización permite el libre intercambio de moléculas procedentes de la sangre con las células acinares adyacentes, encargadas de la producción de saliva. El papel de los acinos salivales es la absorción de moléculas sanguíneas y la secreción de fluidos hacia la cavidad oral a través del conducto intercalar y estriado [111].

Los electrolitos salivales más abundantes son sodio, potasio, cloruro y bicarbonato. Otros como calcio, magnesio y fosfato están presentes en concentraciones menores. Todos ellos se originan a partir del suero sanguíneo, desde el cual son transportados activamente hacia los acinos y conductos salivales. La velocidad con la que la saliva pasa a través de los conductos salivales determina la concentración de electrolitos. En este sentido, cuanto mayor sea la velocidad de producción salival, menos tiempo habrá para que tengan lugar los procesos de intercambio de electrolitos. Por otra parte, los componentes salivales orgánicos, proteínas y glicoproteínas, son sintetizados por células secretoras. Algunas proteínas, tales como la lisozima, lactoferrina, lactoperoxidasa, cistatina e histatina, juegan un papel importante como agentes antibacterianos y antifúngicos en la saliva. Las mucinas también juegan un papel antiviral, mientras que la alfa-amilasa, lipasa, proteinasa, DNasa y RNasa son importantes en el proceso

digestivo. Estas proteínas de secreción y electrolitos se recogen en vacuolas condensadas que luego son guiadas hacia la parte apical de la célula secretora mediante los gránulos secretores. Llegados a este punto, la secreción se produce al estimular la salivación [117].

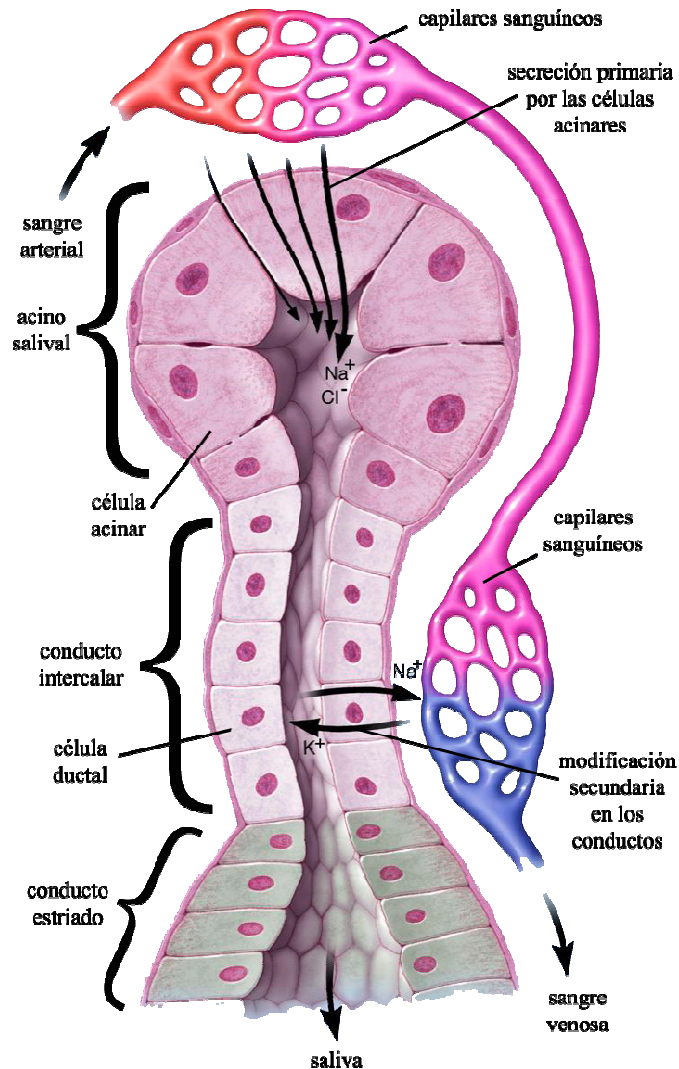


Figura 3. Mecanismo de transporte molecular desde la circulación sanguínea hacia los conductos de las glándulas salivales [111].

8.3.3. Estimulación salival

El sistema nervioso autónomo juega un papel importante en el proceso de salivación. La estimulación tanto simpática como parasimpática puede causar salivación, aunque la correspondiente secreción será diferente en cuanto a constitución y volumen. Las células secretoras de las glándulas serosas y sero-mucosas están inervadas por los sistemas nerviosos simpático y parasimpático, por lo que la tasa de secreción aumenta de forma sinérgica cuando ambas inervaciones se estimulan simultáneamente.

De este modo, la estimulación de las glándulas salivares puede realizarse a través de las vías colinérgica, α - y β -adrenérgica. Una estimulación α -adrenérgica provoca un mayor aumento de calcio en las células secretoras, que se traduce en una secreción rica en proteínas. Debido a la baja concentración de mucina, el aspecto clínico de esta saliva no es espumoso ni viscoso. La estimulación β -adrenérgica permite, en cambio, una elevada salida de proteínas a partir de los acinos y, como consecuencia, la secreción resultante es rica en proteínas y mucina, y su aspecto clínico es espumoso y viscoso. En ambos casos, el volumen de saliva producido es bajo. Por otro lado, las glándulas mucosas sólo pueden ser estimuladas colinérgicamente. Este tipo de estimulación hace aumentar el flujo de iones sodio, potasio y calcio sobre la membrana celular, resultando en una secreción acuosa de volumen elevado y rica en electrolitos [117].

La saliva estimulada contiene una concentración de bicarbonato mayor que en condiciones de reposo, lo que le confiere una mayor capacidad amortiguadora de las variaciones de pH que pueda haber en la cavidad oral. En condiciones de reposo, la proporción de bicarbonato salival con capacidad amortiguadora es de aproximadamente el 50%. En estas condiciones, la glándula parótida casi no produce saliva, mientras que las otras dos glándulas principales son las responsables de la producción salival. Esto resulta en una secreción muy viscosa y rica en proteínas, capaz de estabilizar el pH del fluido oral alrededor de 7.0. Sin embargo, el volumen de saliva secretado en reposo es muy bajo. Esta capacidad tamponadora de la saliva bajo condiciones de reposo o estimulación es importante para proteger los dientes contra la desmineralización y para lubricar los tejidos blandos de la cavidad oral [118].

La salivación puede ser estimulada o verse reducida por varios factores. Las concentraciones de electrolitos y el volumen de saliva producido no sólo se ven influidos por el momento del día, sino también por el tipo de estímulo salival. Los estímulos gustativos y olfativos, la estimulación mecánica (masticación), el dolor, el embarazo y sus cambios hormonales, y los medicamentos simpaticomiméticos y parasimpaticomiméticos, entre otros, aumentan el flujo salival. Por otro lado, el estrés, cambios hormonales relacionados con la menopausia, fármacos antiadrenérgicos y fármacos anticolinérgicos se incluyen entre los factores que producen una reducción en la tasa de flujo salival. Como consecuencia de ello, cuando se determina un fármaco en matriz salival, el resultado dependerá de la cooperación del sujeto, su estado

psicológico, la influencia hereditaria, la higiene oral, el uso de medicamentos y el método de toma de muestras (incluyendo tipo de estimulación y duración). Todo ello genera variaciones continuas en la composición salival, tanto cuantitativa como cualitativamente, siendo esta la diferencia principal entre saliva y suero, en el que las concentraciones de los diversos componentes del sistema suelen variar muy poco. Todo ello conlleva que la investigación sobre la disposición de fármacos en saliva no suponga una tarea fácil [117].

8.3.4. Transferencia de fármacos hacia la saliva

Algunos fármacos, como digoxina, esteroides y hormonas, se excretan activamente en la saliva por medio de las células acinares. Sin embargo, la mayoría de fármacos y sus metabolitos aparecen en saliva por difusión pasiva desde la sangre hasta la matriz salival, a través de las células acinares o de las células ductales localizadas en los conductos salivales [112]. Gracias a este fenómeno, los fármacos pueden ser detectables en saliva muy rápidamente después de producirse la administración oral y consiguiente absorción en el torrente sanguíneo [118].

Para la difusión de un fármaco a través de las membranas celulares es necesario que la molécula sea liposoluble y que no esté ionizada ni unida a proteínas. Por esta razón, las concentraciones salivales de un fármaco representan la fracción libre y no ionizada circulante en el plasma sanguíneo [112].

En condiciones de equilibrio, las concentraciones de fármaco en saliva son función del pK del fármaco, de los pH plasmático y salival y de las fracciones de fármaco unido a proteínas salivales y plasmáticas, como se muestra en la ecuación de Henderson-Hasselbach siguiente [112]:

La relación saliva/plasma (S/P) para fármacos básicos es:

$$S/P = \frac{[1 + 10^{(pK_d - pH_s)}]}{[1 + 10^{(pK_d - pH_p)}]} + \frac{f_p}{f_s}$$

Mientras que para fármacos ácidos, la relación S/P es:

$$S/P = \frac{[1 + 10^{(pH_s - pK_a)}]}{[1 + 10^{(pH_p - pK_a)}]} + \frac{f_p}{f_s}$$

Donde S es la concentración de fármaco en saliva, P es la concentración de fármaco en plasma, pKd es la constante de disociación para fármacos básicos, pKa es la constante de disociación para fármacos ácidos, pHs es el pH salival, pHp es el pH plasmático, fp es la fracción de fármaco unida a proteínas plasmáticas y fs es la fracción de fármaco unida a proteínas salivales.

El pH que gobierna este equilibrio es el pH de la saliva en la luz acinar y en el conducto salival en el momento de la secreción. De hecho, cuando el fluido entra en la cavidad oral, el dióxido de carbono se pierde y el pH aumenta. Dawes y Jenkins [119] demostraron que el pH de la saliva es inversamente proporcional al flujo salival y la reabsorción de sodio en los túbulos salivales. A tasas de flujo más rápidas, menos sodio es reabsorbido en los túbulos salivales durante el camino hacia la boca, y como consecuencia el pH salival aumenta. Por esta razón, la saliva estimulada tiene un pH más alto, que puede llegar a alcanzar valores de 8.0.

Dado que la saliva humana normalmente tiene un pH inferior a plasma humano, la relación S/P para fármacos ácidos es generalmente inferior a la unidad, mientras que para fármacos básicos es mayor a uno, lo cual indica que las concentraciones de fármacos básicos en saliva aumentan con respecto a las existentes en plasma. Para fármacos con un pK entre 5.5 y 8.5, la relación S/P puede variar dependiendo de si se trabaja con saliva estimulada o no estimulada [120,121]. Este es el caso de drogas de abuso como la cocaína [122] o de fármacos como la codeína [123], donde cambios del pH salival entre 5.0 y 7.8 debidos a la estimulación pueden provocar variaciones en la concentración salival de hasta un 600%.

Aparte del pH salival, las concentraciones salivales de determinados fármacos como metadona están influenciadas por la variabilidad intraindividual en las enzimas del CYP, ya que la inducción y supresión de su actividad por fármacos y sus metabolitos puede repercutir de forma decisiva sobre la cantidad de analito hallada en saliva. Consecuentemente, ello ha generado un creciente interés en la realización de estudios que permitan conocer y controlar dicha variabilidad [90,118].

9. TRANSPORTADORES DE EFLUJO

Existen evidencias más que suficientes que sugieren que los transportadores de eflujo situados en la barrera hematoencefálica, específicamente P-gp, pueden contribuir al desarrollo de tolerancia a los opioides mediante una disminución de los niveles de medicamento en el lugar de acción [124]. P-gp forma parte de la super-familia de proteínas transportadoras denominadas *ATP-binding cassette* (ABC), y es uno de los transportadores de eflujo más caracterizado hasta la fecha [124]. P-gp está implicada en varias funciones incluyendo la extrusión de xenobióticos, la absorción de nutrientes, el transporte de iones y péptidos, y la señalización celular [125]. Así, uno de sus papeles fundamentales es expulsar hacia el medio extracelular compuestos hidrofóbicos que podrían ser perjudiciales para la supervivencia, consumiendo energía en forma de adenosín trifosfato (ATP) en dicho proceso.

En general, los sustratos de P-gp contienen un alto número de enlaces de hidrógeno, un átomo de nitrógeno básico y son lipofílicos con un peso molecular por debajo de 500 [125]. Como ya se ha comentado con anterioridad, P-gp participa en la regulación de la absorción, distribución, y eliminación de metadona [126,127] y por lo tanto puede afectar a su biodisponibilidad [128]. La interacción entre metadona y P-gp se ha estudiado utilizando diferentes modelos *in vitro*, mostrando que metadona es sustrato de P-gp [11,129,130] con una afinidad de 2.61 en la evaluación *in situ* [131]. En estudios *in vivo* realizados en ratones y ratas *knock-out* de P-gp tratadas con un inhibidor específico del transportador, se observó que el efecto analgésico de metadona fue mayor y sus concentraciones cerebrales fueron marcadamente superiores cuando P-gp estaba ausente o inhibida [132,133].

Se ha observado también que P-gp sería responsable del transporte activo de fármacos hacia el conducto salival [134], por lo que cambios en su actividad o expresión podrían influir directamente sobre el cociente S/P [135]. Por esta razón, se plantea si dicha relación podría ser de utilidad para evaluar la existencia de modificaciones sistémicas en la expresión de estos transportadores de eflujo a la vez que determinar si P-gp estaría contribuyendo de forma importante a la variabilidad de este cociente.

10. JUSTIFICACIÓN

De acuerdo con la información proporcionada, se plantea la hipótesis que si se estableciera la monitorización farmacocinética de metadona en la práctica clínica se obtendría más información sobre la adecuación de la dosis correcta y de este modo se mejoraría el éxito terapéutico de los PMM y de la terapia del dolor.

Además, si se pudiese trabajar con una matriz biológica no invasiva e indolora en el momento de su obtención, como es el caso de la saliva, este aspecto a lo mejor podría influir en un aumento en la adherencia al tratamiento, en una mejora en los objetivos terapéuticos y, finalmente, en una disminución del abandono del tratamiento.

II. OBJETIVO

II. OBJETIVO

1. OBJETIVO PRINCIPAL

En base a lo expuesto, el objetivo final y último de la tesis que se plantea es ampliar el conocimiento de la farmacocinética de metadona para conseguir la mejor terapéutica posible en pacientes incluidos en programas de mantenimiento con metadona (PMM) y en terapia del dolor, ajustando las dosis para alcanzar posologías más seguras y efectivas, con la consiguiente mejora de la adherencia al tratamiento y de la calidad de vida de los pacientes.

2. OBJETIVOS SECUNDARIOS

Para lograr el objetivo anterior, es necesario alcanzar, entre otros, los siguientes objetivos intermedios:

- Desarrollo y validación previa y durante el estudio de las metodicas analíticas para la cuantificación de metadona en fluidos biológicos (plasma y saliva).
- Determinación de la función del error de las metodicas analíticas validadas.
- Cuantificación de los niveles de metadona en estos fluidos biológicos en pacientes que utilizan metadona (aquellos incluidos en PMM y aquellos en terapia del dolor).
- Estudio de posibles modelos cinéticos de disposición y estimación de los parámetros farmacocinéticos correspondientes.
- Correlación de las concentraciones de metadona obtenidas en plasma y saliva humanos.
- Valoración de diferentes técnicas de recogida de muestras salivales basadas en la estimulación y la no estimulación de saliva y posible aplicación a la clínica del tipo de pacientes del estudio.

III. MATERIAL Y MÉTODOS

III. MATERIAL Y MÉTODOS

En este apartado se detallan los materiales empleados en la presente memoria experimental, así como la metodología seguida en cada una de las experiencias realizadas.

1. MATERIAL

Los materiales utilizados se especifican en los siguientes apartados:

1.1. Fármacos

1.1.1. Fármaco objeto de estudio

El fármaco empleado fue metadona clorhidrato, suministrado por el laboratorio farmacéutico Sigma-Aldrich, Barcelona, España.

Metadona es un opioide sintético que, pese a comportarse de forma similar a la morfina, es estructuralmente diferente. Su estructura está formada por una cadena alifática que contiene dos anillos bencénicos y un grupo terminal dimetilamino. Sin embargo, en solución acuosa, sus átomos se organizan adoptando la misma configuración espacial que morfina, obligados por factores estéricos. Además, metadona tiene un átomo de carbono asimétrico en su estructura, lo que significa que existe en dos formas enantioméricas que tienen la misma composición química pero diferentes disposiciones espaciales, siendo un enantiómero la imagen especular del otro. Metadona se comercializa en casi todos los países como una mezcla racémica, es decir, una mezcla de dos enantiómeros al 50:50, denominados (R)-metadona y (S)-metadona. Puesto que el enantiómero (R) ha demostrado ser 50 veces más potente que el (S) en estudios de analgesia en humanos, se le considera el responsable de la actividad farmacoterapéutica [3].

A continuación, se representa su estructura química (**Fig. 4**) y se detallan algunas de sus propiedades físico-químicas [39,136,137]:

Metadona clorhidrato

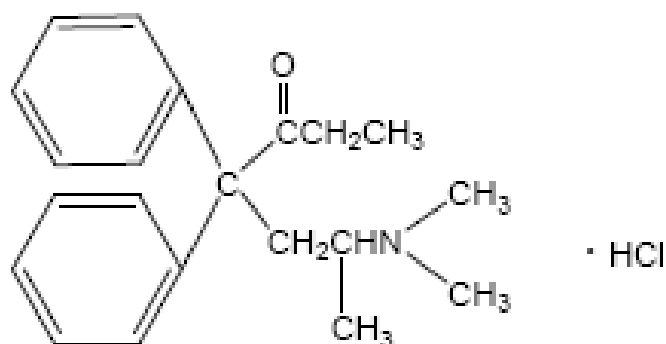


Figura 4. Estructura química de metadona clorhidrato.

*Fórmula empírica:	C ₂₁ H ₂₇ NO, HCl
*Peso molecular:	345.9 g/mol
*Nombre IUPAC:	(6RS)-6-(dimetilamino)-4,4-difenil-3-heptanona
*Código ATC:	N07BC02
*Punto de fusión:	233 - 236°C
*Naturaleza:	Cristales incoloros e inodoros o polvo cristalino blanco.
*Solubilidad:	Soluble en agua (12g/100mL), etanol (8g/100mL) y propan-2-ol (2.4g/100mL); prácticamente insoluble en éter y en glicerol.
*Constante de disociación:	pK: 8.3 (20 °C); 8.94 (25 °C)
*Coeficiente de partición:	LogP (octanol/agua): 3.93
*Espectro UV:	En solución acuosa ácida: 253, 259, 264 y 292 nm
*Conservación:	Conservar en recipiente hermético y protegido de la luz

1.1.2. Fármacos a tener en cuenta en la práctica clínica

El uso concomitante de benzodiazepinas es un problema importante en pacientes con dependencia a opioides, especialmente en aquellos tratados con metadona [138]. Además, los sujetos adictos a la heroína tienen un alto riesgo de contraer el VIH a partir de agujas o jeringuillas usadas, así como por mantener relaciones sexuales sin protección con parejas de alto riesgo. Como resultado, muchos pacientes con VIH adictos a la heroína y que se encuentran en mantenimiento con metadona pueden requerir tratamiento farmacoterapéutico adicional con medicamentos antirretrovirales [139].

Puesto que la presente memoria trata sobre la monitorización terapéutica de metadona tanto en pacientes con dolor crónico, como en pacientes adictos a opioides, se decidió analizar muestras que contuviesen una selección de estos medicamentos, con objeto de comprobar la ausencia de interferencias exógenas y asegurar la obtención de resultados fiables en el posterior análisis de muestras clínicas reales.

Las benzodiazepinas empleadas fueron cuatro: alprazolam, clonazepam, diazepam y lorazepam, y fueron suministradas por los siguientes laboratorios farmacéuticos:

- | | |
|--------------|-----------------------------------|
| - Alprazolam | Sigma-Aldrich, Barcelona (España) |
| - Clonazepam | Sigma-Aldrich, Barcelona (España) |
| - Diazepam | Sigma-Aldrich, Barcelona (España) |
| - Lorazepam | Sigma-Aldrich, Barcelona (España) |

A continuación, se detallan algunas de sus propiedades físico-químicas [39]:

Alprazolam

*Fórmula empírica:	$C_{17}H_{13}ClN_4$
*Peso molecular:	308.8 g/mol
*Solubilidad:	Prácticamente insoluble en agua; poco soluble en alcohol y acetona; muy soluble en cloroformo y diclorometano.
*Constante de disociación:	pK: 2.4
*Coeficiente de partición:	LogP (octanol/agua): 2.12
*Espectro UV:	En solución acuosa ácida: 260 nm

Clonazepam

*Fórmula empírica:	$C_{15}H_{10}ClN_3O_3$
*Peso molecular:	315.7 g/mol
*Solubilidad:	Soluble a 25°C en acetona (31 mg/mL), cloroformo (15 mg/mL), metanol (8.6 mg/mL), éter (0.7 mg/mL), benceno (0.5 mg/mL) y agua (<0.1 mg/mL).
*Constante de disociación:	pK ₁ : 1.5; pK ₂ : 10.5
*Coeficiente de partición:	LogP (octanol/agua): 2.41
*Espectro UV:	En solución acuosa ácida: 273 nm En metanol: 245 y 309 nm

Diazepam

*Fórmula empírica:	$C_{16}H_{13}ClN_2O$
*Peso molecular:	284.8 g/mol
*Solubilidad:	Poco soluble en agua; soluble 1 en 25 de etanol, 1 en 2 de cloroformo y 1 en 39 de éter.
*Constante de disociación:	pK ₁ : 3.5; pK ₂ : 3.3 (20°C)
*Coeficiente de partición:	LogP (octanol/agua, pH 7.4): 2.7
*Espectro UV:	En solución acuosa ácida: 242, 284 y 366 nm

Lorazepam

*Fórmula empírica:	$C_{15}H_{10}Cl_2N_2O_2$
*Peso molecular:	321.2 g/mol
*Solubilidad:	Soluble en agua (0.08 mg/mL), cloroformo (3 mg/mL), alcohol (14 mg/mL), propilenglicol (16 mg/mL), etil acetato (30 mg/mL).
*Constante de disociación:	pK_1 : 1.3; pK_2 : 11.5 (20°C)
*Coeficiente de partición:	LogP (octanol/tampón acuoso, pH 7.4): 2.4
*Espectro UV:	Etanol: 230 y 316 nm

Los antirretrovirales empleados fueron seis: abacavir, efavirenz, estavudina, lamivudina, ritonavir y saquinavir. Éstos se seleccionaron de acuerdo con la guía clínica española sobre el tratamiento antirretroviral [140], y fueron suministrados por los siguientes laboratorios farmacéuticos:

- Abacavir	GlaxoSmithKline, Barcelona (España)
- Efavirenz	Bristol-Myers Squibb, Madrid (España)
- Estavudina	Medichem, Barcelona (España)
- Lamivudina	GlaxoSmithKline, Barcelona (España)
- Ritonavir	Abbott, Barcelona (España)
- Saquinavir	Roche Diagnostics GmbH, Mannheim (Alemania)

A continuación, se detallan algunas de sus propiedades físico-químicas [39]:

Abacavir

*Fórmula empírica:	$C_{14}H_{18}N_6O$
*Peso molecular:	286.3 g/mol
*Solubilidad:	Soluble en agua (0.077 mg/L a 25°C)
*Constante de disociación:	pK : 5.01
*Coeficiente de partición:	LogP (octanol/fosfato sódico, pH 7.4): 1.22
*Espectro UV:	En solución acuosa básica: 217, 260 y 285 nm

Efavirenz

*Fórmula empírica:	$C_{14}H_9ClF_3NO_2$
*Peso molecular:	315.7 g/mol
*Solubilidad:	Prácticamente insoluble en agua (<10 g/L)
*Constante de disociación:	pK: 10.2
*Espectro UV:	Picos principales a 247 y 293 nm

Estavudina

*Fórmula empírica:	$C_{10}H_{12}N_2O_4$
*Peso molecular:	224.2 g/mol
*Solubilidad:	Soluble en agua y en propilenglicol
*Coeficiente de partición:	LogP (octanol/agua): 0.72
*Espectro UV:	En solución acuosa ácida: 266 nm

Lamivudina

*Fórmula empírica:	$C_8H_{11}N_3O_3S$
*Peso molecular:	229.3 g/mol
*Solubilidad:	Soluble en agua (70 mg/mL a 20°C)
*Espectro UV:	En solución acuosa ácida: 212 y 279 nm

Ritonavir

*Fórmula empírica:	$C_{37}H_{48}N_6O_5S_2$
*Peso molecular:	721.0 g/mol
*Solubilidad:	Prácticamente insoluble en agua, soluble en isopropanol, muy soluble en metanol y etanol.
*Espectro UV:	En solución acuosa ácida: 238 nm

Saquinavir

*Fórmula empírica:	$C_{38}H_{50}N_6O_5$
*Peso molecular:	670.8 g/mol
*Solubilidad:	Soluble en agua (0.22 g/100mL)
*Espectro UV:	En solución acuosa ácida: 204, 238 y 292 nm (saquinavir mesilato)

1.2. Reactivos

- Acetonitrilo, calidad HPLC (Carlo Erba Reagents, S.A.)
- Ácido bórico, calidad analítica (Probus, S.A.)
- Ácido cítrico anhidro, calidad analítica (Merck, S.L.)
- Ácido clorhídrico 1N, calidad analítica (Panreac Química, S.A.)
- Agua Milli-Q, calidad HPLC
- Di-sodio hidrógeno fosfato anhidro, calidad analítica (Panreac Química, S.A.)
- Electrolito KCl 3M + AgCl (Crison Instruments, S.A.)
- Éter dietílico, calidad analítica (Panreac Química, S.A.)
- Metanol, calidad HPLC (Carlo Erba Reagents, S.A.)
- N-hexano, calidad analítica (Panreac Química, S.A.)
- Potasio cloruro, calidad analítica (Panreac Química, S.A.)
- Potasio di-hidrógeno fosfato, calidad analítica (Panreac Química, S.A.)
- Sodio hidróxido 1N, calidad analítica (Panreac Química, S.A.)
- Solución reguladora pH 7.00 (Crison Instruments, S.A.)
- Solución reguladora pH 4.01 (Crison Instruments, S.A.)

1.3. Material auxiliar de laboratorio

- Agitador rotativo vertical de 360° Grant Bio PTR 60 (Grant Instruments Ltd.)
- Botellas de vidrio topacio de 1000 mL (VidraFoc, S.A.)
- Botella de vidrio transparente de 250 mL (Schott AG)
- Botella de vidrio transparente de 500 mL (Boraf)
- Balanza de precisión Precisa 125A (Precisa Gravimetrics AG)
- Balanza de precisión Precisa 600C (Precisa Gravimetrics AG)

- Baño de ultrasonidos Ultrasons P (JP Selecta, S.A.)
- Centrífuga de sobremesa Hermle Z200A (Hermle LaborTechnik)
- Columnas cromatográficas Luna C18(2) 5 μ m 100Å (150 x 4.60 mm d.i.) (Phenomenex)
- Congelador Liebherr Comfort NoFrost (Liebherr)
- Cromatógrafo líquido de alta eficacia Jasco HPLC LC-2000 plus (Jasco Corporation) equipado con una bomba cuaternaria Jasco Intelligent HPLC Pump modelo PU-2089, un inyector automático Jasco Intelligent Autosampler modelo AS-2055, un detector UV-visible Jasco Intelligent UV Detector modelo UV-2075, un sistema de integración y entrada de datos Jasco Interface Box modelo LC-NET II/ADC, un sistema de alimentación ininterrumpida (SAI) Eaton Evolution 1500 Tower, un ordenador de sobremesa Dell Optiplex 780 con software ChromNAV ver. 1.12.01 y una impresora HP Deskjet F2420.
- Filtros Millipore HV 0.45 μ m, 47 mm (Millipore Ibérica, S.A.)
- Frigorífico Saivod New Line 360 2T (Saivod, S.A.)
- Gradillas metálicas y de plástico, varias medidas (Sudelab, S.L.)
- Guantes de látex para examen talla M (Caribú Medical, S.A.)
- Matraces aforados de vidrio transparente de 10, 25, 50, 100, 1000 y 2000 mL (VidraFoc, S.A.)
- Matraces aforados de vidrio topacio de 10 y 25 mL (Afora, S.A.)
- Milli-Q Plus Ultra-Pure Water System (Millipore Ibérica, S.A.)
- Núcleos magnéticos recubiertos de teflón, varias medidas (Sudelab, S.L.)
- pHmetro Crison micropH 2001 (Crison Instruments, S.A.)
- Papel de aluminio de 30 m (Sudelab, S.L.)
- Parafilm 38 m x 10 cm (Sudelab, S.L.)
- Pipeta automática autoclavable Nichiryo 5000 de 100-1000 μ L (Nichiryo)
- Pipeta automática autoclavable Nichiryo Nichipet 5000DG de 20-200 μ L (Nichiryo)
- Pipeta automática autoclavable Nichiryo Nichipet EX de 1000-5000 μ L (Nichiryo)
- Pipetas pasteur de plástico graduadas de 3 mL (Copan Italia)
- Pipetas pasteur de vidrio no graduadas de 150 mm (Deltalab, S.A.)
- Pre-columna SecurityGuard Cartridge Luna C18 (ODS, octadecyl) (4 x 3.0 mm i.d.) (Phenomenex)

- Puntas desechables para micropipetas, diferentes medidas (Sudelab, S.L.)
- Sistema de filtración al vacío compuesto por un embudo de 300 mL VidraFoc, una pinza metálica Quickfit, un soporte para membrana con placa porosa VidraFoc, un matraz de kitasato de 1000 mL VidraFoc y una goma de vacío.
- Soporte y herramientas para pre-columna SecurityGuard Guard Cartridge Kit KJ0-4282 (Phenomenex)
- Tubos de vidrio de fondo cónico y no cónico con tapón de rosca de 10 mL (VidraFoc, S.A.)
- Tubos de polipropileno de 5 y 10 mL con tapones de polietileno (Sudelab, S.L.)
- Vasos de precipitados de vidrio transparente de 10, 50, 100 y 250 mL (Pyrex)
- Vaso de precipitados de vidrio transparente de 2000 mL (Simax)
- Vaso de precipitados de vidrio transparente de 3000 mL (Boraf)
- Viales de vidrio topacio para HPLC de 1.5 mL (Sigma-Aldrich Química, S.A.)
- Viales de vidrio transparente para HPLC de 1.5 mL (Jasco Corporation)
- Viales cónicos de vidrio transparente para HPLC de 150 μ L (Waters)
- Vitrina de extracción de gases (Dimanlab, S.L.)

2. MÉTODOS

2.1. Desarrollo de las metodías analíticas

La técnica de bioanálisis empleada para la determinación de metadona en plasma y en saliva humanas fue la cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) con detección en el UV.

Para el desarrollo del método bioanalítico, se procedió a la búsqueda de evidencia científica. En este sentido, se utilizaron distintas fuentes bibliográficas relacionadas con el ámbito de las ciencias de la salud para obtener la información disponible hasta el momento actual sobre esta temática.

Como criterios importantes de elección de la técnica, se tuvieron en cuenta que dado el interés de un empleo potencial en la práctica clínica, fuera lo más sencilla posible y supusiera un coste económico reducido, permitiendo en cualquier caso la correcta cuantificación en plasma y saliva.

2.2. Condiciones cromatográficas

El sistema cromatográfico utilizado consistió en un cromatógrafo de líquidos Jasco LC-2000 plus (Jasco Corporation, Japón) equipado con una bomba cuaternaria (modelo PU-2089), un inyector automático de volumen de inyección variable (modelo AS-2055), un detector UV-visible de longitud de onda variable (modelo UV-2075) y un sistema computarizado de integración y entrada de datos (modelo LC-NET II/ADC).

El análisis cromatográfico se realizó con columnas de fase reversa Luna C18(2) de 5 µm de tamaño de partícula, 100 Å de tamaño de poro (150 mm de longitud x 4.60 mm de diámetro interno) (Phenomenex, Micron Analítica S.A., Madrid, España), protegidas con pre-columnas Luna C18 (4 mm de longitud x 3.0 mm d.i.) (Phenomenex, Micron Analítica S.A., Madrid, España), operando a temperatura ambiente.

La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo (fase orgánica) y tampón fosfato (fase acuosa) con el pH ajustado a 5 y en la proporción 25:75 (v/v). Metadona fue eluída isocráticamente con un flujo de 1.0 mL/min. El volumen de inyección de muestra fue de 100 µl y la longitud de onda para la detección en el UV fue de 215 nm.

2.3. Preparación de las soluciones estándar y patrones de control de calidad

Soluciones estándar de 1000 ng/mL se preparaban en plasma o saliva a partir de una solución stock madre de 1mg/mL de metadona elaborada en agua Milli-Q. A partir de las soluciones estándar, y mediante diluciones sucesivas en plasma o saliva, se obtenían los patrones de control de calidad. Las rectas de calibración estaban constituidas por 6 y 7 niveles de concentración para metadona en plasma y saliva, respectivamente, las cuales se analizaban por triplicado. El rango de concentraciones cubierto fue de 50-600 ng/mL para metadona en plasma y de 50-1000 ng/mL para metadona en saliva. La pendiente, la ordenada en el origen y el coeficiente de correlación se calculaban mediante el ajuste del área bajo el pico cromatográfico (y) versus la concentración del principio activo analizado (x) a la recta de regresión del tipo $y = ax + b$, por el método de mínimos cuadrados. Las concentraciones de las muestras se estimaban por la predicción inversa.

2.4. Pretratamiento de las muestras

Para la extracción de metadona a partir de las matrices plasmática y salival se empleó el mismo método de extracción líquido-líquido (LLE): En tubos de vidrio de fondo no cónico se puso en contacto 1 mL de muestra o solución patrón con 1 mL de tampón borato ajustado a pH 10. Seguidamente, se mezclaba el conjunto en el agitador rotativo durante 15 minutos. Posteriormente, se añadía a la mezcla 5 mL de solución extractora, formada por éter dietílico y hexano en proporción 30:70 (v/v), obteniendo una fase orgánica y una fase acuosa. La mezcla se agitaba nuevamente en el agitador rotativo durante 10 minutos y después se centrifugaba durante 5 minutos a 2500 rpm para conseguir la separación de las dos fases. La fase orgánica era entonces transferida a tubos de vidrio de fondo cónico, a los cuales se añadía 180 µl de ácido clorhídrico 1N. A continuación se mezclaba el conjunto en el agitador rotativo durante 10 minutos y luego se centrifugaba la mezcla 5 minutos a 2500 rpm para volver a obtener la fase orgánica, en la parte superior, separada de la fase acuosa, en el fondo del tubo. Finalmente, las fases se congelaban a -32°C hasta el momento de análisis. Congelada la fase acuosa, se separaba la fase orgánica, aún líquida, por decantación, y 100 µl de la fase acuosa se trasladaban a los viales cónicos de vidrio para su análisis por HPLC-UV.

2.5. Validación de las métodos analíticas

La validación de métodos de bioanálisis es el proceso utilizado para establecer que un método de análisis cuantitativo es adecuado para su aplicación clínica o biomédica [141]. El objetivo principal de la validación es demostrar la fiabilidad de un método para la determinación de concentraciones de analito en una matriz biológica específica, ya sea sangre, suero, plasma, orina o saliva, entre otras. La validación debe realizarse para cualquier método analítico, ya sea totalmente nuevo o esté basado en uno previamente publicado en la bibliografía científica [83]. La garantía en cuanto a la calidad y fiabilidad del método provienen de la realización de una serie de ensayos mínimos de validación y de la obtención de resultados satisfactorios [141]. Las principales características de un método bioanalítico esenciales para garantizar la aceptabilidad de funcionamiento y la fiabilidad de los resultados analíticos son: selectividad, linealidad y rango de calibración, efecto de la dilución, precisión, exactitud, recuperación, estabilidad del analito en la matriz biológica y estabilidad del

analito en las soluciones de trabajo y en los extractos en las condiciones de almacenamiento y procesamiento en las que se trabaja [83].

En general, se consideran tres tipos de validación [83]:

- **Validación completa:** para métodos nuevas o para métodos ya utilizadas pero que no están validadas, y de las que se posee información suficiente como para probar la bondad del método. En general, es necesario realizar una validación completa del método analítico para cada analito y matriz de estudio, llevando a cabo todos los ensayos de validación mencionados anteriormente.

- **Validación parcial:** para métodos ya validadas en las que se hicieron pequeños cambios. Entre los cambios para los que sería necesaria una validación parcial se incluyen: la transferencia del método bioanalítico a otro laboratorio, cambios en los equipos o en el rango de calibración, volumen limitado de muestra, utilización de matrices adicionales, cambios en el procedimiento de pretratamiento de muestras, en las condiciones de almacenamiento, etc. Los ensayos de validación parcial pueden variar desde solamente la determinación de la precisión y exactitud intradía, hasta la realización de una validación casi completa.

- **Validación cruzada:** para la comparación de datos obtenidos a partir de diferentes métodos dentro del mismo estudio o procedentes de varios estudios, o cuando los datos se obtienen en un estudio realizado en diferentes laboratorios aplicando el mismo método. En estos casos, las diferencias en la preparación de muestras o el uso de otro método de análisis puede dar lugar a resultados diferentes entre los lugares de estudio. La validación cruzada se debe realizar antes del análisis de las muestras de estudio, y utilizando el mismo conjunto de muestras de control de calidad. El resultado de la validación cruzada es fundamental para determinar si los datos obtenidos son fiables y si pueden compararse y utilizarse.

En nuestro caso se trataba de métodos nuevas, por lo que se realizaron dos validaciones completas para el estudio de pacientes en PMM. Posteriormente, se efectuó una validación parcial de ambas métodos para el estudio de pacientes en terapia del dolor, debido a la transferencia del método bioanalítico a un nuevo laboratorio de

análisis. Para las validaciones tanto completa como parcial se siguieron los procedimientos establecidos en las guías de la *European Medicines Agency* (EMA) [83], de la *Food and Drug Administration* (FDA) [84] y de la Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria (AEFI) [85].

2.5.1. Validación completa

1.- Selectividad: El método analítico debe ser capaz de diferenciar el analito de interés de los componentes endógenos de la matriz o de otros componentes presentes en la muestra.

a) Interferencias endógenas: Para la evaluación de las interferencias endógenas, se analizaron muestras blanco de matriz biológica de un mínimo de 6 procedencias diferentes (6 individuos que no hayan recibido el principio activo) y también patrones de calibrado en el límite inferior de cuantificación (LLOQ, 50 ng/ml, véase más adelante). Normalmente, la ausencia de componentes que interfieren se acepta cuando la respuesta es menor al 20 % del LLOQ para el analito de estudio.

También puede ser necesario investigar el grado de interferencia causada por posibles medicamentos que el paciente tome de forma concomitante. En este sentido, la comedición utilizada por la población de estudio que pueda interferir de forma potencial debe tenerse en cuenta en la fase de validación del método.

b) Interferencias exógenas: Para la evaluación de las interferencias exógenas se analizaron una serie de medicamentos que acostumbran a estar presentes en el tratamiento de pacientes drogodependientes y pacientes con dolor crónico. Los medicamentos seleccionados fueron, por un lado, antirretrovirales (abacavir, efavirenz, lamivudina, ritonavir, saquinavir y estavudina) para el tratamiento del SIDA, y por otro, benzodiazepinas (alprazolam, clonazepam, diazepam, lorazepam) para el tratamiento de la ansiedad. Primero se analizaron patrones de 500 ng/mL de cada fármaco por separado para definir los distintos tiempos de retención, y seguidamente se realizó un ensayo con todos los compuestos juntos en la misma muestra, incluyendo metadona a una concentración de 1000 ng/mL.

La ausencia de interferencias se acepta cuando al tiempo de retención de metadona no aparece ningún otro pico cromatográfico.

2.- Linealidad y rango de calibración: Se entiende por linealidad la capacidad que un método analítico tiene de obtener resultados linealmente proporcionales a la concentración de analito en la muestra, dentro de un intervalo de concentraciones o rango de calibración determinado.

El ensayo de linealidad consistió en el análisis de 3 curvas de calibrado de metadona en plasma constituidas por 6 patrones de calibración distintos distribuidos dentro del rango establecido (600, 400, 300, 200, 100 y 50 ng/mL), y de 3 curvas de calibrado de metadona en saliva constituida por 7 patrones distintos distribuidos dentro del rango establecido (1000, 800, 600, 400, 200, 100 y 50 ng/mL).

Una vez determinada la curva de calibración que relaciona la concentración de analito con la respuesta del método, que en nuestro caso es el área bajo el pico cromatográfico, se verificó la linealidad mediante el tratamiento estadístico de los datos e interpretación de los mismos, a través del coeficiente de correlación (r), del coeficiente de variación (CV) o desviación estándar relativa de los factores respuesta y del error relativo porcentual (ER %) de cada uno de los patrones que forman la curva de calibración.

c) Coeficiente de correlación (r): Este valor representa el grado de relación entre las variables x (concentración) e y (área). Su valor puede ir desde 0 hasta 1, y su signo puede ser positivo (cuando a valores altos de una variable le corresponden valores altos de la otra) o negativo (cuando a valores altos de una variable le corresponden valores bajos de la otra). Cuanto más cercano a la unidad sea, más correlación existe entre las dos variables.

El coeficiente de correlación elevado al cuadrado se denomina coeficiente de determinación (r^2) e indica la proporción de la varianza total, que es explicada por el modelo lineal de regresión.

d) Coeficiente de variación de los factores respuesta (f(y/x)): El factor respuesta es la relación entre la concentración y la respuesta del aparato. Así, en una calibración lineal los factores respuesta deben ser semejantes entre sí y cercanos al valor de la pendiente.

El coeficiente de variación (CV %) de esta relación es una expresión de la linealidad, de forma que valores mayores del 15% implican una falta de linealidad. El CV se define como:

$$CV \% = \frac{\text{Desviación estándar}}{\text{Media}} \times 100$$

e) Error relativo porcentual (ER %): Es la desviación en porcentaje de los valores de concentración calculada o experimental (C_{exp}) frente a los valores de concentración teóricos (C_{teor}).

El error relativo porcentual (ER %) de cada uno de los patrones presentes en las curvas de calibración no deberá ser superior al ±15% del valor de la concentración teórica, excepto para el límite inferior de cuantificación, el cual podrá ser como máximo del ±20%. Este criterio deberá cumplirse para al menos 2/3 de los patrones de calibración de cada una de las curvas, incluyendo los límites superior e inferior del rango. El ER % se define como:

$$ER \% = \frac{C_{exp} - C_{teor}}{C_{teor}} \times 100$$

3.- Efecto de la dilución: El ensayo de efecto de la dilución demuestra que la dilución de las muestras no afecta a la exactitud y la precisión de los resultados.

Para la realización del ensayo se prepararon patrones con una concentración de analito por encima del límite superior de concentración del rango de calibración definido (ULOQ), siendo 5 µg/mL y 8 µg/mL para metadona en plasma y saliva, respectivamente. Las muestras se diluyeron con matriz en blanco, de forma que la concentración final estuviese dentro del rango definido y se realizaron cinco

determinaciones por factor de dilución. Para la aceptación del ensayo, la exactitud debe estar comprendida entre el $\pm 15\%$ del valor de la concentración teórica, mientras que la precisión debe ser $\leq 15\%$ del valor de dicha concentración.

4.- Exactitud y precisión: La exactitud es la capacidad del método analítico para proporcionar resultados lo más cercanos posibles al valor teórico (valor nominal), mientras que la precisión es el grado de dispersión de los resultados analíticos respecto a su valor medio. La exactitud y precisión deben valorarse a dos niveles: intraensayo, representativa de la variabilidad obtenida en las mismas condiciones de trabajo y en un corto intervalo de tiempo, e interensayo, representativa de la variabilidad obtenida en diferentes series analíticas (distintos días, analistas, reactivos, aparatos, etc.).

Para su realización deben hacerse como mínimo tres ensayos. Para ello se prepararon patrones de control de calidad conteniendo cuatro concentraciones distintas de metadona (alta, media, baja y la correspondiente al LLOQ del rango de linealidad establecido) en cada matriz biológica. Estos patrones fueron de 500, 300, 100 y 50 ng/mL para metadona en plasma y de 800, 400, 100 y 50 ng/mL para metadona en saliva. Para cada nivel de concentración y ensayo se analizaron 5 replicados ($n=5$). En cuanto a los criterios de aceptabilidad, la exactitud intra e interensayo expresada como ER (%) debe estar comprendida entre el $\pm 15\%$ del valor de la concentración teórica para cada nivel de concentración, mientras que la precisión intra e interensayo expresada como CV (%) debe ser $\leq 15\%$ del valor de la concentración teórica. Excepcionalmente, solo en el caso del patrón correspondiente al LLOQ, la exactitud puede estar comprendida entre el $\pm 20\%$ del valor de la concentración teórica, y la precisión ser $\leq 20\%$ del valor de dicha concentración.

5.- Recuperación: El ensayo de recuperación determina la eficacia obtenida en el proceso de extracción de analito a partir de la matriz o matrices biológicas utilizadas.

Para la realización del ensayo se analizaron tres replicados de patrones de control de calidad a cuatro niveles de concentración distintos (alta, media, baja y la correspondiente al LLOQ del rango de linealidad establecido) en cada matriz

biológica. Estos patrones fueron de 500, 300, 100 y 50 ng/mL, y de 800, 400, 100 y 50 ng/mL para metadona en plasma y saliva, respectivamente. Se comparó la respuesta del analito extraído de las matrices biológicas con la respuesta de la misma cantidad de analito en matriz simple sin extraer (considerada del 100%). Idealmente, los valores de recuperación obtenidos para cada nivel ensayado deben ser elevados, próximos al 100%.

6.- Estabilidad: La evaluación de la estabilidad debe llevarse a cabo para asegurar que el proceso de pretratamiento y análisis de muestras, así como las condiciones de almacenamiento utilizadas, no afectan a la concentración de analito. Existen muchos factores que pueden afectar a la estabilidad, y puede considerarse que la estabilidad de un analito en un fluido biológico es el resultado de sus condiciones de conservación, de sus propiedades físico-químicas, del tipo de matriz biológica, del recipiente en el que se encuentra y de todas las manipulaciones a las que pueda estar sometido durante la preparación de una muestra. En este sentido, los estudios de estabilidad deben investigar las diferentes condiciones de procesado y almacenamiento durante períodos de tiempo que sean iguales o superiores a los aplicados a las muestras de estudio en la práctica real.

La estabilidad del analito en las matrices estudiadas se evaluó utilizando patrones de control de calidad a 3 concentraciones distintas (alta, media y baja), donde la baja debe ser de un máximo de tres 3 veces el LLOQ y la alta debe aproximarse al ULOQ para cada rango de linealidad establecido. Los patrones de control de calidad utilizados fueron de 500, 300 y 100 ng/mL para metadona en plasma y de 800, 400 y 100 ng/mL para metadona en saliva. Éstos se analizaron por triplicado inmediatamente después del pretratamiento de las muestras (valor basal) y nuevamente tras aplicar las condiciones de trabajo o almacenamiento. Los patrones de control de calidad se analizaron frente a una curva de calibrado, y las concentraciones obtenidas se compararon con las concentraciones basales. Para la aceptación de las pruebas de estabilidad, el error relativo porcentual de la concentración media para cada nivel ensayado debe estar comprendido entre el $\pm 15\%$ del valor de la concentración basal.

La estabilidad de la solución stock de trabajo también fue comprobada, utilizando una dilución apropiada y teniendo en cuenta el rango de linealidad establecido.

El conjunto de ensayos de estabilidad evaluados fueron los siguientes:

- Estabilidad de la solución stock: Varias alícuotas de la solución stock de metadona en agua se congelaron a -32°C durante 1, 2, 3, 6, 9 y 12 meses. Transcurrido el periodo de tiempo correspondiente, y tras dejar descongelar las alícuotas, se realizaron diluciones consecutivas hasta obtener las concentraciones de los patrones de control de calidad. Seguidamente, se procedió a su análisis cromatográfico.
- Estabilidad durante el proceso de congelación/descongelación: Los patrones de control de calidad se congelaron a -32°C y, posteriormente, se dejaron descongelar a temperatura ambiente. A continuación, los patrones se volvieron a congelar aplicando las mismas condiciones. En cada ciclo de congelación, las muestras permanecieron congeladas durante al menos 12 horas antes de la descongelación. Tras repetir este proceso tres veces, se llevó a cabo el análisis de los patrones.
- Estabilidad a corto plazo: Los patrones de control de calidad permanecieron durante 10 horas a la temperatura de procesamiento de muestras (temperatura ambiente) y, a continuación, fueron analizados.
- Estabilidad a largo plazo: Los patrones de control de calidad se congelaron a -32°C y permanecieron bajo estas condiciones durante 15, 30 y 90 días. Pasado el periodo de tiempo correspondiente, se llevó a cabo el análisis de los patrones.
- Estabilidad de las muestras procesadas en las condiciones de almacenamiento: Los patrones de control de calidad se sometieron a pretratamiento, y los extractos líquidos se congelaron -32°C durante 10 días. A continuación, se efectuó el análisis de los patrones.

- Estabilidad de las muestras procesadas en el inyector automático: Los patrones de control de calidad se sometieron a pretratamiento, y los extractos líquidos permanecieron 10 horas en el inyector automático antes de proceder al análisis cromatográfico.

2.5.2. Validación parcial

1.- Linealidad y rango de calibración: El ensayo de linealidad consistió en el análisis de 3 curvas de calibrado de metadona en plasma y saliva constituidas por 7 patrones distintos distribuidos dentro del rango establecido (1000, 800, 600, 400, 200, 100 y 50 ng/mL). Los criterios de aceptabilidad fueron los mismos que los establecidos en la validación completa.

2.- Exactitud y precisión intraensayo: Para su realización se prepararon patrones de control de calidad conteniendo cuatro concentraciones distintas de metadona (alta, media, baja y la correspondiente al LLOQ del rango de linealidad establecido) en cada matriz biológica. Estos patrones fueron de 800, 400, 100 y 50 ng/mL para metadona en plasma y saliva. Para cada nivel de concentración se analizaron 3 replicados (n=3), excepto para el LLOQ, del cual se analizaron 5 replicados (n=5). En cuanto a los criterios de aceptabilidad, éstos fueron los mismos que los establecidos en la validación completa.

2.6. Determinación de la función del error analítico

Diferentes métodos de estimación paramétrica, como los métodos de regresión no lineal, requieren habitualmente la ponderación de los datos primarios a fin de obtener unas buenas estimas de los parámetros de regresión [142].

Es ampliamente conocido que el empleo de diferentes algoritmos de ponderación para una misma serie de datos experimentales puede producir no sólo diferencias en los resultados de predicción en el tiempo, sino también variaciones substanciales en los parámetros estimados, para un mismo modelo farmacocinético.

Por lo tanto, la problemática derivada de la elección del método de ponderación, estándar o clásico ($1/C$, $1/C^2$) o no estándar ($1/\text{varianza}$), no se encuentra totalmente resuelta, y tampoco existe una solución universal para todos los casos [143]. Debido a ello, en los estudios biofarmacéuticos y farmacocinéticos, el empleo de la función del error del método analítico puede constituirse en una alternativa válida de ponderación para resolver el citado problema [144].

No obstante, no es posible predecir la función del error analítico *a priori*, ya que, el error está asociado con características del principio activo, del método analítico y de la técnica utilizada, por lo que esta función tiene que ser determinada [145].

De acuerdo con lo comentado, para la determinación de la funcionalidad del error de los métodos analíticos previamente validados se prepararon 3 rectas de calibrado/día, repitiéndose dicho ensayo durante 4 días. Para cada día y para cada patrón de la recta de calibrado se obtenían los valores de las concentraciones patrón, calculándose la media con su correspondiente desviación estándar.

Seguidamente, mediante análisis de regresión múltiple se buscaba la mejor funcionalización entre los valores de las desviaciones estándar (variable considerada como dependiente) y las concentraciones teóricas de la recta de calibrado (variable independiente). De este modo, el análisis se iniciaba con el polinomio de tercer grado, cuya ecuación general es la siguiente:

$$DE = A_0 + A_1 \cdot C + A_2 \cdot C^2 + A_3 \cdot C^3$$

Donde la *DE* corresponde a la desviación estándar y *C* a los valores de las concentraciones teóricas.

La estrategia utilizada en la selección de variables independientes para el modelo de regresión múltiple fueron los procedimientos *Stepwise* y *Forward* utilizando el programa estadístico Microstat para Windows (EcoSoft Inc., Glendale, CA, USA). El propósito de estos procedimientos es localizar el conjunto de variables que puedan discriminar mejor el modelo analizado [146].

El procedimiento *Stepwise* se fundamenta en la realización de una serie de pasos graduales, en cada uno de los cuales, cada variable dentro del modelo es evaluada para ver si, de acuerdo con los criterios especificados, debe continuar o no dentro del modelo. La naturaleza de este procedimiento gradual es tal que, aunque en un paso se elimine del modelo una variable, ésta se evalúa para un posible reingreso dentro del modelo en los pasos subsecuentes. El procedimiento *Stepwise* utiliza el estadístico F asociado como criterio de evaluación para decidir si la variable debe eliminarse o agregarse al modelo. En cada paso realizado, el programa estadístico calcula F para cada variable dentro del modelo. Si el valor de F para cualquiera de las variables es menor que el valor crítico especificado (4 si no se indica otro valor), entonces se suprime del modelo la variable con el valor menor de F. Se reajusta la ecuación de regresión para el modelo reducido y se pasa al siguiente paso. Si no es posible eliminar ninguna variable, el procedimiento trata de agregar variables. Tras el cálculo del estadístico F para cada nueva variable, se agrega la que tenga el mayor valor F asociado, siempre que éste sea mayor que el valor crítico especificado. Entonces, la ecuación se reajusta para el nuevo modelo y el procedimiento pasa al siguiente paso. El procedimiento termina cuando es imposible agregar o suprimir variables [146].

El procedimiento *Forward*, por otra parte, comienza con la selección de una única variable que es la que produce una mayor discriminación. A continuación, se empareja esa variable con todas las demás para comprobar cuál es el par que produce mejor discriminación. El par obtenido se combina con las variables restantes hasta obtener el mejor triplete y así sucesivamente hasta que las variables que quedan sin seleccionar sean aquellas que no aportan nueva información o lo hagan en una cantidad muy pequeña [146].

2.7. Estudio de los niveles de metadona en plasma y saliva humanos

2.7.1. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en PMM

Diseño del estudio

Estudio abierto prospectivo de monitorización farmacocinética de las concentraciones plasmáticas y salivales de metadona en pacientes incluidos en PMM.

Población de estudio, criterios de inclusión/exclusión y reclutamiento

La población de estudio comprendió pacientes incluidos en PMM pertenecientes al *Centre d'Assistència i Seguiment de Drogodependències (CAS) Osona Salut Mental* del *Consorci Hospitalari de Vic*.

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes participantes en el PMM del *CAS Osona Salut Mental*, los cuales reciben el medicamento por vía oral en forma de comprimidos de 5, 30 y 40 mg.
- Fidelización del paciente con el centro dispensador, ya sea por las visitas médicas como por la provisión de la medicación.

Los criterios de exclusión fueron:

- Variación de la dosis de metadona en los últimos 2 meses.
- No constancia de la información de variación de la dosis.
- Paciente en un periodo de gestación o lactancia.
- Pacientes menores de edad (menos de 18 años).

En el reclutamiento de pacientes voluntarios se obtuvo el consentimiento informado del participante previa hoja de información, tal y como consta en el “Protocolo para la determinación de metadona en matriz sanguínea y salival”, aprobado por el Comité de Ética de Investigación Clínica (CEIC) del Hospital General de Vic.

Tamaño muestral y justificación

Al tratarse de un estudio farmacocinético de monitorización, y teniendo en cuenta la elevada variabilidad de los distintos factores relacionados con metadona y los pacientes que la reciben, el hecho de tener un tamaño muestral adecuado resulta necesario con el fin de poder concluir con unos resultados que permitan realizar inferencia estadística.

El cálculo del tamaño muestral mínimo se realiza utilizando el programa CQC, grupo de programas para el diseño de experimentos (Versión 1.1, Glaxo-Wellcome). Así, considerando que el número de casos activos en PMM a finales de 2009 era de 7103, la máxima imprecisión aceptable de $\pm 6\%$ y considerando un nivel de confianza del 0.95, resulta un tamaño muestral mínimo de 50 pacientes. Se realizó un estudio piloto con un número reducido de pacientes. El periodo de inclusión previsto inicialmente fue de 12 meses.

Descripción de las actividades del estudio

1. Recogida de las principales características de cada paciente

- Género
- Edad
- Peso
- Grupo étnico
- Dosis de metadona recibida
- Medicación concomitante
- Comorbilidad (diabetes, hepatitis y VIH, entre otras)

2. Obtención de muestras

- Muestra plasmática: extracción de 5 mL de muestra sanguínea mediante venopunción. Las muestras se mantuvieron dentro de tubos heparinizados y se centrifugaron a 2500 rpm durante 3 minutos para obtener el plasma separado de las células sanguíneas. Seguidamente, el plasma se transfirió a tubos de plástico y se congeló a -32°C hasta su análisis.

- Muestra salival: obtención de 1 mL de saliva no estimulada mediante el dispositivo específico Salivette®. Éste consta de un tubo de plástico provisto de un algodón cilíndrico en su interior. El algodón se colocó bajo la lengua o entre la mejilla y las encías del paciente durante 3-4 minutos hasta que quedaba saturado con saliva. Tras devolver el algodón al interior del tubo de plástico, el conjunto se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos, la saliva se transfirió a tubos de plástico y se congeló a -32°C hasta su análisis.

Para la construcción de curvas farmacocinéticas plasmáticas y salivales se recogieron muestras de las dos matrices de forma simultánea a los siguientes tiempos: 0 (justo antes de la dosis diaria de metadona), 1, 2, 3, 4, 6, 8, 12, 18 y 24h.

3. Procesamiento y análisis de las muestras

Metadona fue aislada de las muestras biológicas mediante un procedimiento de extracción líquido-líquido (LLE) y el análisis se efectuó mediante la técnica analítica de cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) previamente validada. De acuerdo con la bibliografía consultada, los niveles de metadona esperados en plasma y saliva para conseguir el éxito terapéutico estarían comprendidos dentro del rango de concentraciones validado [3,147].

Plan de análisis farmacocinético

El análisis farmacocinético se realizó a partir de las curvas experimentales de concentración plasmática y salival de metadona en función del tiempo, permitiendo el cálculo de los correspondientes parámetros farmacocinéticos.

a) Niveles plasmáticos

Los niveles plasmáticos de metadona se ajustaron a un modelo bicompartimental extravasal. El modelo bicompartimental supone que el fármaco, una vez que se encuentra en la circulación general, se distribuye de forma muy rápida hacia ciertos sectores del organismo (englobados en el compartimento central) de tal forma que el equilibrio de distribución entre la sangre y esos sectores se alcanza de forma

prácticamente instantánea y que, además, el fármaco se distribuye de forma más lenta hacia otros tejidos (englobados en el compartimento periférico) [148].

Cuando un fármaco se administra por vía extravasal en el modelo bicompartimental clásico, las variaciones instantáneas de concentración de fármaco en cada uno de los compartimientos considerados son procesos de orden uno. A partir de las ecuaciones diferenciales básicas, por transformadas de Laplace, se obtiene la expresión matemática representativa del tránsito del fármaco a través del organismo (**ecuación 1**):

$$C = A_0 \cdot e^{-\alpha t} + B_0 \cdot e^{-\beta t} - P_0 \cdot e^{-ka t} \quad (\text{Ec. 1})$$

Donde α es la constante de rápida disposición, β es la constante de lenta disposición y ka es la constante de absorción.

Se trata de ecuaciones triexponenciales, debido a que se han considerado tres compartimientos, uno externo (lugar donde se produce el proceso de absorción) y dos internos (compartimento central y compartimento periférico). En estas ecuaciones, generalmente uno de los coeficientes vendrá afectado por un signo negativo, el cual afectará a la exponencial correspondiente al proceso más rápido y dependerá de los valores absolutos de las constantes que configuran el coeficiente.

A través del método de los residuales se calcularon ka , α , β , A_0 , B_0 y P_0 . A partir de β , se consideró como semivida biológica de eliminación el valor de $t_{\beta 1/2}$ cuya expresión es: $t_{\beta 1/2} = \ln 2 / \beta$. Asimismo, la semivida biológica de rápida disposición se calculó a partir de α , cuya expresión es: $t_{\alpha 1/2} = \ln 2 / \alpha$. El área bajo la curva (AUC_0^T) de las concentraciones plasmáticas se estimó por el método de los trapezoides hasta T o el último tiempo de concentración cuantificable. La fracción final del área se calculó mediante la expresión: $AUC_t^\infty = C_t / \beta$, donde C_t es valor de la concentración plasmática correspondiente al último punto experimental. El aclaramiento total (CL/F) se estimó a partir de la expresión: $CL/F = D/AUC$, siendo D la dosis diaria de metadona administrada y F la biodisponibilidad oral. El volumen de distribución en la fase β ($Vd\beta/F$) se calculó mediante la fórmula: $Vd\beta/F = D/\beta \cdot AUC$.

Las concentraciones máxima y mínima en el estado estacionario [$C_{\max}(ss)$, $C_{\min}(ss)$], y el tiempo para alcanzar $C_{\max}(ss)$ [$t_{\max}(ss)$] se calcularon por ordenador aplicando las fórmulas apropiadas [149]. La concentración plasmática media en estado estacionario [$C_{p\text{media}}(ss)$] se obtuvo a partir de la expresión: $C_{p\text{media}}(ss) = AUC_0^T/\tau$, donde τ es el intervalo de dosificación.

b) Niveles salivales

La disposición farmacocinética de metadona en saliva se estimó considerando un único compartimento extravasal, en el cual se supuso el ingreso de fármaco mediante una constante de incorporación y otra de desaparición, ambas de primer orden.

En este supuesto, se consideraron dos compartimentos, uno externo (lugar donde se produce el proceso de absorción) y otro interno (saliva). Al considerar dos compartimentos, la ecuación que rige la farmacocinética será biexponencial (**ecuación 2**), en la que uno de los dos exponenciales será negativo por corresponder a un compartimento externo:

$$C = C_0 \cdot e^{-kd t} - A_0 \cdot e^{-ki t} \quad (\text{Ec. 2})$$

Donde kd es la constante de desaparición y ki es la constante de incorporación.

Las constantes kd y ki y los coeficientes C_0 y A_0 se calcularon por el método de los residuales. A partir de kd se obtuvo la semivida de desaparición, utilizando la expresión: $t_{1/2} = \ln 2/kd$. El AUC_0^T se estimó por el método de los trapezoides, mientras que la fracción final del área se calculó mediante la expresión: $AUC_t^\infty = C_t / kd$. El CL/F se estimó a partir de la expresión: $CL/F = D/AUC$, y el volumen de distribución (Vd/F) se calculó mediante la fórmula: $Vd/F = D/kd \cdot AUC$.

Las concentraciones máxima y mínima en el estado estacionario [$C_{\max}(ss)$, $C_{\min}(ss)$], y el tiempo para alcanzar $C_{\max}(ss)$ [$t_{\max}(ss)$] se calcularon por ordenador aplicando las fórmulas apropiadas [149]. La concentración salival media en estado estacionario [$C_{s\text{media}}(ss)$] se obtuvo a partir de la expresión: $C_{s\text{media}}(ss) = AUC_0^T/\tau$.

Plan de análisis estadístico

El procesamiento estadístico de la información se realizó utilizando el programa estadístico Deducer para Windows versión 2.15.0 (Fellow Statistics, San Diego, CA, USA) mediante la obtención de valores medios, desviaciones estándar e intervalos de confianza al 95% (IC 95) de los parámetros farmacocinéticos. La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilk. Las diferencias estadísticas se estimaron a través de la prueba H de Kruskal -Wallis (p -valor <0.05). Por último, para establecer la correlación entre las variables se empleó el coeficiente de correlación de Pearson.

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por el CEIC del Hospital General de Vic y por la Comisión de Bioética de la Universitat de Barcelona (CBUB).

El equipo investigador del proyecto, incluido el doctorando, se comprometieron a:

- Mantener la confidencialidad de los datos obtenidos en el proyecto, y a que los datos personales de los sujetos participantes no serían conocidos por los investigadores del proyecto. En casos concretos, éstos informarían al responsable médico o a los afectados si creyeran que algún resultado del proyecto pudiese ser de su interés.
- No utilizar las muestras para otros estudios distintos al del presente proyecto y no traspasar las muestras a otros posibles proyectos o equipos de investigación. En este último supuesto, se solicitaría antes el correspondiente informe de la Comisión.

Por otro lado, en el presente proyecto no tuvo compensación económica ni el equipo investigador ni los sujetos participantes.

2.7.2. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en terapia del dolor

Diseño del estudio

Estudio abierto prospectivo de monitorización farmacocinética de las concentraciones salivales de metadona en pacientes bajo terapia del dolor.

Población de estudio, criterios de inclusión/exclusión y reclutamiento

La población de estudio comprendió pacientes incluidos en terapia del dolor tratado con metadona pertenecientes a la Unidad Interdisciplinaria de Dolor del Hospital de Clínicas “Dr. Manuel Quintela” de Montevideo, Uruguay.

Los criterios de inclusión fueron:

- Pacientes en terapia del dolor atendidos en el Hospital de Clínicas, los cuales reciben el medicamento por vía oral en forma de comprimidos de 10 mg.

Los criterios de exclusión fueron:

- Variación de la dosis de metadona en los últimos 15 días.
- No constancia de la información de variación de la dosis.
- Retirada voluntaria del estudio por razones personales del paciente.
- Pacientes en un periodo de gestación o lactancia.
- Pacientes menores de edad (menos de 18 años).
- Falta de adherencia al protocolo establecido.

En el reclutamiento de pacientes voluntarios se obtuvo el consentimiento informado del participante previa lectura y comprensión de la hoja de información, tal y como consta en el “Protocolo del estudio de concentraciones de metadona en pacientes bajo terapia del dolor”, aprobado por la Comisión de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Química de la Universidad de la República.

Tamaño muestral y justificación

El tamaño muestral se estableció de forma que éste fuera el número máximo de pacientes que se pudieran incluir en el estudio durante el periodo en el que éste se llevó a cabo, que fue de 4 meses.

Descripción de las actividades del estudio

1. Recogida de las principales características de cada paciente
 - Género
 - Edad
 - Peso
 - Altura
 - Dosis de metadona recibida
 - Medicación concomitante
 - Comorbilidad (diabetes, hipertensión, depresión, entre otras)
 - Tiempo exacto de ingesta de alimentos durante el periodo de toma de muestras

2. Obtención de muestras
 - Muestra plasmática: extracción de 5-10 mL de muestra sanguínea mediante venopunción. Las muestras se mantuvieron dentro de tubos heparinizados y se centrifugaron a 2500 rpm durante 3 minutos para obtener el plasma separado de las células sanguíneas. Seguidamente, el plasma se transfirió a tubos de plástico y se congeló a -32°C hasta su análisis.

 - Muestra salival:
 - Saliva estimulada y fraccionada utilizando ácido cítrico: obtención de 1 mL de saliva colocando una pequeña cantidad de ácido cítrico en la lengua del paciente. Tras la estimulación, se recogieron muestras salivares consecutivas dentro de tubos de plástico en dos fracciones: S1 (primera fracción), procedente de la parte inferior de los conductos salivares; y S2 (segunda fracción), procedente de la parte superior de los conductos salivales. Las fracciones intermedias entre S1 y

S2 se descartaron, y los tubos con las muestras se congelaron a -32°C hasta su análisis.

- Saliva no estimulada utilizando Salivette®: obtención de 1 mL de saliva mediante el dispositivo específico Salivette®. Éste consta de un tubo de plástico provisto de un algodón cilíndrico en su interior. El algodón se colocó bajo la lengua o entre la mejilla y las encías del paciente durante 3-4 minutos hasta que quedaba saturado con saliva. Tras devolver el algodón al interior del tubo de plástico, el conjunto se centrifugó a 2500 rpm durante 5 minutos, la saliva se transfirió a tubos de plástico y se congeló a -32°C hasta su análisis.
- Saliva estimulada y no fraccionada utilizando ácido cítrico: obtención de 1 mL de saliva colocando una pequeña cantidad de ácido cítrico en la lengua del paciente y manteniéndola en la boca durante 30-60 segundos antes de escupir la muestra salival en un tubo de plástico. Los tubos se congelaron a -32°C hasta su análisis.

Para la determinación de la relación S/P de metadona se recogieron muestras de plasma y saliva de forma simultánea a tiempo 0 (justo antes de la dosis diaria de metadona). En la recogida de saliva se utilizaron las dos primeras técnicas descritas. Finalmente, a predosis se obtuvieron tres muestras salivales (S1, S2 y Salivette®) y una plasmática.

Para la construcción de curvas farmacocinéticas salivales se recogieron muestras de saliva aplicando el segundo y tercer método de recogida de muestras en días distintos. Los tiempos de recogida de muestras dependieron de la pauta posológica de metadona establecida por el médico para cada uno de los pacientes. Así pues, en función de si la toma de metadona se realizaba 1, 2 ó 3 veces al día, los tiempos de muestreo fueron:

1/8h: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 y 8h

1/12h: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10 y 12h

1/24h: 0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 12, 14, 16 y 24h

3. Procesamiento y análisis de las muestras

Metadona fue aislada de las muestras biológicas mediante un procedimiento de LLE y el análisis se efectuó mediante la técnica analítica HPLC, una vez realizada la validación parcial en el nuevo laboratorio de análisis.

Plan de análisis estadístico

El procesamiento estadístico de la información se realizó utilizando el programa estadístico Deducer para Windows versión 2.15.0 (Fellow Statistics, San Diego, CA, USA) mediante la obtención de valores medios, desviaciones estándar e intervalos de confianza al 95% (IC 95) de los parámetros farmacocinéticos. La normalidad de los datos se comprobó mediante el test de Shapiro-Wilk. Las diferencias estadísticas se estimaron a través de la prueba de signos de Wilcoxon (p-valor <0.05). Por último, para establecer la correlación entre las variables se empleó el coeficiente de correlación de Pearson.

Aspectos éticos

El estudio fue aprobado por la Comisión de Ética de Investigación en Seres Humanos de la Facultad de Química de la Universidad de la República.

Los resultados de los exámenes médicos y bioquímicos practicados a los sujetos se dieron a conocer a los pacientes, y fueron guardados confidencialmente por los investigadores principales del estudio.

Por otro lado, en el presente proyecto no tuvo compensación económica ni el equipo investigador ni los sujetos participantes.

IV. RESULTADOS

IV. RESULTADOS

1. Desarrollo de las metodías analíticas

Como primeros resultados, se adjuntan las **Tablas 16** y **17**, relativas a la revisión bibliográfica sobre metodías analíticas publicadas para la cuantificación de metadona en plasma y saliva, respectivamente, orientativas para llevar a cabo el desarrollo y posterior validación de las técnicas cromatográfica por HPLC-UV.

En dichas tablas se resumen las características más relevantes de cada método de bioanálisis, incluyendo el volumen de muestra utilizado, el tipo de pretratamiento de muestra, las fases estacionaria y móvil usadas, la velocidad de flujo de la fase móvil, la temperatura del equipo de análisis, el tipo de detección utilizado junto con la longitud de onda de máxima absorción, la eficacia de extracción de metadona a partir de la matriz correspondiente y el límite inferior de cuantificación establecido durante la validación de cada método. Además, y sólo en el caso de la **Tabla 17**, correspondiente a metodías HPLC para la determinación de metadona en saliva, se incluyen también las técnicas o dispositivos de recogida de muestras salivales empleados.

Tabla 16. Métodos bioanalíticos HPLC para la determinación de metadona en sangre/suero/plasma.

Referencia	Método								
	Volumen muestra	Preparación	Fase estacionaria	Fase móvil	Flujo (mL/min)	T (°C)	Detección y λ máx. (nm)	Recuperación \pm DE (%)	LLOQ (ng/mL)
150*	2 mL sangre	LLE [10 mL hexano: isopropanol (99:1) ^a]	Phase Separations Spherisorb S-5-ODS (250 x 4.6 mm i.d.) ^b	ACN: metanol: 20 mL 85% H ₃ PO ₄ en 1980 mL agua + 3.7 mL ácido metasulfónico pH 3 (48:48:4) ^a	2.0	60	UV (220)	90.6 \pm 4.6	100
151	0.5 mL plasma	LLE (3.5 mL 2% butanol en n-hexano)	Chiral-AGP (100 x 4.6 mm i.d.) ^c	16% ^a ACN en NaH ₂ PO ₄ pH 6.6	0.6 - 0.8	-	UV (212)	95.0 ^e	10 ^f
152	2 mL plasma	LLE (5 mL cloruro de n-butilo)	Apex-I 5- μ m (250 x 4.6 mm i.d.) ^d	metanol: 1,2-dicloroetano: isopropanol: perclorato amónico en agua 100g/L (90.5:5:4:0.5) ^a	2.0	-	UV (215)	98.4 \pm 5.2	10
153	0.9 mL plasma	SPE	Ultracarb ODS 30- μ m (150 x 4.6 mm i.d.) ^b	ACN: 0.08% dietilamina pH 2.3 (25:75) ^a	1.5	28	UV (210)	90.3 \pm 3.2	50
154	2 mL plasma	LLE [5.75 mL n-hexano: alcohol isoamílico (99:1) ^a]	Chiral-AGP 5- μ m (100 x 4.0mm i.d.) ^c	2-propanol:tampón fosfato 0.01 M pH 6 (9,5:90,5) ^a	0.6	20	UV (215)	93.0 ^e	2.5 ^f
155	1 mL suero	LLE (6 mL n-hexano)	Chiral-AGP 5- μ m (100 x 4.0mm i.d.) ^c	tampón fosfato sódico 10 mM pH 5.0: ACN: DMOA (900:100:0.5) ^a	0.9	-	UV (200)	90.0 ^e	1.7 ^f
156	1 mL plasma	LLE (10 mL 2% butanol en heptano)	Cyclobond Type I-Beta RSP ^c	ACN: metanol: 1% Et ₃ N pH 6.0 (20:5:75) ^a	0.6	18	UV (210)	83.0 ^e	5 ^f
157	0.5 mL plasma	LLE (3.5 mL n-hexano)	Supelcosil LC-ABZ 5- μ m (50 x 4.6 mm i.d.) ^b	tampón fosfato 25mM pH 2.5: ACN (78.5: 21.5) ^a	1.5	20	UV (206)	77.5	10
158	1 mL plasma	LLE [6 mL n-heptano: etil acetato (80:20) ^a]	Cyclobond I RSP (250 x 4.6 mm i.d.) ^c	ACN: tampón Et ₃ N pH 3 (10:90) ^a	1.0	-	UV (200)	90.0 ^e	10 ^f
159	3 mL sangre	SPE	Chiral-AGP 5- μ m (100 x 4.0 mm i.d.) ^c	isopropanol: tampón fosfato 10 mM pH 6.6:DMOA (900:100:1) ^a	0.6	20	UV (205)	76 ^e	25 ^f

Tabla 16. Métodos bioanalíticos HPLC para la determinación de metadona en sangre/suero/plasma (continuación).

Referencia	Método								
	Volumen muestra	Preparación	Fase estacionaria	Fase móvil	Flujo (mL/min)	T (°C)	Detección y λ máx. (nm)	Recuperación \pm DE (%)	LLOQ (ng/mL)
160	0.1 mL suero	LLE (4 mL hexano)	Cyclobond-I-2000 RSP 5- μ m (250 x 4.6 mm i.d.) ^c	ACN: tampón acetato de Et ₃ N pH 4.5 :agua (19:8:73) ^a	0.4	18 - 20	UV (210)	93.5 ^e	50 ^f
161	0.5 mL plasma	LLE [5 mL dietil éter: hexano (30:70) ^a]	Nova-Pak C18 4- μ m (100 x 5.0mm i.d.) ^b	ACN: 0.2% Et ₃ N en NaH ₂ PO ₄ 50mM pH 5 (35:65) ^a	1.0	-	UV (210)	-	30
162	1 mL suero/sangre	LLE [5 mL hexano: alcohol isoamílico (99:1) ^a] y SPE	Chiral-AGP 5- μ m (100 x 4.0mm i.d.) ^c	tampón fosfato 10mM + 0.1% DMOA pH 6.6: 2-propanol (90:10) ^a	0.6	25	UV (205)	88.0 ^e suero/ 77.0 ^e sangre	25 ^f
163	2 mL suero	LLE (10 mL hexano)	Cyclobond-I-2000 RSP 5- μ m (250 x 4.6 mm i.d.) ^c	ACN: Et ₃ N pH 5 (40:60) ^a	0.3	25	UV (220)	87.0 ^e	2.5 ^f
164	1 mL plasma	LLE [6 mL dietil éter: hexano (30:70) ^a]	Cyclobond-I-2000 RSP 5- μ m (250 x 4.6 mm i.d.) ^c	metanol: ACN: 1% Et ₃ N pH 6 (9:11:80) ^a	1.0	-	DAD (210)	100.8 ^e	15 ^f
165	0.5 mL plasma	<i>On-line</i> SPE	Chiralcel OJ-R 5- μ m (150 x 2.1mm i.d.) ^c	ACN: 0.02% Et ₃ N (65:35) ^a	0.25	25	ESI-MS	-	0.5 ^f
166	0.1 mL plasma	<i>On-line</i> SPE	Purospher STAR RP-18e 3- μ m (55 x 2 mm i.d.) ^b	1% ácido fórmico: ACN (65:35) ^a	0.25	25	MS	90.0 - 110.0	10
167	1 mL plasma	LLE [10 mL heptano:alcohol isoamílico (95:5) ^a]	Cyclobond-I-2000 RSP 5- μ m (250 x 4.6 mm i.d.) ^c	1% Et ₃ N pH 6: metanol: ACN (750:50:250) ^a	0.6	-	UV (210)	80.0 ^e	25 ^f
168	0.1 mL plasma	LLE (400 μ L hexano)	Chiral-AGP 5- μ m (50 x 2.0mm i.d.) ^c	12% alcohol isopropílico en acetato amónico 10mM	0.4	45	MS	70.6 ^e	5 ^f
169	0.1 mL plasma	Precipitación proteica + <i>On-line</i> SPE	Chiral-AGP 5- μ m (100 x 2.0mm i.d.) ^c	formiato amónico 20 mM pH 5.7: metanol (90:10) ^a	0.22	-	MS	99.0 ^e	0.1 ^f

Tabla 16. Métodos bioanalíticos HPLC para la determinación de metadona en sangre/suero/plasma (continuación).

Referencia	Método								
	Volumen muestra	Preparación	Fase estacionaria	Fase móvil	Flujo (mL/min)	T (°C)	Detección y λ máx. (nm)	Recuperación \pm DE (%)	LLOQ (ng/mL)
170	0.25 mL suero	LLE (2 mL 1-clorobutano)	Chiral-AGP 5- μ m (100 x 3.0mm i.d.) ^c	2.5% ACN en tampón acetato amónico 5 mM pH 4.1	0.5	-	MS/MS	-	1.5 ^f
171	1 mL plasma	SPE	Zorbax SB-C18 5- μ m (150 x 4.6 mm i.d.) ^b	agua: ACN (60:40) ^a + 0.1mL TFA/ L de fase móvil	-	40	UV (215)	75.0 \pm 19.0	20
172	1 mL plasma	SPE	Chiral-AGP 5- μ m (100 x 4.0mm i.d.) ^c	ACN: tampón acetato amónico 10mM pH 7.0 (18:82) ^a	0.9	25	MS	99.0 ^e	1 ^f
173*	1 mL plasma	SPE	Zorbax Bonus 5- μ m (150 x 4.6mm i.d.) ^b	(A) ACN y (B) formiato amónico 5mM en agua pH 4.0 en gradiente	1.0	25	MS/MS	80.7	5
103	0.2 mL plasma	LLE (8 mL n-hexano)	Luna C18 3- μ m (100 x 4.60mm i.d.) ^b	ACN: tampón acetato amónico 10mM pH 5.5 (25:75) ^a	1.0	-	MS	-	10
174*	1 mL plasma	SPE	XTerra RP8 5- μ m (250 x 4.6mm i.d.) ^b	(A) ACN y (B) tampón fosfato 0.02M pH 6.5 en gradiente	0.8	-	DAD (292)	94.9 \pm 5.3	100
175*	1 mL plasma	SPE	Phenomenex C12 MAX-RP 4- μ m (150 x 2.0 mm i.d.) ^b	(A) agua y (B) ACN con formiato amónico 5 mM pH 3.5 en gradiente	0.2	-	ESI-MS/MS	58.9	2.3
176	0.5 mL plasma	SPE	Sunfire 3.5- μ m (30 x 2.1 mm i.d.) ^b	(A) ACN y (B) 0.1% ácido fórmico en gradiente	0.6	25	ESI-MS	83.8	2
177	0.3 mL plasma	SPE	Microsorb-MV C8 5- μ m (250 x 4.6 mm i.d.) ^b	metanol: ACN: tampón fosfato 60mM + 0.5% Et ₃ N (50:10:40) ^a pH 6	1.0	-	DAD (214)	97.7	1
178	0.2 mL plasma	Precipitación proteica + <i>On-line</i> SPE	Synergi Hydro-RP 80A 4- μ m (50 x 2.0 mm i.d.) ^b	(A) acetato amónico 10 mM en agua + 0.001% ácido fórmico pH 4.5 y (B) ACN en gradiente	0.2	-	APCI-MS/MS	87.5 \pm 5.0	1

Tabla 16. Métodos bioanalíticos HPLC para la determinación de metadona en sangre/suero/plasma (continuación).

Referencia	Método								
	Volumen muestra	Preparación	Fase estacionaria	Fase móvil	Flujo (mL/min)	T (°C)	Detección y λ máx. (nm)	Recuperación \pm DE (%)	LLOQ (ng/mL)
179	0.1 mL plasma	LLE (3 mL metil tert-butil éter)	Chiral-AGP 5- μ m (50 x 2.0mm i.d.) ^c	(A) acetato amónico 10mM y (B) metanol en gradiente	0.2	30	ESI-MS/MS	-	2.5 ^f
180	0.1 mL plasma	Precipitación proteica + <i>On-line</i> SPE	Chiralcel OJ-R 5- μ m (150 x 2.1mm i.d.) ^c	ACN: 0.02% Et ₃ N (65: 35) ^a	0.25	25	MS	-	5 ^f
181*	0.1 mL suero	Precipitación proteica + <i>On-line</i> SPE	Allure PFP 3- μ m (30 x 2.1 mm i.d.) ^d	(A) 0.1% ácido fórmico + formiato amónico 1mM y (B) ACN + 0.1% ácido fórmico + formiato amónico 1mM en gradiente	0.2 - 0.7	40	MS/MS	90.0	1.3
182*	1 mL sangre	LLE (600 μ L butil acetato)	Gemini C18 3- μ m (100 x 2.0mm i.d.) ^b	(A) ACN + 0.1% ácido fórmico y (B) tampón acetato amónico pH 3.2 en gradiente	0.15	35	MS/MS	-	0.1
183*	0.5 mL sangre	SPE	HyPURITY C8 5- μ m (100 x 4.6 mm i.d.) ^b	(A) metanol en agua (95:5) ^a con acetato amónico 25 mM y (B) metanol: propan-2-ol (97.95:2) ^a con ácido fórmico 0.05mM en gradiente	0.8	30	MS/MS	-	50
184	0.5 mL plasma	DLLME	Reprosil-Pur C18-AQ 10- μ m (250 x 4.6 mm i.d.) ^b	0.1% TFA en metanol: agua (60:40) ^a	1.0	-	UV (205)	96.9	25

*análisis cualitativo (solamente detección); ^aProporciones expresadas en volumen/volumen (v/v); ^bColumna analítica aquiral de fase reversa; ^cColumna analítica quiral de fase reversa; ^dColumna analítica aquiral de fase normal; ^eRecuperación media de los enantiómeros de metadona; ^fLLOQ determinado para cada enantiómero de metadona; λ máx. = longitud de onda del máximo de absorción; ACN = acetonitrilo; APCI = *Atmospheric Pressure Chemical Ionization*; DAD = *Diode Array Detector*; DLLME = *Dispersive Liquid-Liquid Microextraction*; DMOA = N,N-dimetil octilamina; ESI = *Electrospray Ionization*; Et₃N = trietilamina; HPLC = *High Performance Liquid Chromatography*; LLE = extracción líquido-líquido; LLOQ = *Lower Limit of Quantification*; MS = espectrofotometría de masas; SPE = extracción en fase sólida; T = temperatura; TFA = ácido trifluoroacético; UV = espectrofotometría de ultravioleta.

Tabla 17. Métodos bioanalíticos HPLC para la determinación de metadona en saliva/fluido oral.

Referencia	Método								
	Volumen muestra	Obtención	Preparación	Fase estacionaria / fase móvil	Flujo (mL/min)	T (°C)	Detección y λ máx. (nm)	Recuperación \pm DE (%)	LLOQ (ng/mL)
147	1 mL	Estimulación	SPE	Apex-I 5- μ m (250 x 4.6 mm i.d.) ^d / metanol: 1,2-dicloroetano: isopropanol: perclorato amónico en agua 100g/L (90.5:5:4:0.5) ^a	2.0	-	UV (215)	-	-
185	0.1 - 1.5 mL	Salivette®	Filtración	Nucleosil 100 C18 AB 5- μ m (125 x 2 mm i.d.) ^b / 0.1% TFA en agua : ACN (60:40) ^a	0.25	25	MS	100.1	50
186*	0.2 mL	-	Precipitación proteica	Synergi Polar RP 4- μ m (150 x 2.0 mm) ^b / (A) formiato amónico 10 mM en agua + 0.001% ácido fórmico (pH 4.5) y (B) ACN en gradiente	0.3	-	APCI-MS/MS	100.9	1
187	0.5 mL	Salivette®	Centrifugación	Chiral-AGP 5- μ m (100 x 4.0 mm i.d.) ^c / ACN : tampón acetato amónico 10 mM pH 7 (18:82) ^a	0.9	25	API-ES-MS	98.0 ^e	5 ^f
188*	1 mL	-	LLE (3 x 5 mL diclorometano)	Luna C18 5- μ m (150 x 4.6 mm i.d.) ^b / (A) metanol : agua : ácido fórmico (80:20:0.1) ^a y (B) metanol : agua : ácido fórmico (20:80:0.1) ^a en gradiente	0.5	-	ESI-MS	79.6 \pm 2.3	-
189*	1 mL	Intercept®	Centrifugación	HyPURITY C8 5- μ m (50 x 3 mm i.d.) ^b / (A) acetato amónico 25 mM en 5% metanol y (B) 98% metanol + 0.05% ácido fórmico + 2% de propan-2-ol en gradiente	0.8	-	MS/MS	-	5
103	0.2 mL	Sin estimulación	LLE (8 mL n-hexano)	Luna C18 3- μ m (100 x 4.60 mm i.d.) ^b / ACN: tampón acetato amónico 10 mmol/L pH 5.5 (25:75) ^a	1.0	-	MS	-	10
190*	1 mL	Omni-Sal®	SPE	Luna C18(2) 3- μ m (150 x 2 mm i.d.) ^b / (A) formiato amónico 3mM + 0.001% ácido fórmico en agua y (B) ACN en gradiente	0.3	35	MS/MS	96.0 \pm 9.0	2.2

Tabla 17. Métodos bioanalíticos HPLC para la determinación de metadona en saliva/fluido oral (continuación).

Referencia	Método								
	Volumen muestra	Obtención	Preparación	Fase estacionaria / fase móvil	Flujo (mL/min)	T (°C)	Detección y λ máx. (nm)	Recuperación \pm DE (%)	LLOQ (ng/mL)
191*	1 mL	Quantisal®	SPE	XTerra MS C18 3.5- μ m (2.1 x 150 mm i.d.) ^{b/} (A) bicarbonato amónico 10 mM pH 10 y (B) metanol en gradiente	0.25	-	ESI-MS/MS	102.4	1
192*	0.5 mL	Intercept®	LLE [1.3 mL etilacetato: heptano (1:4) ^{a/}	Atlantis dC18 3.5- μ m (50 x 2.1 mm i.d.) ^{b/} (A) ACN y (B) acetato amónico acuoso 5 mM pH 5 en gradiente	0.3	35	MS/MS	58.0	4
193*	0.5 mL	StatSure Saliva-Sampler®	SPE	Atlantis dC18 3- μ m (50 x 2.1 mm i.d.) ^{b/} (A) 0,1% ácido fórmico en agua y (B) ACN en gradiente	0.3	35	ESI-MS/MS	75.4	5
194*	1 mL	Salivette®	LLE (Toxītubes A®)	XTerra RP8 5- μ m (250 x 4.6mm i.d.) ^{b/} ACN : tampón fosfato 0.02 M pH 6.5 (10:90) ^{a/}	0.7 - 0.8	-	DAD (292)	77.0	50
195*	0.2 g	StatSure Saliva-Sampler®	SPE	Acquity HSS T3 C18 1.8- μ m (100 x 2.1 mm i.d.) ^{b/} (A) acetato amónico 2 mM pH 6.2 y (B) metanol en gradiente	0.4	35	MS/MS	88.0 \pm 11.0	20
196*	0.6 mL	StatSure Saliva-Sampler®	LLE (Toxītubes A®)	Atlantis T3 3- μ m (100 x 2.1 mm i.d.) ^{b/} (A) ACN + tampón formiato amónico 2 mM pH 3.4 (95:5) ^{a/} y (B) tampón formiato amónico 2 mM pH 3.4 + ACN (95:5) ^{a/} en gradiente	0.3	35	MS/MS	73	1.4
197*	0.25 mL	Esp̄uto / Salivette®	Precipitación proteica	Synergi Polar RP 80A 4- μ m (75 x 2.0 mm i.d.) ^{b/} (A) 0.1% ácido fórmico en agua y (B) 0.1% ácido fórmico en ACN en gradiente	0.2	-	MS/MS	106.6 / 47.4 - 50.8	1
198	0.2 mL	Salivette®	Precipitación proteica	Synergi Polar RP 4- μ m (150 x 2.0 mm) ^{b/} (A) formiato amónico 10 mM en agua + 0.001% ácido fórmico (pH 4.5) y (B) ACN en gradiente	0.3	-	APCI-MS/MS	-	1

Tabla 17. Métodos bioanalíticos HPLC para la determinación de metadona en saliva/fluido oral (continuación).

Referencia	Método								
	Volumen muestra	Obtención	Preparación	Fase estacionaria / fase móvil	Flujo (mL/min)	T (°C)	Detección y λ máx. (nm)	Recuperación \pm DE (%)	LLOQ (ng/mL)
199*	0.5 mL	Quantisal®	LLE [hexano : etil acetato (1:4) ^a]	Pinnacle DB C18 3- μ m (100 x 2.1 mm i.d.) ^b / (A) acetato amónico 10 mM + 0.1% ácido fórmico en agua y (B) 0.1% ácido fórmico en ACN en gradiente	-	-	ESI-MS/MS	-	2
200*	0.5 mL	Intercept® / StatSure Saliva-Sampler®	LLE [1.3 mL etilacetato: heptano (1:4) ^a]	Acquity HSS T3 C18 1.8- μ m (100 x 2.1 mm i.d.) ^b / (A) tampón formiato amónico 10 mM pH 3.1 y (B) metanol en gradiente	0.5	65	MS/MS	-	0.6
201*	0.25 mL	Salivette® / Cozart Rapiscan® / Rapid STAT®	25 μ L MIXDRUGS D-3	Kinetex C18 2.6- μ m (100 x 2.1 mm i.d.) ^b / (A) formiato amónico 5 mM + 0.05% ácido fórmico y (B) metanol : ACN (1:1) ^a + 0.1% ácido fórmico en gradiente	0.5	-	ESI-MS/MS	-	5
184	0.1 mL	Salivette®	DLLME	Reprosil-Pur C18-AQ 10- μ m (250 x 4.6 mm i.d.) ^b / 0.1% TFA en metanol: agua (60:40) ^a	1.0	-	UV (205)	99.4	85

*análisis cualitativo (solamente detección); ^aProporciones expresadas en volumen/volumen (v/v); ^bColumna analítica quiral de fase reversa; ^cColumna analítica quiral de fase reversa; ^dColumna analítica quiral de fase normal; ^eRecuperación media de los enantiómeros de metadona; ^fLLOQ determinado para cada enantiómero de metadona; λ máx.= longitud de onda del máximo de absorción; ACN = acetonitrilo; APCI = Atmospheric Pressure Chemical Ionization; API-ES = Atmospheric Pressure Ionization Electrospray; DAD = Diode Array Detector; DLLME = Dispersive Liquid-Liquid Microextraction; ESI = Electrospray Ionization; HPLC = High Performance Liquid Chromatography; LLE = extracción líquido-líquido; LLOQ = Lower Limit Of Quantification; MS = espectrofotometría de masas; SPE = extracción en fase sólida; T = temperatura; TFA = ácido trifluoroacético; TID = Thermionic Ionization Detector; UV = espectrofotometría de ultravioleta.

2. Condiciones cromatográficas

Los cromatogramas de metadona en plasma y saliva fueron resueltos y cuantificados de manera rápida y adecuada, con un tiempo de retención aproximado de 5.2 minutos. El volumen de inyección de muestra fue de 100 μ L, el tiempo de cromatograma se estableció en 7.5 minutos y los análisis se efectuaron a temperatura de 25°C. En la **Tabla 18** se encuentran detalladas las condiciones cromatográficas de metadona en las matrices ensayadas.

Tabla 18. Condiciones cromatográficas de metadona en plasma y saliva.

Matriz	Flujo (mL/min)	Acetonitrilo (%)	Tampón fosfato (%)	Volumen inyección (μ l)	Detector UV (nm)	Tiempo respuesta (min)	Tiempo análisis (min)
Plasma/ Saliva	1.0	25	75	100	215	5.2	7.5

3. Validación de las metódicas analíticas

3.1. Validación completa

Selectividad

a) Evaluación de interferencias endógenas

Los cromatogramas representativos de metadona en plasma y saliva humana se muestran en la **Figura 5**.

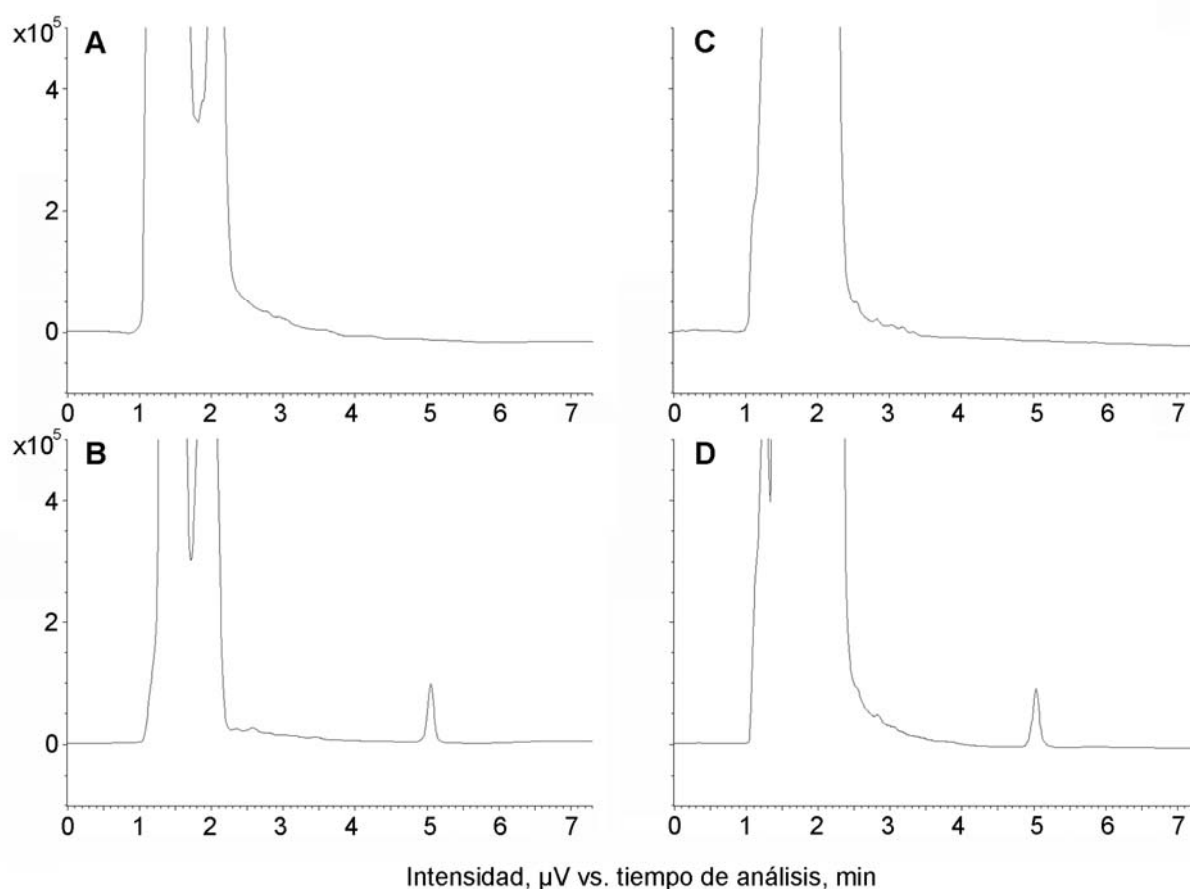


Figura 5. Cromatogramas representativos de (A) blanco de plasma; (B) plasma conteniendo 50 ng/mL de metadona; (C) blanco de saliva, y (D) saliva conteniendo 50 ng/mL de metadona (tiempo de retención para metadona = 5.2 min; tiempo total de análisis = 7.5 min).

En la figura se observa la ausencia de pico de metadona en las muestras blanco de plasma (A) y saliva (C), mientras que dicho pico aparece a un tiempo de retención de 5.2 min en las muestras que contenían 50 ng/mL de metadona en plasma (B) y saliva (D).

b) Evaluación de interferencias exógenas

La **Figura 6** muestra el cromatograma de un patrón de plasma blanco al que se han añadido 1000 ng/mL de metadona y 500 ng/mL de alprazolam, clonazepam, diazepam, lorazepam, abacavir, efavirenz, lamivudina, ritonavir, saquinavir y estavudina.

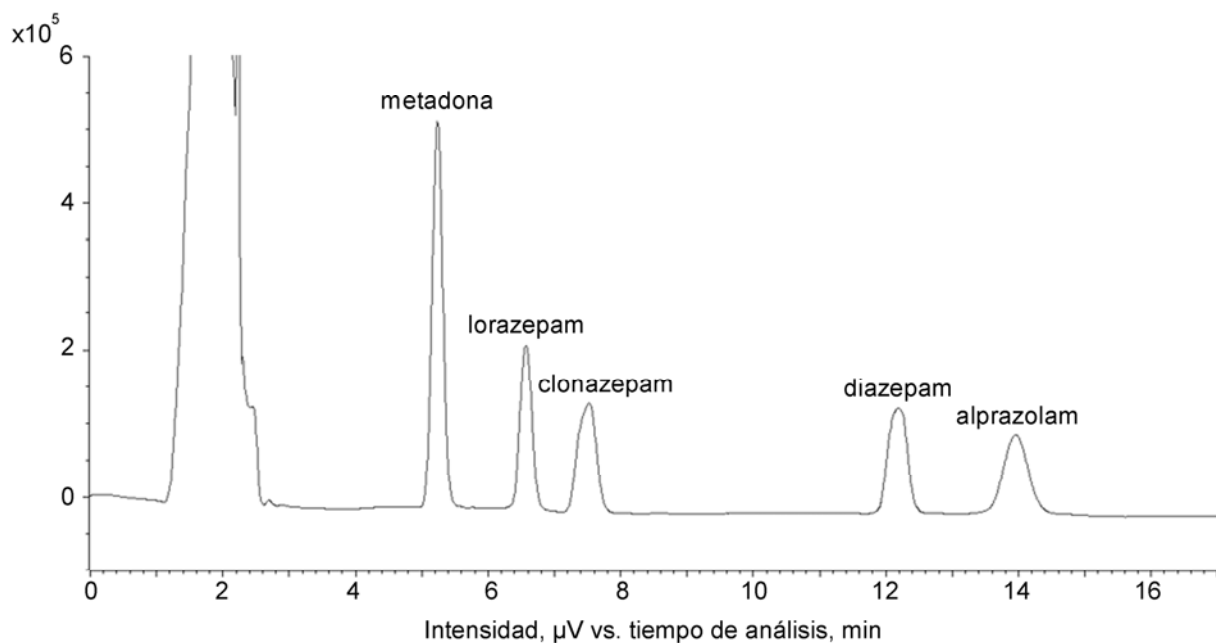


Figura 6. Cromatograma representativo de plasma blanco conteniendo 1000 ng/mL de metadona y 500 ng/mL de alprazolam, clonazepam, diazepam, lorazepam, abacavir, efavirenz, lamivudina, ritonavir, saquinavir y estavudina (tiempo de retención para metadona = 5.2 min, alprazolam = 14.0 min, clonazepam = 7.6 min, diazepam = 12.2 min, lorazepam = 6.6 min; tiempo total de análisis = 17.0 min).

El cromatograma muestra la buena separación obtenida entre el pico de metadona, el frente del solvente y el resto de medicamentos ensayados.

Linealidad y rango de calibración

Para el ensayo de linealidad, se obtuvieron las ecuaciones de la recta de regresión ($y = a + b x$) por el método de mínimos cuadrados, el valor de los coeficientes de correlación, el error relativo porcentual para cada concentración del rango de calibración y los coeficientes de variación de los factores respuesta, tal y como se muestra en las **Tablas 19 y 20** para metadona en plasma.

Tabla 19. Resultados del ensayo de linealidad para metadona en plasma.

Cteor (ng/mL)	Cexp (ng/mL)			ER (%)			Y/X			
	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	
50	58.48	52.30	51.45	16.97	4.59	2.89	1.33	1.22	1.21	
100	95.73	98.46	92.33	-4.27	-1.54	-7.67	1.28	1.21	1.20	
200	187.77	189.68	195.76	-6.11	-5.16	-2.12	1.24	1.20	1.20	
300	306.13	318.67	310.22	2.04	6.22	3.41	1.22	1.20	1.20	
400	402.59	390.13	408.29	0.65	-2.47	2.07	1.22	1.20	1.20	
600	599.28	600.72	591.89	-0.12	0.12	-1.35	1.21	1.20	1.20	
Media ER(%)				1.53	0.29	-0.46				
							Media Y/X	1.25	1.21	1.20
							DE	0.04	0.01	0.00
							CV _{f(y/x)} (%)	3.54	0.50	0.17

Tabla 20. Ecuaciones obtenidas en el ensayo de linealidad para metadona en plasma.

Parámetro	Recta 1	Recta 2	Recta 3
a	7.4	0.9	0.3
b	1.2	1.2	1.2
r	0.9993	0.9986	0.9992
r ²	0.9986	0.9973	0.9985

De igual forma para los niveles de metadona en saliva se incluyen los mismos parámetros de linealidad y rango de calibración en las **Tablas 21 y 22**.

Tabla 21. Resultados del ensayo de linealidad para metadona en saliva.

Cteor (ng/mL)	Cexp (ng/mL)			ER (%)			Y/X			
	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	
50	53.98	58.37	47.45	7.96	16.74	-5.11	1.23	1.25	1.11	
100	85.23	110.55	104.86	-14.77	10.55	4.86	1.18	1.18	1.05	
200	192.90	185.47	211.23	-3.55	-7.27	5.62	1.14	1.15	1.02	
400	423.44	388.41	390.63	5.86	-2.90	-2.34	1.12	1.12	1.01	
600	594.99	580.12	590.60	-0.83	-3.31	-1.57	1.11	1.11	1.01	
800	815.78	845.29	792.20	1.97	5.66	-0.98	1.11	1.11	1.01	
1000	983.77	981.71	1013.02	-1.62	-1.83	1.30	1.11	1.11	1.00	
Media ER(%)				-0.71	2.52	0.25				
							Media Y/X	1.14	1.15	1.03
							DE	0.05	0.05	0.04
							CV _{f(y/x)} (%)	4.00	4.38	3.54

Tabla 22. Ecuaciones obtenidas en el ensayo de linealidad para metadona en saliva.

Parámetro	Recta 1	Recta 2	Recta 3
a	6.8	8.5	5.0
b	1.1	1.1	1.0
r	0.9991	0.9979	0.9996
r ²	0.9983	0.9959	0.9993

El LLOQ se estableció en 50 ng/mL, puesto que fue la mínima concentración de analito que se pudo determinar con una precisión y exactitud adecuadas. Consecuentemente, se utilizó este valor como el punto más bajo del rango de la curva de calibrado.

Efecto de la dilución

En el ensayo de efecto de la dilución se determinaron los valores de exactitud y precisión de patrones de metadona en plasma y saliva por encima del ULOQ y diluidos 1/10. Los resultados del ensayo se muestran en las **Tablas 23 y 24**.

Tabla 23. Resultados del ensayo de efecto de la dilución para metadona en plasma.

Cteor (ng/mL)	Cexp (ng/mL)	ER (%)	CV _{f(y/x)} (%)
500	539.80	7.96	3.38
	533.20	6.64	
	497.43	-0.51	
	539.27	7.85	
	535.61	7.12	
Media ER (%)		5.81	

Tabla 24. Resultados del ensayo de efecto de la dilución para metadona en saliva.

Cteor (ng/mL)	Cexp (ng/mL)	ER (%)	CV _{f(y/x)} (%)
800	851.30	6.41	2.45
	819.46	2.43	
	812.13	1.52	
	855.18	6.90	
	817.91	2.24	
Media ER (%)		3.90	

Los coeficientes de variación obtenidos fueron 3.38 % y 2.45 % para metadona en plasma y saliva, respectivamente. Los valores de error relativo porcentual estuvieron comprendidos dentro del $\pm 15\%$ de la concentración teórica, siendo la media de 5.81 % para metadona en plasma y de 3.90 % para metadona en saliva.

Exactitud y precisión

a) **Evaluación intraensayo:** Los resultados obtenidos en las pruebas de exactitud y precisión intraensayo para metadona en plasma y saliva se muestran en las **Tablas 25-27**.

Tabla 25. Resultados de la prueba de exactitud y precisión intraensayo: día 1 (n=5).

	Cteor (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	CV (%)
Plasma	50	49.74 ± 4.50	-0.52	9.04
	100	102.54 ± 4.13	2.54	4.03
	300	305.05 ± 14.72	1.68	4.82
	500	532.54 ± 13.14	6.51	2.47
Saliva	50	56.77 ± 0.62	13.54	1.09
	100	107.05 ± 3.27	7.05	3.05
	400	414.13 ± 16.98	3.53	4.10
	800	799.72 ± 19.22	-0.03	2.40

Tabla 26. Resultados de la prueba de exactitud y precisión intraensayo: día 2 (n=5).

	Cteor (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	CV (%)
Plasma	50	44.43 ± 3.47	-11.13	7.80
	100	94.99 ± 5.33	-5.01	5.61
	300	286.03 ± 10.17	-4.66	3.56
	500	505.27 ± 10.15	1.05	2.01
Saliva	50	53.28 ± 1.29	6.56	2.41
	100	101.47 ± 8.38	1.47	8.26
	400	411.70 ± 13.86	2.92	3.37
	800	853.02 ± 25.73	6.63	3.02

Tabla 27. Resultados de la prueba de exactitud y precisión intraensayo: día 3 (n=5).

	Cteor (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	CV (%)
Plasma	50	54.99 ± 1.53	9.98	2.78
	100	102.22 ± 5.76	2.22	5.64
	300	326.57 ± 22.66	8.86	6.94
	500	513.88 ± 16.08	2.78	3.13
Saliva	50	51.59 ± 3.71	3.18	7.18
	100	101.95 ± 4.86	1.95	4.77
	400	404.17 ± 14.93	1.04	3.69
	800	815.49 ± 9.42	1.94	1.16

Los máximos valores de precisión, expresados como CV (%), fueron 9.04 % para metadona en plasma, correspondiente al patrón de 50 ng/mL del primer día de ensayo, y 8.26 % para saliva, obtenido para el patrón de 100 ng/mL del segundo día de ensayo. Los mayores valores de exactitud, expresada como ER (%), fueron -11.13 % en plasma, obtenido para el patrón de 50 ng/mL del segundo día de ensayo, y 13.54 % en saliva, correspondiente al patrón de 50 ng/mL del primer día de ensayo.

b) Evaluación interensayo: Los resultados obtenidos en la prueba de exactitud y precisión interensayo para metadona en plasma y saliva se muestran en la **Tabla 28**.

Tabla 28. Resultados de la prueba de exactitud y precisión interensayo (n=15, 3 días).

	Cteor (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	CV (%)
Plasma	50	49.72 ± 5.46	-0.56	9.85
	100	99.92 ± 5.96	-0.08	5.91
	300	305.89 ± 23.06	1.96	7.54
	500	517.23 ± 17.07	3.45	3.30
Saliva	50	53.88 ± 3.08	7.76	5.72
	100	103.49 ± 6.06	3.49	5.86
	400	410.00 ± 14.84	2.50	3.62
	800	822.74 ± 29.25	2.84	3.56

Los valores máximos de ER % de las concentraciones ensayadas resultaron ser, para metadona en plasma y saliva respectivamente, de 3.45 % para el patrón de 500 ng/mL y 7.76 % para el patrón de 50 ng/mL. Por otro lado, los porcentajes máximos de CV (%) de las concentraciones ensayadas fueron de 9.85 % para el patrón de 50 ng/mL de metadona en plasma y 5.86 % para el patrón de 100 ng/mL en saliva.

Recuperación

Los resultados del ensayo de recuperación referentes a la eficacia de extracción de metadona a partir de plasma y saliva se muestran en la **Tabla 29**.

Tabla 29. Resultados del ensayo de recuperación (n=3).

	Cteor (ng/mL)	Recuperación (%)	Recuperación media \pm DE (%)
Plasma	50	101.12	
	100	98.74	
	300	98.02	99.55 \pm 1.42
	500	100.30	
Saliva	50	99.43	
	100	97.21	
	400	98.04	97.93 \pm 1.09
	800	97.03	

Los valores de recuperación obtenidos muestran eficacias de extracción muy próximas al 100%, tanto para la matriz plasmática como para la salival.

Estabilidad

La estabilidad de metadona fue estudiada en distintas condiciones, incluyendo la estabilidad en la solución stock, estabilidad en plasma y saliva durante el proceso de congelación/descongelación, a corto y a largo plazo, y estabilidad en el extracto líquido en las condiciones de almacenamiento y en el inyector automático, tal y como se muestra en las **Tablas 30-35**.

- Estabilidad de la solución stock

Tabla 30. Resultados de estabilidad de la solución stock (metadona 1mg/mL en agua) tras permanecer durante 1, 2, 3, 6, 9 y 12 meses a -32°C (n=3).

Valor basal		1 mes		2 meses		3 meses	
Cteor (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)
100	99.03 ± 3.29	100.90 ± 2.24	1.89	96.77 ± 2.80	-2.29	98.29 ± 2.64	-0.75
300	302.94 ± 1.22	294.52 ± 1.59	-2.78	289.94 ± 1.36	-4.29	294.90 ± 2.98	-2.65
500	504.83 ± 1.15	492.50 ± 1.99	-2.44	480.48 ± 2.10	-4.82	493.69 ± 6.41	-2.21

6 meses		9 meses		12 meses	
Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)
95.78 ± 0.88	-3.28	96.57 ± 2.95	-2.49	94.82 ± 2.13	-4.25
291.99 ± 7.07	-3.61	291.23 ± 3.44	-3.86	289.92 ± 3.55	-4.30
484.40 ± 9.89	-4.05	487.05 ± 3.21	-3.52	485.75 ± 2.69	-3.78

- Estabilidad durante el proceso de congelación/descongelación

Tabla 31. Resultados de estabilidad de metadona en plasma y saliva tras 3 ciclos de congelación a -32°C y descongelación (n=3).

	Valor basal		3 ciclos	
	Cteor (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)
Plasma	100	104.97 ± 6.02	111.79 ± 17.86	6.50
	300	286.75 ± 17.03	317.63 ± 2.83	10.77
	500	496.55 ± 16.67	520.24 ± 19.32	4.77
Saliva	100	109.02 ± 1.44	100.84 ± 9.89	-7.50
	400	389.53 ± 4.43	364.04 ± 2.66	-6.54
	800	790.50 ± 10.07	786.53 ± 9.49	-0.50

- Estabilidad a corto plazo

Tabla 32. Resultados de estabilidad a corto plazo de metadona en plasma y saliva tras permanecer durante 10 horas a temperatura ambiente (n=3).

	Valor basal		10 horas	
	Cteor (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)
Plasma	100	104.97 ± 6.02	97.26 ± 3.52	-7.35
	300	286.75 ± 17.03	297.11 ± 12.75	3.61
	500	496.55 ± 16.67	491.97 ± 12.75	-0.92
Saliva	100	109.02 ± 1.44	100.44 ± 9.56	-7.87
	400	389.53 ± 4.43	384.81 ± 15.68	-1.21
	800	790.50 ± 10.07	802.32 ± 27.00	1.49

- Estabilidad a largo plazo

Tabla 33. Resultados de estabilidad a largo plazo de metadona en plasma y saliva tras permanecer durante 15, 30 y 90 días a -32°C (n=3).

	Valor basal		15 días		30 días		90 días	
	Cteor (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)
Plasma	100	104.97 ± 6.02	113.37 ± 0.26	8.00	108.51 ± 1.41	3.38	98.35 ± 7.56	-6.30
	300	286.75 ± 17.03	311.65 ± 8.71	8.68	290.74 ± 5.13	1.39	280.79 ± 3.78	-2.08
	500	496.55 ± 16.67	486.02 ± 5.49	-2.12	467.20 ± 3.09	-5.91	492.92 ± 0.62	-0.73
Saliva	100	109.02 ± 1.44	106.34 ± 2.50	-2.46	102.91 ± 8.66	-5.60	98.33 ± 7.42	-9.81
	400	389.53 ± 4.43	390.27 ± 4.25	0.19	392.94 ± 16.98	0.88	384.98 ± 9.03	-1.17
	800	790.50 ± 10.07	785.44 ± 12.02	-0.64	757.10 ± 16.74	-4.22	762.51 ± 14.14	-3.54

- Estabilidad de las muestras procesadas en las condiciones de almacenamiento

Tabla 34. Resultados de estabilidad de metadona en el extracto líquido tras permanecer durante 10 días a -32°C (n=3).

Cteor (ng/mL)	Valor basal		10 días	
	Cexp ± DE (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)
100	104.97 ± 6.02	117.88 ± 0.97		12.30
300	286.75 ± 17.03	309.40 ± 12.79		7.90
500	496.55 ± 16.67	495.22 ± 17.89		-0.27

- Estabilidad de las muestras procesadas en el inyector automático: Los patrones de control de calidad se sometieron a pretratamiento, y los extractos líquidos permanecieron 10 horas en el inyector automático.

Tabla 35. Resultados de estabilidad de metadona en el extracto líquido tras permanecer durante 10 horas en el inyector automático (n=3).

Cteor (ng/mL)	Valor basal		10 horas	
	Cexp ± DE (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)
100	104.97 ± 6.02	106.73 ± 6.49		1.68
300	286.75 ± 17.03	318.38 ± 9.71		11.03
500	496.55 ± 16.67	536.52 ± 7.04		8.05

Los resultados obtenidos en los ensayos de estabilidad de metadona en las soluciones stock, en las matrices biológicas y en los extractos en las condiciones de trabajo muestran la ausencia de cambios significativos en la concentración de analito durante los mismos.

3.2. Validación parcial

Linealidad y rango de calibración

Para el ensayo de linealidad, se obtuvieron las ecuaciones de la recta de regresión ($y = a + b x$) por el método de mínimos cuadrados, el valor de los coeficientes de correlación, el error relativo porcentual para cada concentración del rango de calibración y los coeficientes de variación de los factores respuesta, tal y como se muestra en las **Tablas 36 y 37** para metadona en plasma.

Tabla 36. Resultados del ensayo de linealidad para metadona en plasma.

Cteor (ng/mL)	Cexp (ng/mL)			ER (%)			Y/X			
	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	
50	59.59	58.15	59.92	19.19	16.31	19.84	0.76	0.74	0.77	
100	92.34	109.07	110.40	-7.66	9.07	10.40	0.83	0.84	0.83	
200	186.37	185.34	190.61	-6.81	-7.33	-4.69	0.91	0.89	0.87	
400	414.96	410.71	394.85	3.74	2.68	-1.29	0.95	0.93	0.89	
600	599.35	587.14	578.65	-0.11	-2.14	-3.56	0.96	0.94	0.90	
800	800.00	772.72	801.79	0.00	-3.41	0.22	0.96	0.95	0.90	
1000	997.48	1026.88	1013.78	-0.25	2.69	1.38	0.96	0.95	0.91	
Media ER(%)				1.16	2.55	3.19				
							Media Y/X	0.90	0.89	0.87
							DE	0.08	0.08	0.05
							CV _{f̂(y/x)} (%)	8.77	8.58	5.94

Tabla 37. Ecuaciones obtenidas en el ensayo de linealidad para metadona en plasma.

Parámetro	Recta 1	Recta 2	Recta 3
a	-13.1	-12.9	-8.9
b	1.0	1.0	0.9
r	0.9996	0.9987	0.9994
r ²	0.9993	0.9974	0.9988

De igual forma para los niveles de metadona en saliva se incluyen los mismos parámetros de linealidad y rango de calibración en las **Tablas 38 y 39**.

Tabla 38. Resultados del ensayo de linealidad para metadona en saliva.

Cteor (ng/mL)	Cexp (ng/mL)			ER (%)			Y/X			
	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	Recta 1	Recta 2	Recta 3	
50	45.17	51.76	57.71	-9.65	3.51	15.42	0.91	1.18	1.18	
100	102.97	106.42	107.99	2.97	6.42	7.99	1.00	1.14	1.14	
200	184.94	189.69	188.34	-7.53	-5.16	-5.83	1.03	1.12	1.12	
400	410.87	396.54	398.53	2.72	-0.86	-0.37	1.05	1.11	1.11	
600	604.51	590.33	582.22	0.75	-1.61	-2.96	1.06	1.10	1.10	
800	828.11	833.66	813.86	3.51	4.21	1.73	1.06	1.10	1.10	
1000	973.38	981.55	1001.24	-2.66	-1.84	0.12	1.06	1.10	1.10	
Media ER(%)				-1.41	0.67	2.30				
							Media Y/X	1.03	1.12	1.07
							DE	0.06	0.03	0.05
							CV _{f̂(y/x)} (%)	5.53	2.67	4.71

Tabla 39. Ecuaciones obtenidas en el ensayo de linealidad para metadona en saliva.

Parámetro	Recta 1	Recta 2	Recta 3
a	-7.4	4.5	-8.4
b	1.1	1.1	1.1
r	0.9988	0.9989	0.9995
r ²	0.9976	0.9978	0.9990

El LLOQ se estableció nuevamente en 50 ng/mL, puesto que fue la mínima concentración de analito que se pudo determinar con una precisión y exactitud adecuadas. Consecuentemente, se utilizó este valor como el punto más bajo del rango de la curva de calibrado.

Exactitud y precisión intraensayo

Los resultados obtenidos en las pruebas de exactitud y precisión intraensayo para metadona en plasma y saliva se muestran en la **Tabla 40**.

Tabla 40. Resultados de la prueba de exactitud y precisión intraensayo.

	Cteor (ng/mL)	Cexp ± DE (ng/mL)	ER (%)	CV (%)
Plasma	50	59.78 ± 1.96	-4.82	19.81
	100	103.94 ± 10.07	-6.85	13.45
	400	406.84 ± 10.60	-2.42	12.04
	800	791.51 ± 16.30	0.34	1.18
Saliva	50	52.39 ± 4.58	-1.29	8.32
	100	105.79 ± 2.57	1.52	11.37
	400	401.98 ± 7.76	-1.22	0.91
	800	825.21 ± 10.21	1.84	2.91

Los máximos valores de precisión, expresados como CV (%), fueron 19.81 % para metadona en plasma, correspondiente al patrón de 50 ng/mL, y 11.37 % para saliva, obtenido para el patrón de 100 ng/mL. Los mayores valores de exactitud, expresada como ER (%), fueron -6.85 % en plasma, obtenido para el patrón de 100 ng/mL del segundo día de ensayo, y 1.84 % en saliva, correspondiente al patrón de 800 ng/mL.

4. Determinación de la función del error analítico

En cuanto al estudio de la funcionalidad del error analítico, en las **Tablas 41** y **42** se muestran, para metadona en plasma y saliva, respectivamente, las desviaciones estándar de las medias de las concentraciones experimentales obtenidas a partir de las 3 rectas de calibrado y para cada uno de los días.

Tabla 41. Desviaciones estándar de las medias de las concentraciones experimentales obtenidas de las 3 rectas de calibrado durante los 4 días para metadona en plasma.

Cteor (ng/mL)	DE			
	1° día	2° día	3° día	4° día
600	4.74	11.33	6.35	3.42
400	9.29	7.09	16.25	3.50
300	6.40	13.54	10.96	13.66
200	4.17	10.34	7.16	18.64
100	3.07	5.15	1.45	8.43
50	3.84	5.10	3.22	7.45

Tabla 42. Desviaciones estándar de las medias de las concentraciones experimentales obtenidas de las 3 rectas de calibrado durante los 4 días para metadona en saliva.

Cteor (ng/mL)	DE			
	1° día	2° día	3° día	4° día
1000	17.51	24.14	7.55	8.46
800	26.60	36.50	1.52	14.98
600	7.64	5.42	14.05	30.24
400	19.62	16.51	12.54	13.72
200	13.26	14.15	19.72	19.54
100	13.28	7.13	8.81	11.29
50	5.49	2.62	3.65	8.10

Los valores de los coeficientes de la ecuación polinomial general ($DE = A_0 + A_1 \cdot C + A_2 \cdot C^2 + A_3 \cdot C^3$) obtenidos mediante análisis de regresión múltiple para metadona en plasma y saliva, respectivamente, se encuentran recogidos en las **Tablas 43** y **44**.

Tabla 43. Coeficientes del ajuste polinomial del error analítico de metadona en plasma.

Variable de regresión	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃
C	6.43	4.19E-03		
C ²	7.42		1.45E-06	
C ³	7.71			-2.37E-09
C, C ²	1.65	0.51	-7.24E-05	
C, C ³	2.82	0.31		-7.20E-08
C ² , C ³	4.87		1.09E-04	-1.77E-07
C, C ² , C ³	0.38	0.73	-1.60E-04	8.99E-08

Tabla 44. Coeficientes del ajuste polinomial del error analítico de metadona en saliva.

Variable de regresión	A ₀	A ₁	A ₂	A ₃
C	10.04	8.33E-03		
C ²	11.86		6.08E-06	
C ³	12.53			4.89E-09
C, C ²	6.09	0.04	-2.82E-05	
C, C ³	7.24	0.02		-1.64E-08
C ² , C ³	9.64		4.85E-05	-4.35E-08
C, C ² , C ³	3.76	0.07	-1.01E-04	4.61E-08

5. Estudio de los niveles de metadona en plasma y saliva humanos

5.1. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en PMM

Sujetos

Un total de 8 pacientes ambulatorios en terapia de mantenimiento con metadona en el CAS Osona Salut Mental de Vic fueron incluidos en el estudio, aunque la muestra final resultó ser de 4 pacientes.

La media de edad de los sujetos fue de 39 años (rango 31-44), siendo el peso medio de 79 kg (rango 70-90). La dosis diaria administrada de metadona estuvo comprendida entre 15 y 130 mg.

Curvas concentración-tiempo

Los pacientes incluidos en el estudio proporcionaron 76 muestras de plasma y saliva para el análisis de metadona. El número medio \pm DE de muestras obtenidas por participante fue de 19 ± 1.0 (rango 18-20). Las curvas concentración-tiempo obtenidas en saliva (**Fig. 7**) comprendieron niveles de metadona que en ocasiones fueron muy superiores a los niveles plasmáticos obtenidos (A y D), aunque también hubo situaciones en que los niveles salivales fueron inferiores a los plasmáticos (B y C).

Análisis farmacocinético: aproximación paramétrica mediante análisis de regresión no lineal

El análisis farmacocinético se realizó a partir de las curvas experimentales de concentración plasmática y salival de metadona en función del tiempo que se muestran en la **Figura 7**, tal y como se describe en el apartado de métodos correspondiente al “Estudio de los niveles de metadona en pacientes en PMM”.

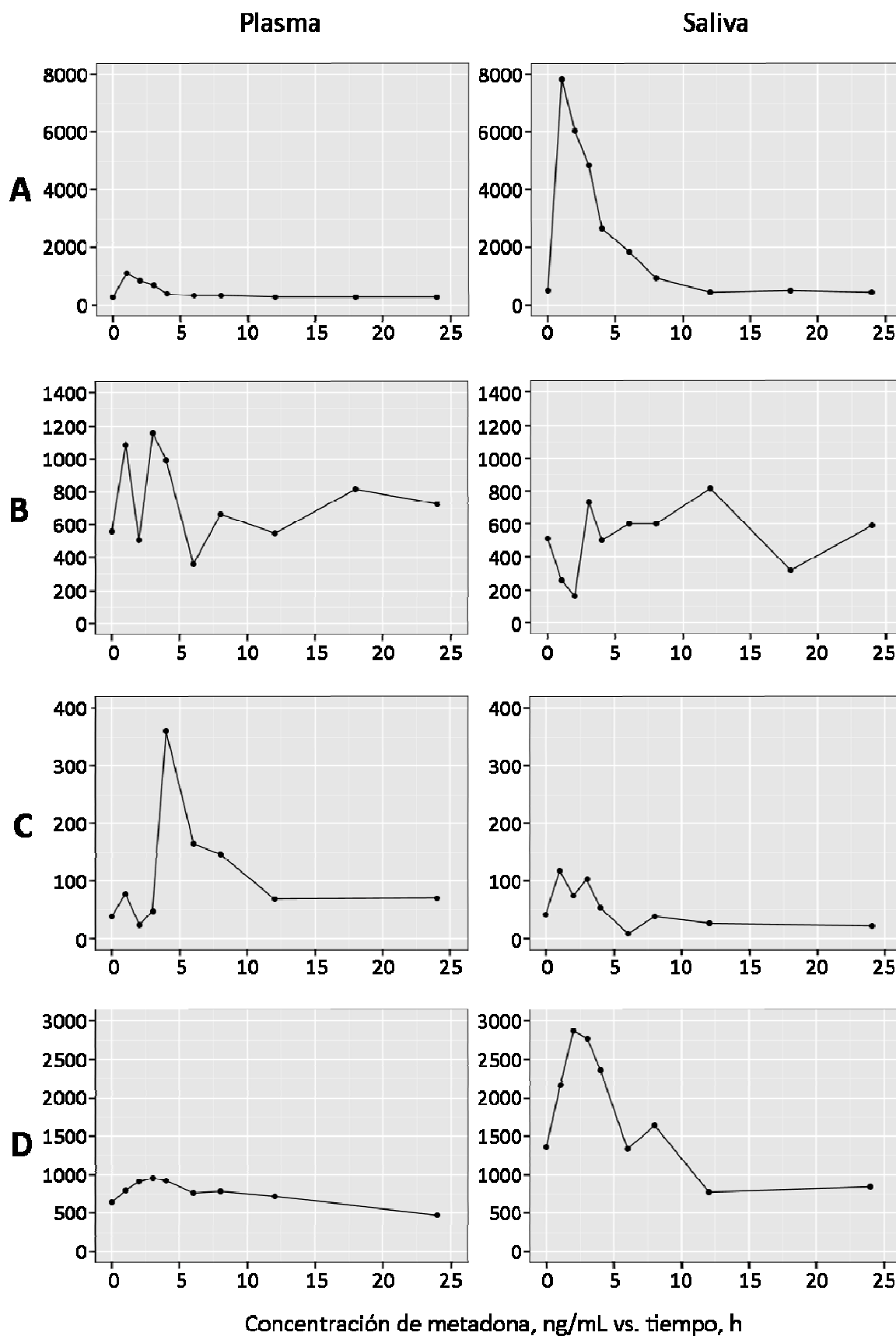


Figura 7. Curvas concentración-tiempo para metadona en plasma y saliva, respectivamente, en los pacientes en PMM finalmente incluidos (A) 1; (B) 2; (C) 3; y (D) 4.

Los niveles plasmáticos y salivales de metadona para cada paciente se ajustaron mediante análisis de regresión no lineal por mínimos cuadrados utilizando distintos métodos de ponderación, incluyendo el método homoscedástico ($W=1$) y métodos heteroscedásticos, aplicando ponderaciones de $1/C$, $1/C^2$, $1/\sqrt{C}$ y el inverso de la varianza ($1/V$) determinada esta varianza a través de la función del error analítico para cada fluido biológico. Los principales parámetros obtenidos para cada sujeto utilizando los 5 métodos de ponderación distintos se analizaron estadísticamente con la prueba H de Kruskal-Wallis, sin obtener diferencias significativas entre ellos. En la **Figura 8** se muestran, en términos de coeficiente de variación, los valores medios de k_a , α , β , $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$ para metadona en plasma, y k_i , k_d y $t_{1/2}$ para metadona en saliva, expresados en porcentaje del valor esperado con respecto al valor medio total (incluyendo los 5 métodos).

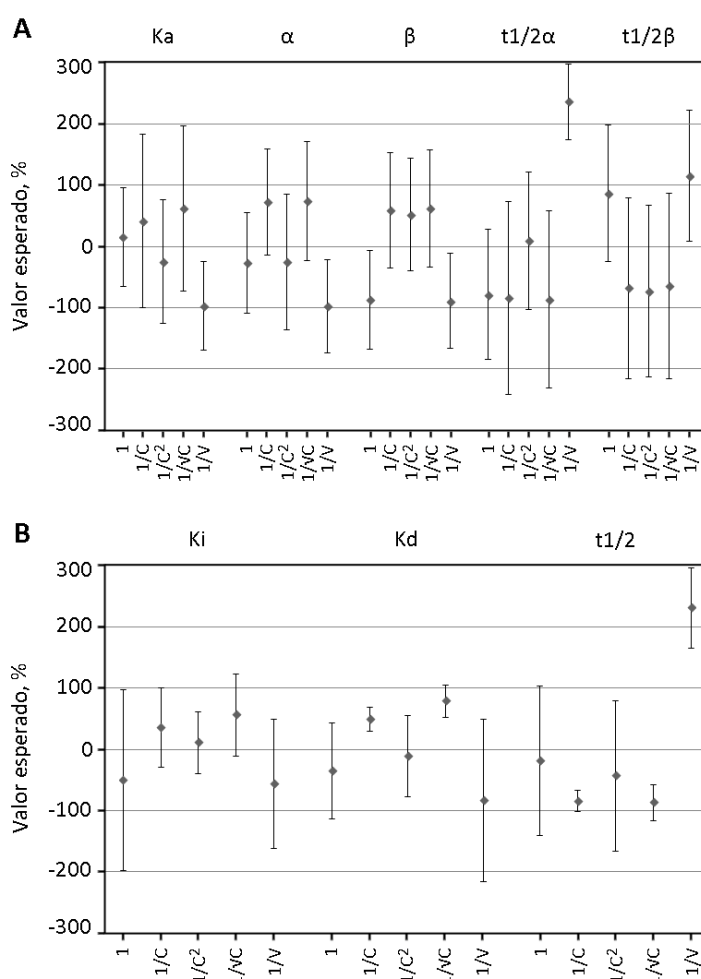


Figura 8. Comparación de los parámetros estimados por análisis de regresión no lineal aplicando distintos métodos de ponderación por mínimos cuadrados. Los círculos representan los valores medios de (A) k_a , α , β , $t_{1/2\alpha}$ y $t_{1/2\beta}$; y (B) k_i , k_d y $t_{1/2}$, expresados en porcentaje del valor esperado con respecto al valor medio total (incluyendo los 5 métodos). Las barras de error verticales representan el coeficiente de variación.

Para el cálculo de los distintos parámetros farmacocinéticos para metadona en plasma y saliva se empleó el método homoscedástico ($W=1$), obteniéndose los valores recogidos en la **Tabla 45**.

Tabla 45. Valores de los parámetros farmacocinéticos, media y desviación estándar calculados para metadona en plasma y saliva en cada uno de los pacientes seleccionados.

Parámetro	Unidades	Paciente				Media \pm DE	
		1	2	3	4		
Plasma	k_a	h^{-1}	1.63	0.88	0.03	0.70	0.81 ± 0.65
	α	h^{-1}	1.10	0.26	0.12	0.95	0.61 ± 0.49
	β	h^{-1}	0.01	0.01	0.03	0.03	0.02 ± 0.01
	$t_{1/2\alpha}$	h	0.63	2.65	5.56	0.73	2.39 ± 2.31
	$t_{1/2\beta}$	h	51.78	51.97	20.11	21.02	36.22 ± 18.08
	AUC_0^τ	$\mu g \cdot h/mL$	8.71	17.04	2.44	16.73	11.23 ± 7.01
	CL/F	L/h	5.17	7.63	6.14	4.78	5.93 ± 1.27
	Vd β /F	L/kg	4.88	7.58	1.98	2.07	4.13 ± 2.66
	Cmax(ss)	ng/mL	841	894	84	670	622 ± 372
	Cmin(ss)	ng/mL	188	361	64	360	243 ± 145
	tmax(ss)	h	0.72	2.11	8.50	3.69	3.76 ± 3.39
	C _p media(ss)	ng/mL	363	710	102	697	468 ± 292
Saliva	k_i	h^{-1}	0.05	0.12	1.52	0.20	0.47 ± 0.70
	k_d	h^{-1}	0.12	0.01	0.05	0.05	0.06 ± 0.05
	$t_{1/2}$	h	5.89	79.66	14.22	12.88	28.16 ± 34.52
	AUC_0^τ	$\mu g \cdot h/mL$	36.03	12.92	0.88	30.73	20.14 ± 16.20
	CL/F	L/h	1.25	10.06	16.96	2.60	7.72 ± 7.28
	Vd/F	L/kg	0.13	15.32	3.87	0.69	5.00 ± 7.07
	Cmax(ss)	ng/mL	1292	414	42	1186	734 ± 605
	Cmin(ss)	ng/mL	846	386	15	627	468 ± 356
	tmax(ss)	h	8.17	9.04	2.09	6.80	6.52 ± 3.10
	C _s media(ss)	ng/mL	1501	538	37	1281	839 ± 675

k_a = constante de absorción; α = constante de rápida disposición; β = constante de lenta disposición; $t_{1/2\alpha}$ = semivida de rápida disposición; $t_{1/2\beta}$ = semivida de lenta disposición; AUC_0^τ = área bajo la curva de niveles plasmáticos o salivales desde tiempo 0 a 24h; CL/F = aclaramiento en función de F, biodisponibilidad; Vd β /F = volumen de distribución en fase β en función de F; Cmax(ss) = concentración máxima en estado estacionario; Cmin(ss) = concentración mínima en estado estacionario; tmax(ss) = tiempo en alcanzar Cmax(ss); Cmedia(ss) = concentración media en estado estacionario; k_i = constante de incorporación; k_d = constante de desaparición; $t_{1/2}$ = semivida de desaparición; Vd/F = volumen de distribución en función de F.

Correlación de las concentraciones de metadona en plasma y saliva humanos

La correlación lineal entre las concentraciones experimentales de metadona obtenidas mediante análisis por HPLC y las concentraciones teóricas calculadas por el método homoscedástico ($W=1$) tras el ajuste farmacocinético correspondiente en plasma y saliva se muestran en la **Figura 9**.

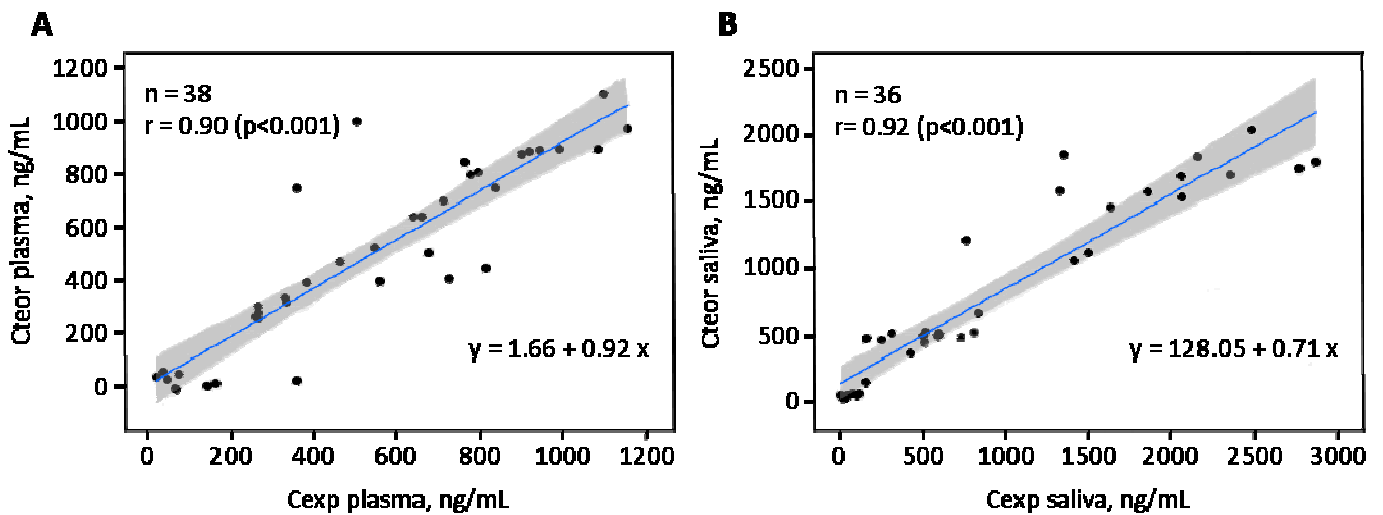


Figura 9. Correlación lineal entre las concentraciones experimentales y teóricas de metadona en (A) plasma (95% IC: 0.810-0.946); y (B) saliva (95% IC: 0.839-0.963). El área sombreada muestra el intervalo de confianza del 95%. 95% IC, intervalo de confianza del 95%.

En dicha figura se muestra una correlación significativa entre las concentraciones experimentales y teóricas halladas en (A) plasma ($r=0.90$, $p<0.001$, $n=38$) y (B) saliva ($r=0.92$, $p<0.001$, $n=36$).

A partir de los tabulados concentración-tiempo obtenidos en plasma y saliva para cada paciente, se calcularon los cocientes S/P a cada tiempo de muestreo del intervalo de dosificación. También se calculó la media de cocientes S/P obtenidos en la fase de eliminación (seleccionando para ello los valores comprendidos entre las 8-24 horas post-dosis), y la relación entre las AUC_0^{τ} salival y plasmática. Los resultados se muestran en la **Tabla 46**.

Tabla 46. Cocientes S/P, media y desviación estándar para cada paciente (1) a lo largo del intervalo de dosificación; (2) en la fase de eliminación de 8 a 24 h; y (3) para las AUC₀^τ.

t (h)	S/P ^a Paciente				Media ± DE	
	1	2	3	4		
0	2.0	0.9	1.0	2.1	1.5 ± 0.6	
1	7.1	0.2	1.5	2.7	2.9 ± 3.0	
2	7.2	0.3	3.2	3.2	3.5 ± 2.8	
3	7.2	0.6	2.1	2.9	3.2 ± 2.8	
4	6.9	0.5	0.1	2.6	2.5 ± 3.1	
6	5.6	1.7	0.1	1.7	2.3 ± 2.3	
8	2.8	0.9	0.3	2.1	1.5 ± 1.1	
12	1.7	1.5	0.4	1.1	1.2 ± 0.6	
18	1.9	0.4	-	-	1.1 ± 1.1	
24	1.7	0.8	0.3	1.8	1.2 ± 0.7	
Fase elim.	8-24	2.0	0.9	0.3	1.7	1.2 ± 0.8
AUC ₀ ^τ	0-24	4.1	0.8	0.4	1.8	1.8 ± 1.7

^aS/P = relación de concentraciones en saliva y plasma.

La **Figura 10** muestra las representaciones gráficas de la variación del cociente S/P a lo largo del tiempo en los pacientes en PMM seleccionados, así como la variación media a lo largo del tiempo.

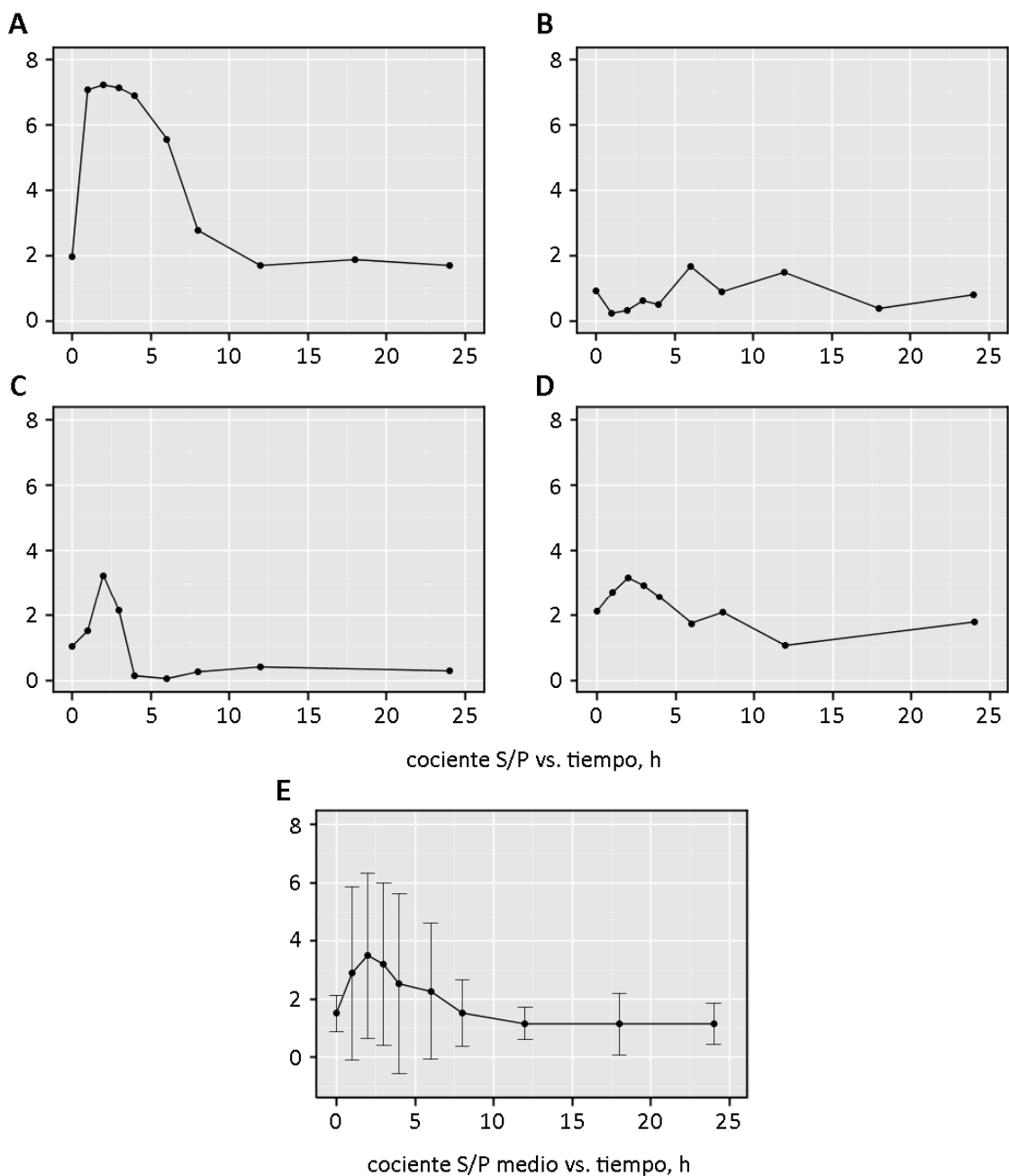


Figura 10. Variación del cociente S/P para metadona en función del tiempo en los pacientes en PMM seleccionados (A) 1; (B) 2; (C) 3; y (D) 4. El gráfico (E) muestra la variación media del cociente S/P para metadona en función del tiempo. Las barras de error verticales representan la desviación estándar.

En tres de los cuatro pacientes (A, C y D), así como en el gráfico de la variación media (E), se observa un aumento en el cociente S/P de metadona durante las primeras horas tras la administración del fármaco, el cual disminuye de forma más o menos notable durante el resto del intervalo de dosificación. En el paciente (B) se observan pequeños aumentos del cociente S/P a las 6, 12 y 24 horas post-dosis, como también se aprecia un ligero aumento del cociente S/P en el paciente (D) a las 8 horas post-dosis.

5.2. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en terapia del dolor

Sujetos

Un total de 19 pacientes ambulatorios tratados con metadona para el dolor crónico en el Hospital de Clínicas de Montevideo (Uruguay) fueron incluidos en el estudio, aunque la muestra final resultó ser de 14 pacientes.

La media de edad de los sujetos fue de 54 años (rango 34-70), siendo el peso medio de 80 kg (rango 52-133). La dosis diaria de metadona administrada estuvo comprendida entre 10 y 40 mg. En cuanto a la posología, 5 pacientes recibían metadona cada 8 horas, 6 cada 12 horas y 3 cada 24 horas.

Correlación de las concentraciones de metadona en plasma y saliva humanos

Los valores del cociente S/P obtenidos a pre-dosis para cada paciente se muestran en la **Tabla 47**.

Tabla 47. Dosis de metadona al inicio del estudio y cocientes S/P a pre-dosis obtenidos mediante Salivette® y ácido cítrico para cada participante.

Núm. paciente	Dosis metadona (mg/día)	Dosis metadona (mg/kg/día)	S/P ^a		
			Salivette®	Ácido cítrico	
				S1 ^b	S2 ^c
1	30	0.58	1.15	0.01	0.32
2	10	0.13	-	-	-
3	25	0.30	1.15	0.10	0.05
4	40	0.68	0.70	1.20	0.03
5	15	0.22	1.39	1.50	0.01
6	10	0.11	0.58	0.16	0.02
7	10	0.16	0.70	1.20	0.02
8	20	0.25	-	0.01	0.04
9	20	0.29	0.73	-	-
10	25	0.28	0.62	0.22	0.02
11	10	0.12	0.66	0.04	-
12	10	0.08	0.43	-	-
13	30	0.43	2.09	-	-
14	10	0.10	0.85	0.18	-
Media	19	0.27	0.92	0.46	0.06

^aS/P = relación de concentraciones en saliva y plasma; ^bS1 = primera fracción salival; ^cS2 = segunda fracción salival.

Los resultados para Salivette®, S1 y S2 oscilaron entre 0.43-2.09, 0.01-1.50 y 0.01-0.32, respectivamente, mientras que los valores medios de S/P fueron de 0.9, 0.5 y 0.1, respectivamente.

En la mayoría de pacientes, los niveles salivales de metadona hallados tras la recogida de muestras con Salivette® fueron superiores a los obtenidos mediante la estimulación con ácido cítrico (S1 y S2). Asimismo, las concentraciones de metadona halladas fueron mayores en la fracción S1 que para S2 en la gran mayoría de casos.

También se observó una correlación significativa entre la saliva recogida mediante Salivette® y las concentraciones plasmáticas de metadona a pre-dosis ($r=0.79$, $p<0.01$, $n=12$) (**Fig. 11**), mientras que no se halló correlación para las fracciones S1 ó S2.

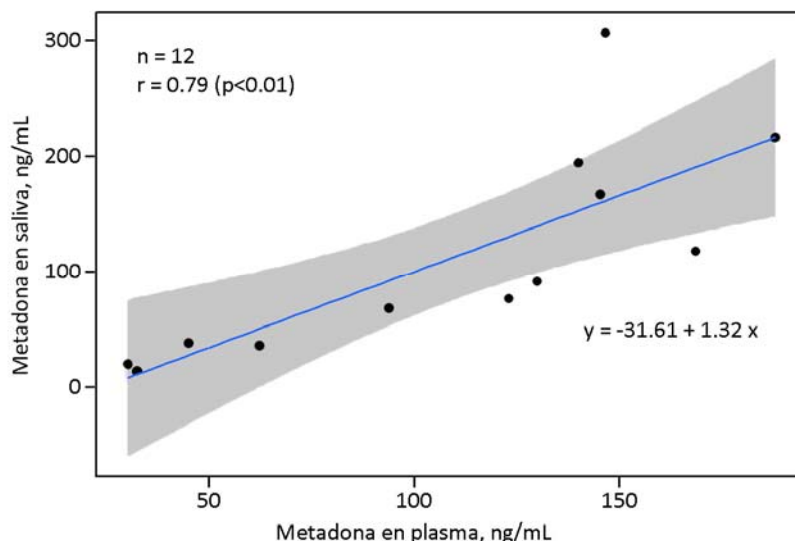


Figura 11. Correlación lineal entre las concentraciones plasmáticas y salivales de metadona a pre-dosis utilizando dispositivos Salivette® (95% IC: 0.395-0.938). El área sombreada muestra el intervalo de confianza del 95%. 95% IC, intervalo de confianza del 95%.

Además, se encontró una relación logarítmica entre la dosis de metadona recibida (mg/kg/día) y las concentraciones plasmáticas “valle” ($r=0.80$, $p<0.001$, $n=14$) (**Fig. 12 A**).

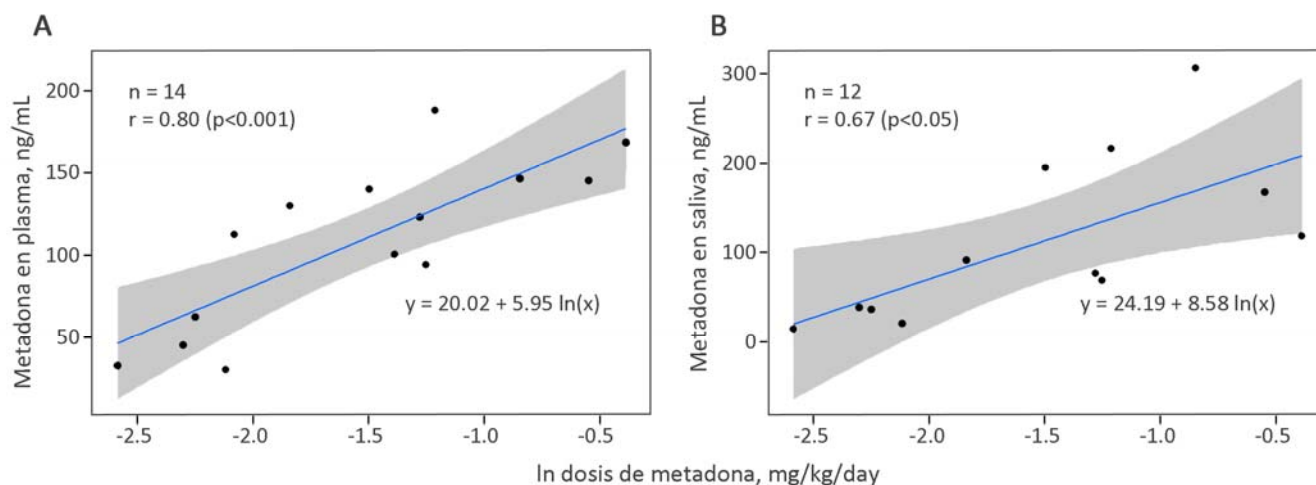


Figura 12. Correlación logarítmica entre dosis de metadona (mg/kg/día) y (A) concentraciones plasmáticas a pre-dosis (95% IC: 0.475-0.935); y (B) concentraciones salivales a pre-dosis utilizando dispositivos Salivette® (95% IC: 0.164-0.900). El área sombreada muestra el intervalo de confianza del 95%. 95% IC, intervalo de confianza del 95%.

Esta relación fue más débil entre la dosis de metadona recibida (mg/kg/día) y las concentraciones salivales obtenidas con Salivette® ($r=0.67$, $p<0,05$, $n=12$) (**Fig. 12 B**), mientras que no se halló correlación alguna para S1 ó S2.

Curvas salivales concentración-tiempo

Los pacientes incluidos en el estudio proporcionaron 181 muestras de saliva para el análisis de metadona. El número medio \pm DE de muestras de saliva obtenidas por participante fue de 13 ± 1.90 (rango 11-15). Las **Figuras 13a** y **13b** muestran las curvas salivales concentración-tiempo para metadona en los pacientes en terapia del dolor seleccionados (A) 1; (B) 2; (C) 4; y (D) 5, tras la recogida de muestras mediante estimulación con ácido cítrico y sin estimulación empleando dispositivos Salivette®, respectivamente. En ambas figuras también se muestran los tiempos de ingesta de comida, representados por líneas punteadas.

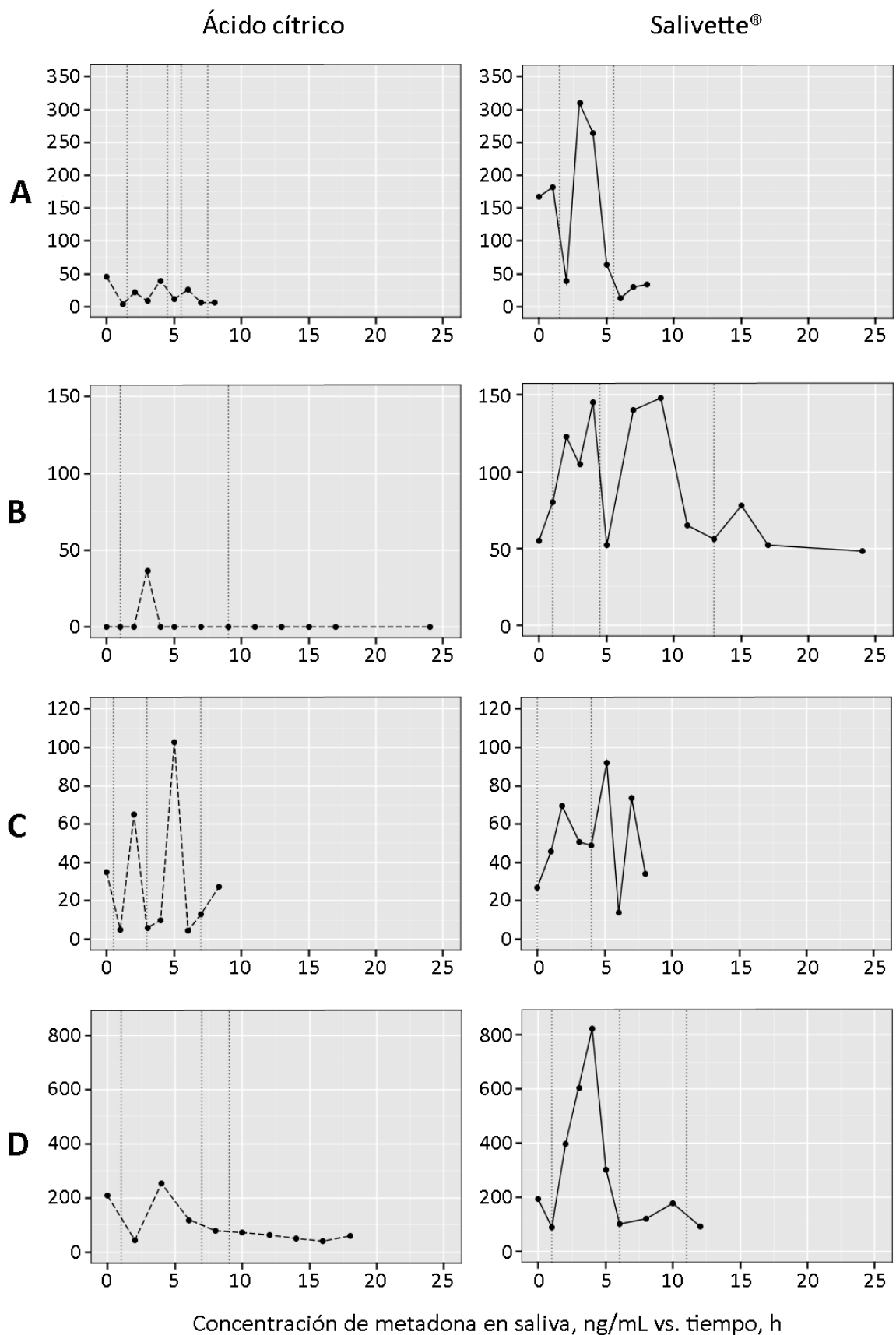


Figura 13a. Curvas salivales concentración-tiempo para metadona en los pacientes en terapia del dolor seleccionados (A) 1; (B) 2; (C) 4; y (D) 5, tras la recogida de muestras mediante estimulación con ácido cítrico y sin estimulación empleando dispositivos Salivette®, respectivamente. (Las líneas punteadas muestran los tiempos de ingesta de comida).

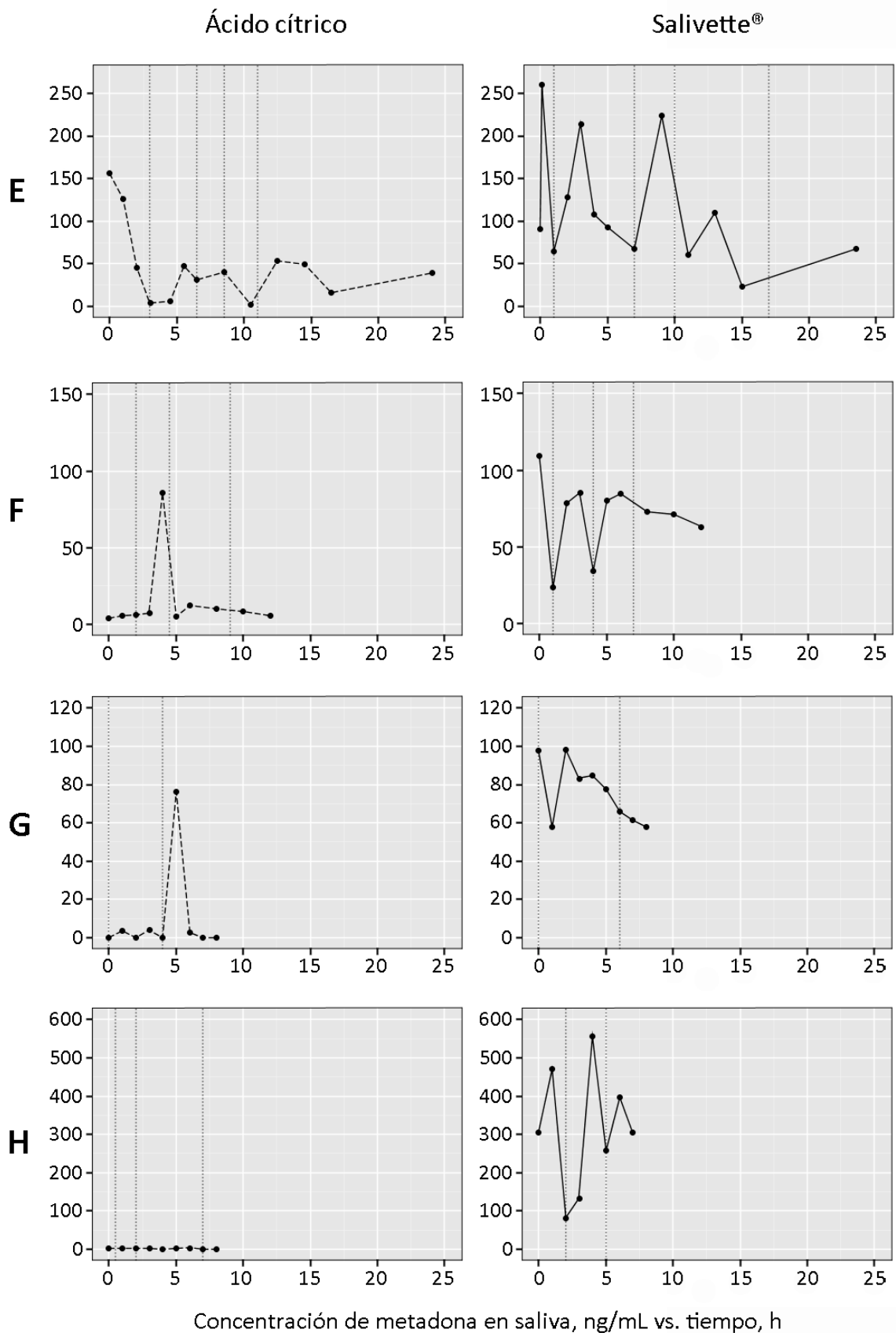


Figura 13b. Curvas salivales concentración-tiempo para metadona en los pacientes en terapia del dolor seleccionados (E) 7; (F) 8; (G) 9; y (H) 13, tras la recogida de muestras mediante estimulación con ácido cítrico y sin estimulación empleando dispositivos Salivette®, respectivamente. (Las líneas punteadas muestran los tiempos de ingesta de comida).

Las concentraciones de metadona en saliva fueron mayores cuando se utilizó el dispositivo Salivette®. Sin embargo, las concentraciones halladas tras la estimulación con ácido cítrico estuvieron situadas por debajo del límite inferior de cuantificación (50 ng/mL) en la mayoría de los casos (pacientes A, B, C, E, F, G y H), por lo que no pudieron ser cuantificadas adecuadamente. A pesar de ello, gran parte de las curvas concentración-tiempo mostraron varios picos que no estaban asociados exclusivamente a la dosis de metadona recibida. Los picos salivales secundarios fueron más observables en las curvas realizadas con Salivette® que en las efectuadas con ácido cítrico. De hecho, se observó que los niveles salivales de metadona aumentaron significativamente tras la ingestión de alimentos ($p < 0.001$).

V. DISCUSIÓN

V. DISCUSIÓN

1. Desarrollo de las metódicas analíticas

El primer elemento que se tuvo en cuenta en el desarrollo del método de bioanálisis fue el tipo de fase estacionaria. En este sentido, en los estudios publicados sobre la determinación de metadona en matriz plasmática, la fase estacionaria predominante es fundamentalmente de tipo reversa quiral, la cual permite la separación y cuantificación simultánea de los enantiómeros en un mismo análisis cromatográfico [151,154-156,158-160,162-165,167-170,172,179,180]. Sin embargo, otras muchas investigaciones, la mayoría de las realizadas en matriz salival, se han basado en la determinación de la forma racémica, utilizando para ello fases estacionarias de naturaleza aquiral, tanto de fase normal [147,152,181] como reversa [103,150,153,157,161,166,171,173-178,182-186,188-201]. En España, la dosis de metadona que reciben los pacientes drogodependientes y/o con dolor crónico se administra en su forma racémica [202] y es ésta la que se monitoriza a lo largo del tratamiento. Ciertamente, existe también la posibilidad de monitorizar de forma exclusiva el enantiómero (R), alternativa justificada por la evidencia que relaciona a (S)-metadona con problemas cardiovasculares y con la falta de efecto terapéutico [5,203,204]. Por este motivo, se ha considerado la posibilidad de administrar a los pacientes únicamente la forma activa (R) [204]. Esta práctica, no obstante, solamente se lleva a cabo en Alemania y uno de los puntos que la alejan del uso generalizado a nivel europeo es que su coste llega a ser hasta un 20% más elevado que empleando la formulación racémica [203]. Además, se ha demostrado que tras la administración oral, los enantiómeros no presentan diferencias en cuanto a valores de periodo de latencia y biodisponibilidad, como tampoco existe una marcada estereoselectividad a nivel de metabolismo, aunque sí a nivel de eliminación sistémica. Pese a ello, la variabilidad en la farmacocinética de metadona no enmascara su fuerte relación dosis-concentración plasmática. Por estas razones, las diferencias estereoselectivas entre ambos isómeros no parecen ejercer una influencia relevante en la monitorización terapéutica de metadona [205]. Con todas estas premisas, para el desarrollo del presente método bioanalítico se escogió una fase reversa estacionaria de tipo aquiral, que permitiese la separación de la forma racémica de metadona.

Las condiciones que se desarrollaron y optimizaron para proceder a la cuantificación de metadona en plasma y saliva incluyeron básicamente la fase móvil y la velocidad de flujo de dicha fase móvil. La separación del pico de metadona con respecto al frente creado por el solvente fue también un punto importante durante el desarrollo del método de bioanálisis.

En relación a la naturaleza de la fase móvil, muchos autores utilizan una mezcla de eluyentes constituidos por una fase orgánica formada por acetonitrilo (ACN) y una fase acuosa tamponada entre los pH 2.3 y 7.0, ya sea en elución isocrática [103,150,151,153,156-158,160,161,163,164,167,170,172,177,187,194] o en gradiente [173-175,178,182,186,192,196,198]. Por este motivo, se probó el equipo utilizando una fase móvil binaria constituida por un 65% de tampón fosfato a pH 5.0 y un 35% de ACN (v/v) en elución isocrática [161]. En estas condiciones, se observó que el frente del solvente aparecía al inicio del cromatograma, a un tiempo de retención de 1.5 minutos, seguido del pico de metadona a los 2.2 minutos. Con la intención de separar ambos picos, se realizaron algunos cambios en la composición de la fase móvil. En primer lugar, se disminuyó la aportación del componente acuoso en un 10%, pasando del 65% al 55%. Esto generó una elución más rápida de metadona a través de la columna, provocando la fusión entre el pico de solvente y el de analito e imposibilitando la cuantificación de éste último. Al aumentar luego la concentración de fase acuosa llegando a proporciones del 70%, 75% y 80%, y manteniendo el flujo de fase móvil a 1 mL/min, se logró retrasar la elución de metadona hasta aproximadamente 3.0, 5.2 y 6.9 minutos, respectivamente. Se comprobó también que la presión interna del equipo cromatográfico aumentaba de forma proporcional al incremento de aporte de tampón fosfato, aunque sin llegar a los valores máximos establecidos por el fabricante. Para evitar cambios de presión durante los análisis, se decidió dejar estabilizar el sistema cromatográfico durante 1 hora a un flujo constante de 1.0 mL/min antes de proceder a realizar cualquier determinación.

2. Condiciones cromatográficas

Tras las pruebas realizadas, se escogió una fase móvil constituida por un 75% de tampon fosfato a pH 5.0 y un 25% de ACN (v/v), eluyendo isocráticamente a un flujo constante de 1.0 mL/min. Estas condiciones permitieron la obtención de resultados satisfactorios en cuanto a reproducibilidad y tiempo de retención de metadona (5.2 min).

La variabilidad en el tiempo de retención del analito se redujo mediante la preparación de fase móvil nueva cada día de análisis. La temperatura de trabajo de 25°C empleada en muchos estudios [162,163,165,166,172,173,176,180,185,187] resultó ser óptima para las pruebas analíticas efectuadas, por lo que se optó por mantener el laboratorio a 25°C mediante el sistema de aire acondicionado.

En relación a la detección UV, las longitudes de onda descritas para la determinación de metadona se sitúan entre 200 y 220 nm. En el presente estudio, la longitud de onda de máxima absorción se situó en 215 nm, coincidiendo con la establecida en otros estudios previamente publicados [147,152,154,171].

Estas condiciones no solo permitieron una óptima y simétrica resolución del pico cromatográfico de metadona, sino que también favorecieron la ausencia de interferencias del analito con componentes biológicos de las matrices plasmática y salival y con una serie de medicación concomitante muy común en pacientes drogodependientes y en pacientes con dolor crónico (ver sección 3.3. “Selectividad”).

3. Pretratamiento de las muestras

La preparación de muestras es una etapa esencial en el análisis de fármacos en fluidos biológicos mediante HPLC. Esta fase permite concentrar el analito dentro de un rango óptimo de cuantificación, mejorar la especificidad del método bioanalítico mediante eliminación o separación de la mayor cantidad posible de compuestos endógenos y exógenos susceptibles de generar interferencias y, por último, favorecer la liberación del analito de aquellos componentes matriciales que son incompatibles con la columna del sistema cromatográfico [206].

Si bien desde hace algún tiempo han aparecido métodos de extracción innovadores como la microextracción dispersiva líquido-líquido (DLLME) [184], la extracción líquido-líquido (LLE) convencional es una de las técnicas preparativas más descritas en la literatura científica para la extracción de metadona a partir de matrices complejas [103,150-152,154-158,160-164,167,168,170,179,182,188,192,194,196,199,200]. El otro método de extracción más utilizado es la extracción en fase sólida (SPE) en cualquiera de sus modalidades; off-line (realizada fuera del sistema HPLC) [147,153,159,171-177,183,190,191,193,195] y on-line (directamente dentro del propio sistema) [165,166,169,178,180, 181], ésta última pudiendo estar a su vez precedida de una fase de precipitación proteica [169,178, 180,181]. Además de las técnicas mencionadas, en el caso de la recuperación de metadona a partir de matriz salival se han publicado otras formas de pretratamiento, que incluyen: filtración [185], precipitación proteica [186, 197,198], centrifugación [187, 189] o adición de reactivos [201]. El empleo de estos procedimientos, *a priori* más sencillos, se justifica por el hecho de que la matriz salival es más simple que la plasmática en términos de composición, ya que está fundamentalmente formada por agua en un 99% y contiene muchos menos elementos de tipo proteico e inorgánico [111]. Sin embargo, estos procedimientos tan eficientes no permitirían su aplicación simultánea a muestras plasmáticas, por lo que el objetivo fue establecer una técnica preparativa lo suficientemente efectiva y eficiente para poder ser empleada tanto en plasma como en saliva.

Tras comparar las técnicas LLE y SPE, Rudaz et al. [162] determinaron que el método LLE proporcionaba un porcentaje de recuperación mayor y una menor, aunque aceptable, precisión. Pese a estas pequeñas diferencias, concluyeron que ambas técnicas eran equivalentes, sobre todo en lo referente a valores de linealidad y exactitud. Más adelante, Souverain et al. [165] compararon los resultados obtenidos con su método de extracción on-line en fase sólida con los del método LLE desarrollado por Eap et al. [158] y observaron una buena correlación entre los valores de concentración de metadona determinados. Además, Souverain et al. [207] establecieron poco después que la técnica LLE era más eficiente que la SPE en los análisis de metadona en plasma. Ante la publicación de comparativas tan favorables, y puesto que se trata de una de las técnicas de preparación de muestras más simples y eficientes para la extracción de metadona, la LLE fue finalmente el procedimiento adoptado en la presente tesis doctoral.

Para la extracción de metadona a partir de plasma y saliva, se basificaron las muestras antes de adicionar la mezcla extractora, de forma que metadona se encontrara en su forma molecular. Para ello se utilizó una solución de tampón borato a pH 10. En cuanto a la mezcla extractora, Kristensen et al. [155] observaron que la utilización de hexano producía porcentajes de recuperación del 90%. Por este motivo, en las pruebas de recuperación efectuadas se utilizó hexano solo y combinado con otros disolventes orgánicos, incluyendo etil acetato y dietil éter. Finalmente, empleando la mezcla extractora compuesta por dietil éter: hexano (30:70, v/v) [161,164] se obtuvo la mejor efectividad de extracción. A continuación, se transfirió la fase orgánica a un tubo de vidrio limpio de fondo cónico conteniendo 180 μ L de ácido clorhídrico 1N, para favorecer la conversión de metadona hacia su forma iónica. Tras agitar los tubos verticalmente durante 10 minutos y centrifugarlos a 2500 rpm durante 5 minutos se congelaron a -32°C. El último paso de la LLE consistió en sacar los tubos del congelador y decantar la fase orgánica aún en estado líquido, para luego analizar 100 μ L de la fase acuosa ya descongelada. Esta etapa podría explicar los buenos resultados de extracción obtenidos mediante este procedimiento (ver sección 3.3. “Recuperación”), especialmente cuando se comparan con los obtenidos en otras técnicas LLE en las que se empleó un último paso de evaporación [208,209]. En otro estudio [210] se obtuvieron valores similares de recuperación, aunque se utilizó una extracción líquido-líquido doble que implicaba un mayor tiempo de trabajo. Por otra parte, el presente procedimiento requirió la utilización de solo 5 mL de mezcla extractora por muestra, a diferencia de otros ensayos publicados en los que se utilizaron 30, 15, 8 y 6 mL de solvente orgánico, respectivamente [103,164,208,210]. En otra investigación se empleó un volumen menor de mezcla extractora (4 mL), aunque los resultados de recuperación obtenidos fueron más bajos [209]. Finalmente, el procedimiento LLE utilizado en la presente tesis doctoral demostró una elevada efectividad de extracción acompañada de una baja variabilidad en los valores obtenidos, y resultando ser, además, rápido y eficiente.

4. Validación de las metódicas analíticas

4.1. Validación completa

Un aspecto fundamental a tener en cuenta en la validación de un método bioanalítico es la selectividad, la cual permite diferenciar el analito de interés de componentes endógenos de la matriz biológica o de otros componentes presentes en la muestra. En este sentido, el tratamiento concomitante con benzodiazepinas o bien el abuso de éstas es un problema importante tanto en pacientes drogodependientes como en pacientes con dolor crónico [138,211]. Además, los pacientes heroínómanos presentan una elevada probabilidad de contraer el VIH a partir de agujas o jeringuillas usadas, o por mantener relaciones sexuales sin protección con parejas de alto riesgo. Como consecuencia, muchos pacientes heroínómanos con VIH y en mantenimiento con metadona pueden requerir, además, tratamiento con medicamentos antirretrovirales [139]. Puesto que las presentes metódicas bioanalíticas fueron diseñadas con el objetivo de poder realizar la monitorización terapéutica de metadona en pacientes en PMM y además en pacientes en terapia del dolor, en el ensayo de selectividad se añadieron varios medicamentos antirretrovirales y benzodiazepinas a los patrones de control de calidad de plasma y saliva para determinar la aparición de posibles interferencias. En dicho ensayo, no se observó ninguna interferencia endógena en el tiempo de retención del analito en los patrones de plasma y saliva analizados. Asimismo, los medicamentos antirretrovirales y benzodiazepinas ensayadas demostraron no interferir en el tiempo de retención de metadona. En otros estudios, sin embargo, no se evaluó la selectividad del método de bioanálisis con posible medicación concomitante [103,208,210,212], excepto Chikhi-Chorfi et al. [209], que realizaron el ensayo de selectividad con una selección de drogas de abuso, aunque sin tener en cuenta una posible comedición antirretroviral.

Respecto al ensayo de linealidad, se observó una buena relación lineal para los rangos de calibración establecidos en plasma (600 - 50 ng/mL) y saliva (50 - 1000 ng/mL). Para la matriz plasmática, la elección del rango se basó en los niveles terapéuticos de metadona en plasma comúnmente hallados en sujetos que utilizan metadona [38,89,165,213,214]. Lynn et al. [214] estudiaron 4 sujetos bajo PMM y obtuvieron valores de concentración máxima en sangre de 430 ng/ml en el estado estacionario. También en estado estacionario, Eap et al. [213] determinaron en 25

pacientes bajo PMM concentraciones mínimas de metadona en plasma situadas por encima de 97 ng/ml. Más tarde, se demostró que en el caso de metadona racémica, la concentración de 400 ng/ml en plasma es la que significativamente mejor se correlaciona con una buena respuesta terapéutica [89]. Coincidiendo con esta información, Souverain et al. [165] expusieron que al realizar una monitorización terapéutica de metadona, ya sea en programas de mantenimiento o en terapia del dolor, el valor de concentración plasmática de referencia es de 400 ng/ml. Por último, recientemente Hiemke et al. [38] establecieron el rango terapéutico de referencia para metadona en plasma entre 400 - 600 ng/ml. Para saliva, en cambio, no hay rangos de concentraciones de metadona establecidos. Por este motivo, se decidió utilizar el rango de concentraciones salivales establecido en el estudio realizado por Shiran et. al [103]. De este modo, los rangos de concentraciones seleccionados en la presente tesis doctoral para construir las curvas de calibrado se presumieron adecuados para la monitorización de metadona racémica tanto en plasma como en saliva.

El LLOQ se estableció en 50 ng/mL. Aunque este límite de cuantificación es moderadamente elevado comparado con el alcanzado en otros métodos publicados [103,152,208,210] se consideró suficiente para llevar a cabo el seguimiento de las curvas de concentración plasmática y salival de los pacientes tratados con metadona. A lo largo de los últimos años, en la literatura científica muchos autores se han centrado en desarrollar un método capaz de permitir la determinación de metadona cuyo LLOQ fuese el más bajo posible, llegando a alcanzar niveles de cuantificación entre 0.1 - 5.0 ng/mL [154-156,163,165,168-170,172,173,175-182,186,187,189-193,196-201]. En general, estos estudios tenían como objetivo bien la determinación de cada uno de los enantiómeros de metadona por separado [151,154-156,158-160,162-165,167-170,172,179,180,187] o bien la detección y determinación simultánea de metadona y otros compuestos en ensayos fundamentalmente cualitativos [150,173-175,181-183,186,188-197,199-201]. En este tipo de estudios, la detección por espectrofotometría de masas (MS) fue normalmente la más utilizada, ya que permite una mayor selectividad y sensibilidad, tanto en el análisis simultáneo de drogas de abuso como en el de enantiómeros de compuestos quirales [38,165]. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes, como la problemática en cuanto a la cuantificación de determinados compuestos a causa del efecto de supresión iónica del detector, la dificultad para encontrar patrones de calibrado adecuados (preferentemente análogos deuterados de los

analitos a determinar), y su elevado coste económico, hecho que impide que su adquisición esté al alcance de cualquier laboratorio de investigación [38]. Por estos motivos, el empleo de un sistema de detección por UV resultó ser más asequible, y más para el análisis de metadona, donde se ha visto que utilizar MS o UV produce resultados comparables [165]. De hecho, en publicaciones recientes centradas en la monitorización de metadona, tanto sola [184] como acompañada de otros compuestos [183], el LLOQ se estableció en 85 y 50 ng/mL respectivamente, pese a utilizarse en el segundo estudio un sistema de detección por MS.

Los resultados logrados en las pruebas del efecto de la dilución y de exactitud y precisión también fueron aceptables: se obtuvieron valores de error relativo dentro del $\pm 15\%$ de la concentración teórica y coeficientes de variación por debajo del 15% de la concentración nominal para los distintos niveles de concentración ensayados.

El método validado también demostró una buena recuperación, ya que los resultados obtenidos muestran el gran rendimiento de extracción alcanzado mediante el procedimiento LLE utilizado en la preparación de muestras. Para metadona en plasma, el valor de recuperación media obtenido a partir de los patrones de control de calidad analizados resultó ser de $99.55\% \pm 1.42$, mientras que para metadona en saliva la recuperación media resultó ser de $97.93\% \pm 1.09$. Estos porcentajes de recuperación superaron a los logrados por la mayoría de técnicas LLE [150-152,154-158,160,162,163,167,168,188,192,194,196,] y SPE [153,159,171,173-178,181,190, 193,195] publicadas en la literatura, y fueron similares a los obtenidos en un estudio realizado a partir de muestras plasmáticas donde se empleó la misma mezcla extractora [164].

La estabilidad a largo plazo de metadona en plasma bajo congelación (-20°C) ya ha sido demostrada anteriormente [215], así como su estabilidad en distintas soluciones orales a temperatura ambiente ($20-25^{\circ}\text{C}$) y en nevera (5°C) [216]. En el presente estudio, la estabilidad de metadona en la solución stock fue satisfactoria tras 12 meses de congelación a -32°C . Metadona demostró también ser estable en plasma y saliva por lo menos tras tres ciclos de congelación y descongelación, puesto que no hubo cambios significativos en la concentración de los patrones de control de calidad durante el ensayo. Además, metadona cumplió los requisitos de aceptación siendo estable en

ambas matrices hasta 10 horas a temperatura ambiente y tras 90 días almacenada a -32°C. Metadona también fue estable en el extracto final durante las 10 horas que se mantuvo en el inyector automático, y tras 10 días congelada a -32°C, ya que no se observó una degradación significativa del analito. Puesto que el extracto final en solución ácida es el mismo independientemente de la matriz de la cual se extrae metadona, se asumió que las muestras salivales procesadas fueron igual de estables que las plasmáticas. En consecuencia, metadona fue estable bajo todas las condiciones de laboratorio a las que se sometió. Estos datos de estabilidad son consistentes con otros previamente publicados para metadona en plasma [172] y saliva [187].

4.2. Validación parcial

Los resultados obtenidos en la validación parcial realizada en el nuevo laboratorio de análisis fueron igualmente satisfactorios. Respecto al ensayo de linealidad, se observó una buena relación lineal para los rangos de calibración establecidos en plasma y saliva (50 - 1000 ng/mL). Asimismo, también fueron aceptables los valores logrados en el ensayo de exactitud y precisión, tal y como se muestra en la **Tabla 40** del apartado de resultados.

En definitiva, y con las condiciones cromatográficas descritas, se puede decir que se han conseguido métodos analíticos adecuados, fiables y válidos para la cuantificación de metadona en muestras de plasma y saliva provenientes de los pacientes incluidos en el estudio y que además no necesitaban de un utillaje excesivamente costoso ni tampoco extraño a nivel hospitalario y con un importe económico para un posible análisis continuado muy asequible.

5. Determinación de la función del error analítico

Teniendo en cuenta que las metodicas analíticas han sido convenientemente validadas, el paso siguiente fue determinar la funcionalidad del error analítico para establecer si era o no distinta cuantitativamente y cualitativamente en cada unas de las matrices biológicas ensayadas. La determinación de esta función es importante, ya que se presenta como candidato alternativo a los clásicos métodos de ponderación en el análisis matemático farmacocinético de los resultados experimentales, por lo que seguidamente pasamos a comentar los resultados obtenidos en su determinación.

A partir de los coeficientes del ajuste polinomial del error analítico que se encuentran recogidos *in extenso* en las **Tablas 43** y **44** del apartado de resultados, se determinó la función que mejor se ajustaba a los datos experimentales. Para ello, se realizó un análisis estadístico siguiendo la metodología inicial denominada *Forward* o de incorporación progresiva, seguida de la conocida como *Stepwise*. La metodología *Stepwise* permitió discriminar el mejor ajuste entre las funciones, cuando los valores de coeficiente de correlación, de F, del error estándar estimado y del nivel de probabilidad no diferían significativamente. Los resultados obtenidos se muestran en las **Tablas 48** y **49** para metadona en plasma y saliva, respectivamente.

Tabla 48. Análisis estadístico para el ajuste polinomial del error analítico de metadona en plasma.

Variable de regresión	r^2	Error estándar	F	P
C	0.0302	4.63	0.69	0.42
C ²	0.0016	4.70	0.04	0.85
C ³	0.0016	4.70	0.04	0.85
C, C ²	0.2176	4.07	4.20	0.03
C, C ³	0.2041	4.10	3.95	0.04
C ² , C ³	0.1668	4.20	3.30	0.06
C, C ² , C ³	0.1846	4.15	2.74	0.07

Tabla 49. Análisis estadístico para el ajuste polinomial del error analítico de metadona en saliva.

Variable de regresión	r ²	Error estándar	F	P
C	0.1163	8.03	3.42	0.08
C ²	0.0675	8.25	1.88	0.18
C ³	0.0428	8.36	1.16	0.29
C, C ²	0.1381	7.79	3.16	0.06
C, C ³	0.1256	7.84	2.94	0.07
C ² , C ³	0.0908	8.00	2.35	0.12
C, C ² , C ³	0.1170	7.88	2.19	0.12

La función óptima del error analítico establecida para cada una de las matrices biológicas ensayadas se muestra en la tabla siguiente (**Tabla 50**) y se representa en la **Figura 14**:

Tabla 50. Función del error de la metódica analítica seleccionada para cada una de las matrices biológicas.

Matriz biológica	Función del error
Plasma	DE (ng/mL) = 1.65 + 0.51 C – 7.24E-05 C ²
Saliva	DE (ng/mL) = 10.04 + 8.33E-03 C

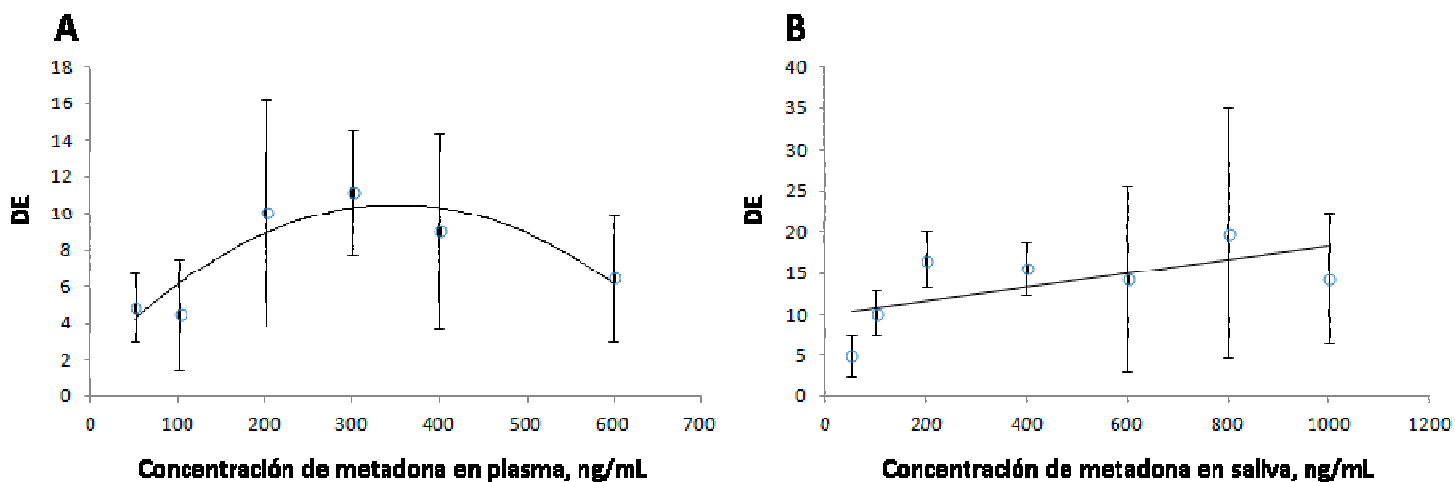


Figura 14. Media y desviación estándar de las desviaciones estándar obtenidas en el estudio de funcionalidad del error de la metódica analítica frente a los valores de concentraciones teóricas de la recta de calibrado de metadona en plasma (A) y metadona en saliva (B).

Como podemos observar, el error analítico no tiene por qué ajustarse *a priori* a un mismo tipo de función, sino que puede ser descrito mediante distintas funciones, incluyendo las lineales, como ocurre en el caso de metadona en saliva, y las no lineales, como ocurre en el caso de metadona en plasma.

Esta variedad de funciones aplicable en la descripción de la función del error, aparece incluso en el caso peculiar que se presenta en este estudio.

Así, el principio activo en ambos casos fue el mismo, como también lo fue el proceso de extracción desde cada una de las matrices biológicas (LLE). Además, la cuantificación se realizó con la misma técnica analítica (HPLC en fase reversa), con métodos que tenían en común el tipo de columna y fase móvil empleados, la longitud de onda de detección en el UV y el volumen de inyección. Por otro lado, los métodos diferían en el tipo de matriz biológica utilizada y el rango de calibración validado, por lo que estas diferencias podrían haber sido determinantes a la hora de obtener ajustes funcionales distintos.

De acuerdo con lo comentado, se deduce que resulta necesario determinar la función del error analítico de un mismo principio activo para cada matriz biológica y rango de calibración empleados, puesto que, como ya se indicó, *a priori* no es posible establecer el tipo de funcionalidad existente.

Las fuentes de error total conocidas pueden deberse al diseño del estudio inadecuado como consecuencia de un esquema de tiempos de muestreo incorrecto, el cual puede prevenirse, y por tanto evitarse en gran medida, antes de empezar el estudio. Otras veces, o además, el error puede proceder de inespecificaciones del modelo cinético empleado. Esta fuente de error puede disminuirse mediante la realización de un estudio estadístico de discriminación de modelos [217].

Por último, el error puede proceder también, o además, de la cuantificación de las concentraciones de principio activo estudiado [218,219], y es esta fuente de error la que puede minimizarse mediante el conocimiento de la función del error analítico, determinada tal y como aquí se describe.

De esta forma, una de las principales aplicaciones de la determinación de la función del error analítico es su utilización como posible método de ponderación en la estimación de parámetros farmacocinéticos [220-225].

6. Estudio de los niveles de metadona en plasma y saliva humanos

6.1. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en PMM

Una vez establecidas las características de los métodos analíticos, continuaremos con la discusión de los resultados experimentales obtenidos en los estudios farmacocinéticos de metadona en pacientes incluidos en PMM.

Resulta importante destacar la dificultad real existente en la obtención de muestras sanguíneas en pacientes incluidos en PMM. Este hecho se ha visto agravado por la situación de crisis económica y restricciones del ámbito sanitario bien conocido que han dificultado la necesidad de ingreso en el hospital por parte de estos pacientes. Por otra parte, además, hay que tener en cuenta el entorno socio-económico en el que se encuentran, así como la dificultad física de encontrar una vía de acceso sana para proceder a la extracción, ambos aspectos puestos de manifiesto de forma reiterada por el servicio de enfermería del CAS Osona Salut Mental de Vic. Todo ello ha supuesto una dificultad añadida en el reclutamiento de pacientes para el estudio, lo que por otro lado denota la importancia real de llevar a cabo la monitorización terapéutica a través de una vía no invasiva como alternativa a la parenteral.

Curvas concentración-tiempo

Para metadona en plasma, las curvas concentración-tiempo mostraron un descenso rápido tras el pico máximo de fármaco, seguido de una eliminación notablemente más lenta. Ello podría sugerir una disposición farmacocinética de tipo bicompartimental, tal y como se ha indicado en diferentes estudios [13,14,17,157].

Por otra parte, los perfiles salivales mostraron una mayor irregularidad a lo largo del tiempo. Además, en el 50% de los pacientes los niveles de metadona fueron

superiores a los plasmáticos, coincidiendo con lo observado en otro estudio que determinó el tabulado concentración-tiempo de metadona en saliva en 4 pacientes incluidos en PMM [209]. Esta variabilidad en los niveles salivales de metadona con respecto a los plasmáticos origina cocientes saliva/plasma distintos para cada paciente, fenómeno que se discute más adelante, en el apartado “correlación de las concentraciones de metadona en plasma y saliva humanos”, y que podría estar influido por distintos factores.

Análisis farmacocinético: aproximación paramétrica mediante análisis de regresión no lineal

La obtención de los mejores valores en la estimación de parámetros farmacocinéticos constituye un punto crítico para la correcta interpretación de los resultados y de las propiedades farmacocinéticas de un fármaco. La elección del método de ponderación en el análisis de regresión no lineal de datos farmacocinéticos puede originar valores de parámetros farmacocinéticos imprecisos o erróneos. Puesto que no existe un método de ponderación válido y adecuado para todos los casos, la heteroscedasticidad de los errores constituye un serio problema en la regresión, especialmente cuando el error de la varianza es desconocido y no se dispone de replicados para el análisis [224]. Por esta razón, se decidió comparar el método de ponderación basado en el inverso de la varianza de la concentración ($1/V$), calculada a través de la función del error de las metodías analíticas validadas, con otros métodos de ponderación clásicos, incluyendo el método homoscedástico ($W=1$) y métodos heteroscedásticos de $1/C$, $1/C^2$ y $1/\sqrt{C}$.

Los resultados del análisis estadístico no mostraron diferencias significativas entre los distintos métodos de ponderación. La variabilidad inter-individual obtenida para cada uno de los parámetros determinados fue elevada tanto para metadona en plasma como en saliva, pero no se encontraron diferencias significativas entre las medianas de cada grupo tras la aplicación de la prueba H de Kruskal-Wallis. Por tanto, los resultados obtenidos en el presente estudio indicaron que en este caso la elección entre los distintos algoritmos de ponderación no tendría mayor importancia y no influiría en la estimación de los parámetros farmacocinéticos de metadona.

A pesar de ello, el conocimiento y uso de la función de error analítico como un posible método de ponderación de los datos experimentales para la estimación paramétrica se considera una herramienta útil en farmacocinética clínica, sobre todo en situaciones de escasez de datos, ya que permite asignar a cada valor de concentración un patrón de error analítico específico para cada usuario en el laboratorio clínico [225]. Aunque otros autores encontraron diferencias en la estimación paramétrica entre los métodos de ponderación usados en estudios con gentamicina [226] y carebastina [225], esta es la primera vez que se realiza una comparativa en estudios farmacocinéticos con metadona que haya sido objeto de alguna publicación científica.

En cuanto a los valores de los distintos parámetros farmacocinéticos obtenidos para metadona en plasma y saliva (**Tabla 45** del apartado de resultados), resulta importante tener en cuenta las siguientes consideraciones.

Así, en dos estudios publicados sobre la farmacocinética de metadona en plasma, se investigó el uso de la aproximación farmacocinética poblacional para determinar la dosis de metadona óptima en un total de 35 pacientes en PMM [14,17]. La farmacocinética clásica se basa en los datos exhaustivos (extracción de muestras sanguíneas de forma regular durante todo el intervalo de dosificación) de un grupo pequeño de individuos, mientras que la farmacocinética poblacional utiliza datos concentración-tiempo escasos una vez la estimación de los parámetros farmacocinéticos se ha calculado a partir de un mayor número de sujetos. En nuestro caso, aunque el empleo de la farmacocinética poblacional no pudo efectuarse por el bajo número de sujetos en estudio, los valores de los parámetros obtenidos mediante el análisis farmacocinético clásico en los pacientes seleccionados son consistentes con los valores de referencia hallados en la bibliografía [3,5]. En este sentido, los valores medios de $t_{1/2\beta}$ (36.22 ± 18.08), CL/F (5.93 ± 1.27), $Vd\beta/F$ (4.13 ± 2.66) y $t_{max(ss)}$ (3.76 ± 3.39) para metadona en plasma se corresponden con los mostrados en la **Tabla 2** del apartado de farmacocinética de la introducción. Asimismo, la concentración plasmática media en estado de equilibrio estacionario hallada (468 ng/mL) coincide también con los valores de referencia establecidos en las guías de monitorización terapéutica de metadona en psiquiatría ($400\text{-}600 \text{ ng/mL}$) [38]. La mayor variabilidad obtenida en el análisis farmacocinético de los pacientes en PMM se obtuvo para k_a , α y $t_{1/2\beta}$. La constante de absorción y la constante de rápida disposición son normalmente los parámetros más

sensibles a mostrar variabilidad interindividual [224]. En cuanto a la semivida de la fase β , un factor importante que influye en la farmacocinética de metadona es la administración concomitante de fármacos inhibidores enzimáticos [5]. Precisamente, el paciente 1 estaba en tratamiento con inhibidores de la proteasa (ritonavir, lopinavir) e inhibidores selectivos de la recaptación de serotonina o ISRS (paroxetina), mientras que el paciente 2 estaba tratado con ISRS (venlafaxina). En comparación con los pacientes 3 y 4, que no estaban tratados con medicación de estas características, los pacientes 1 y 2 mostraron una semivida en la fase β muy superior (51.78 y 51.97 h vs. 20.11 y 21.02 h para los pacientes 1 y 2 vs. 3 y 4, respectivamente), seguramente a causa de la inhibición del metabolismo de metadona por parte de dicha comedicación.

El análisis de los valores obtenidos en la disposición salival de metadona fue más complicado, ya que los datos publicados en este campo son muy escasos. Únicamente un estudio [209] determinó las curvas concentración-tiempo de metadona en saliva en 4 pacientes en PMM, mostrando una variabilidad en el $t_{max(ss)}$ comprendida entre las 2-5 horas post-dosis. Aunque en la presente investigación se analizó el mismo número de pacientes, los valores obtenidos mostraron una mayor variabilidad (6.52 ± 3.10 h). Comparando los valores obtenidos en plasma y saliva, se observó que el $t_{max(ss)}$ se alcanzaba más tarde en la matriz salival que en la plasmática, lo que sugeriría (1) la presencia de un cierto tiempo de retraso entre un compartimento y otro debido a procesos de distribución/redistribución en el organismo, y (2) que la tasa de excreción salival estaría relacionada con la concentración de fármaco en plasma. No obstante, resulta evidente la necesidad de realizar estudios con un número mayor de pacientes para obtener datos más concluyentes.

Correlación de las concentraciones de metadona en plasma y saliva humanos

Al efectuar la correlación entre las concentraciones experimentales de metadona y sus correspondientes valores teóricos obtenidos tras el ajuste farmacocinético y aplicando el método homoscedástico ($W=1$), se obtuvieron valores de coeficiente de correlación significativos tanto en plasma ($r=0.8971$, $p<0.001$, $n=38$) como en saliva ($r=0.9220$, $p<0.001$, $n=36$). Este hecho indicaría que se ha efectuado un adecuado ajuste para las concentraciones experimentales de metadona en cada una de las matrices estudiadas.

Para metadona en plasma, el ajuste de los perfiles farmacocinéticos a un modelo bicompartimental es consistente con el empleado en estudios anteriores en pacientes en PMM [13,14,17,157]. Por otro lado, el ajuste de los perfiles de metadona en saliva a un modelo farmacocinético concreto resulta extraño, ya que dichos modelos están basados en niveles plasmáticos de fármaco, no en niveles de concentración salival. Pese a ello, un estudio reciente analizó la relación farmacocinética plasmática y salival de un número elevado de fármacos, ajustando la disposición salival de acuerdo con un modelo de un solo compartimento, y suponiendo que la tasa de excreción salival era dependiente de la concentración de fármaco en plasma [227]. Para probar esta suposición, los autores relacionaron los perfiles de concentración salivales y plasmáticos, obteniendo un buen coeficiente de correlación hasta los valores medios de t_{max} . En el presente estudio, tras realizar el mismo ajuste, el coeficiente resultante de correlacionar las concentraciones experimentales de metadona en plasma y saliva fue estadísticamente significativo ($r=0.5159$, $p<0.001$, $n=38$) no sólo hasta los valores medios de t_{max} , sino a lo largo de todo el intervalo de dosificación.

Los cocientes S/P obtenidos durante el intervalo de dosificación para cada uno de los pacientes en PMM se detallan en la **Tabla 46** del apartado de resultados. En ellos se puede observar que durante la fase de supuesta eliminación del fármaco, el cociente S/P medio es inferior al cociente medio de áreas bajo la curva de 0 a 24 horas. Esto podría indicarnos la existencia de un largo periodo de tiempo donde metadona se estaría absorbiendo, originando altos cocientes S/P. La explicación reside en que la concentración plasmática de fármaco no es homogénea en el espacio intravascular. Mientras que todas las arterias tienen los mismos niveles de fármaco, cada vena procedente de diferentes órganos puede tener diferentes concentraciones de fármaco, tanto entre ellas como en relación con su respectiva arteria [135]. Este problema circulatorio ha sido bien referenciado en la literatura tanto en animales [228] como en seres humanos [229], y aporta evidencias para la comprensión de la discrepancia entre las concentraciones plasmáticas venosas de los fármacos, que son las que se miden comúnmente, y su efecto [229,230]. Durante la entrada de un fármaco al organismo, las arterias tienen concentraciones de fármaco en plasma más altas que todas las venas de la gran circulación. Así, mientras el fármaco ingresa en las arterias del cuerpo, transportan una cantidad que excede a la que se está eliminando. Esto se repite después de cada ciclo circulatorio hasta que se alcanza el estado estacionario. En este punto, la cantidad

de fármaco que entra en el organismo es la misma que la eliminada, y las concentraciones en vena y arteria se vuelven iguales. Una vez que la administración se interrumpe, la caída de los niveles de fármaco procede de todas las ramas del aparato circulatorio. Después del cese de la entrada de fármaco, las venas presentan concentraciones superiores a las arterias. Esta inversión durante la fase de eliminación es debido a que la sangre que entra en las arterias de la gran circulación sufre una dilución causada por el menor contenido de soluto que tenían las venas procedentes de los órganos eliminadores [135]. De acuerdo con lo comentado, cuando metadona se absorbe, las glándulas salivales, igual que sucede con otros órganos, reciben el fármaco a través de los capilares sanguíneos de la zona arterial, transfiriéndolo hasta los conductos salivales a través de las células acinares. En este momento, el fluido formado en los acinos tiene la misma composición en metadona libre que el plasma arterial. Por tanto, antes que el fluido regrese al espacio venoso a través de las células ductales, la concentración de metadona en saliva (S) está más estrechamente relacionada con la concentración libre en plasma arterial que con la presente en el plasma venoso (P) y, cada vez que el medicamento entra en el organismo, sus niveles salivales se incrementan porque el aumento en arteria es mucho mayor que en vena.

De todos modos, el cociente S/P medio en la fase de eliminación determinado en los pacientes en PMM (1.2 ± 0.8) es alto para lo que supondría un cociente “libre en plasma/plasma total” (0.14, suponiendo una unión a proteínas plasmáticas del 86%). Por consiguiente, estarían contribuyendo al aumento del cociente S/P tres posibles factores: (1) el pH salival débilmente ácido, que favorecería el paso de metadona libre en plasma hacia la saliva a causa del efecto de atrapamiento iónico que se explica más adelante; (2) los transportadores de eflujo como P-gp, responsable del transporte activo de fármacos hacia el conducto salival [134] y cuya sobreexpresión puede influir sobre el cociente S/P [135]; y seguramente el más importante (3) la reabsorción que tendría lugar a partir de la secreción de metadona hacia el estómago y luego desde el intestino de nuevo hacia el plasma [231]. Este último punto (3), significaría un mayor nivel arterial que venoso de fármaco al producirse la reabsorción de metadona, sobrecargando la saliva en relación con el plasma venoso y produciendo valores elevados de cociente S/P. Se observa también en la **Figura 10** del apartado de resultados que en el paciente 1 (A), hasta las 8 horas existiría una importante recirculación estimulada probablemente por la ingesta de alimentos. No se puede descartar una reabsorción importante posterior

a la cena, aunque no fuese detectada, quizás porque ya quedaba en el organismo una cantidad menor de metadona en recirculación. De todos modos, aún cuando existan estímulos que aumenten la secreción gástrica, normalmente se producen secreciones basales que contribuyen a dicha reabsorción [232], exacerbada, sin duda, después de las comidas. En este sentido, los pacientes 2 (B) y 4 (D) presentaron un leve aumento en el cociente S/P a las 24 horas, muy posiblemente relacionado con la reabsorción de metadona posterior a la cena. La información referente a estos tres puntos se ampliará más adelante con la experiencia llevada a cabo en pacientes en terapia del dolor.

6.2. Estudio de los niveles de metadona en pacientes en terapia del dolor

A continuación, procederemos con la discusión de los resultados experimentales obtenidos en los estudios en pacientes bajo terapia del dolor, valorando también las distintas técnicas de recogida de muestras salivales aplicadas y su adecuación a la monitorización farmacocinética de metadona.

Correlación de las concentraciones de metadona en plasma y saliva humanos

La saliva es considerada una matriz efectiva en la comprobación del cumplimiento del tratamiento con metadona en los programas de manejo del dolor y en PMM, así como en la identificación de su consumo ilícito en controles de tráfico [198,233,234]. Por el contrario, el procedimiento de muestreo salival ha sido considerado inadecuado para la monitorización de metadona a causa de la gran variabilidad obtenida en el cociente S/P [103,147,185,208,233].

El proceso de recogida de la saliva es un elemento importante en la determinación de niveles de fármacos y, dependiendo de la técnica utilizada (estimulación salival o no estimulación salival), puede afectar a la concentración hallada, y por lo tanto al cociente S/P [235]. Las técnicas más frecuentemente utilizadas para la toma de muestras salivales en estudios de concentraciones de metadona en plasma y saliva son, por un lado, hacer escupir al paciente directamente en un tubo para análisis [103,147,208-210,212,214,233] y, por otro, la utilización del dispositivo Salivette® [185,198,212]. Estos dos métodos permiten la recogida de saliva sin estimulación [235]. Sin embargo, la estimulación del flujo salival mediante el uso de ácido cítrico, goma de mascar u

otros agentes, tiene varias ventajas, incluyendo el aumento del volumen de muestra obtenida en un periodo de tiempo corto, la estabilización del pH de la muestra alrededor de 7.4 y una disminución de la variabilidad interindividual en el cociente S/P para determinados fármacos [236].

En un estudio previo [135], se diseñó un nuevo protocolo de muestreo para la detección de cambios en el aclaramiento sistémico en pacientes epilépticos en monoterapia con carbamazepina o fenitoína, basado en la estimulación salival utilizando ácido cítrico. Esta técnica tiene en cuenta las diferencias de concentración arterio-venosa de un fármaco, ya que permite recoger dos fracciones de saliva (S1 y S2), cuyo contenido se asemeja a la concentración de fármaco presente a nivel arterial y venoso, respectivamente. Puesto que la pobre correlación existente entre las concentraciones plasmáticas y salivales de un fármaco podría explicarse, en parte, por la omisión de este fenómeno arterio-venoso [237,238], este método basado en la estimulación fraccionada podría ser de utilidad en el estudio de variaciones en el cociente S/P de metadona.

Precisamente, varios autores [103,147,208,212,233,239] estudiaron la relación entre los niveles salivales y plasmáticos de metadona, obteniendo una amplia variabilidad de valores. Cabe destacar, sin embargo, que en la mayoría de estudios se utilizó el “método de escupida” para el muestreo salival. Escupir proporciona un fluido oral limpio, aunque relativamente viscoso y con la posibilidad de que esté contaminado con comida y otros residuos presentes en la boca. Por lo tanto, puede no proporcionar una muestra salival de volumen o concentración uniforme, resultando en cocientes S/P muy variables para un mismo fármaco [235]. Como se ha comentado anteriormente [236], los métodos de muestreo salival pueden influir en los resultados analíticos obtenidos. Por este motivo se decidió investigar la influencia del dispositivo Salivette® y del ácido cítrico en el estudio de los niveles de metadona, donde diferencias en la fluctuación de las concentraciones arterio-venosas pueden generar inconsistencias en el cociente S/P [237].

De acuerdo con la **Tabla 47** del apartado de resultados, los dispositivos Salivette® utilizados proporcionaron una mejor correlación S/P en comparación con el método del ácido cítrico. Tanto el cociente de correlación S/P (1.3) como la media de los cocientes S/P (0.9) obtenidos con Salivette® son consistente con los valores de 1.3 y 1.1

obtenidos por Wolff y Hay [147], y Shiran et al., [103], respectivamente. Además, la media de los cocientes S/P de 0.5 obtenida para la fracción salival S1 fue similar a los valores medios de 0.5 y 0.6 determinados por Kang y Abbott [208], y Hsu et al. [233], respectivamente. Estos resultados muestran que pueden obtenerse diferencias en la relación S/P de metadona dependiendo de la técnica utilizada para la recogida de saliva.

Otro factor importante que influye en el cociente S/P de metadona es el pH. En pacientes bajo PMM, el pH salival oscila entre 5.0 y 8.0 [103,198,212,233]. Pese a que en el presente estudio el pH salival no fue determinado, teniendo en cuenta el carácter débilmente básico de metadona (pK de 8.9 a 25°C) [39], el valor de pH para cada fracción salival puede obtenerse a partir de la ecuación de Henderson-Hasselbalch [214] mediante la extrapolación de los valores S/P medios correspondientes (recogidos en la **Tabla 47** del apartado de resultados). Empleando dicha ecuación, los valores de pH calculados fueron aproximadamente de 6.6 para Salivette®, 6.9 para S1 y 7.8 para S2. Puesto que las muestras obtenidas con Salivette® contenían las concentraciones de metadona más elevadas, seguidas de las fracciones S1 y S2, respectivamente, estos resultados concuerdan con la información publicada sobre la asociación de pH bajos a un aumento de la concentración salival de metadona [103,198,212,233]. Este fenómeno, conocido como atrapamiento iónico, se produce cuando el pH salival es menor que el sanguíneo. De esta forma, cuando metadona difunde hacia la saliva, la molécula se ioniza y es incapaz de difundir de nuevo hacia la sangre debido al cambio en el gradiente de concentración [236]. Los cálculos realizados muestran que el cociente S/P osciló entre 0.06 para un pH de 7.8 (fracción S2) y 0.92 para un pH de 6.6 (Salivette®), lo que supondría un aumento de 15 veces el cociente S/P. Por tanto, solamente la variación en una unidad del pH salival puede influir notablemente sobre el cociente S/P final. Sin embargo, se ha considerado que el pH salival explicaría sólo el 10-36% de la variabilidad obtenida en los cocientes S/P [103].

Como ya se ha indicado en el estudio con sujetos en PMM, otra causa de variabilidad en el cociente S/P vendría dada por una sobreexpresión en los transportadores de eflujo (P-gp), que facilitaría la transferencia de metadona hacia la saliva. La inducción sistémica de los transportadores de eflujo puede detectarse mediante los cocientes S1/S2 y S2/P [135]. Sin embargo, no fue posible determinar los niveles de metadona en el 30% de muestras S1 ni en el 40% de muestras S2, a causa de

las características de base débil de metadona y de la influencia del pH salival sobre la concentración final de metadona en saliva. Por tanto, el impacto que tendría el pH en el proceso de transferencia de metadona hacia la saliva sería tal, que la contribución de los transportadores de eflujo sería mínima.

Otro punto a comentar son las diferencias halladas en la literatura científica con respecto a la relación entre los niveles plasmáticos y salivales de metadona [103,147,233]. En el presente estudio, se obtuvo una relación lineal entre los niveles salivales de metadona de las muestras recogidas con Salivette® y las concentraciones plasmáticas ($r=0.79$, $p<0.01$, $n=12$). Esta situación también se observó en un estudio realizado por Wolff et al. [147] en el que se utilizó el “método de escupida” para la obtención de saliva ($r=0.81$, $p<0.001$, $n=21$). Sin embargo, en otros dos estudios donde se analizó un mayor número de muestras, las correlaciones obtenidas fueron débiles, aunque significativas [103,233]. Por lo tanto, el reducido número de participantes incluidos en el presente estudio podría haber influido sobre los resultados obtenidos.

Wolff et al. [147] también encontraron una relación lineal entre la dosis de metadona recibida (mg/kg/día) y las concentraciones salivales, hecho que no se observó en otros estudios [198,212]. Sin embargo, en la presente investigación se obtuvo un relación logarítmica entre la dosis de metadona recibida (mg/kg/día) y los niveles plasmáticos, y entre la dosis recibida (mg/kg/día) y las concentraciones salivales obtenidas a partir del muestreo con Salivette®, lo que sugiere que el metabolismo de metadona aumenta en tratamientos crónicos, coincidiendo con lo expuesto en la bibliografía [3]. Por lo tanto, las concentraciones de metadona no aumentarían en la misma proporción que las dosis diarias recibidas, sino que lo harían en una proporción menor.

Curvas salivales concentración-tiempo

En lo que se refiere a las curvas salivales de concentración-tiempo, se observaron múltiples picos a distintos tiempos tras la administración de metadona, los cuales no estaban relacionados con la dosis de fármaco recibida. Luego se observó que dichos picos aparecían poco después de tener lugar una ingesta de alimentos, produciendo un aumento significativo en los niveles salivales de metadona. Esto podría evidenciar una

probable recirculación gastrointestinal de metadona, planteada anteriormente en el estudio con pacientes en PMM. Una explicación plausible sería que, después de la ingestión de comida, se produciría una secreción considerable de metadona hacia el estómago, la cual se reabsorbería en el intestino hacia la sangre y pasaría finalmente a la saliva, donde un aumento en los niveles de fármaco es más fácil de detectar que en el plasma venoso.

La secreción gástrica seguida de una posterior reabsorción intestinal ha sido estudiada como un mecanismo plausible para explicar la aparición de múltiples picos post-dosis en la disposición de fármacos básicos como fenoperidina ($pK=7.7$) y fentanilo ($pK=8.4$) [231], por lo que podría también aplicarse a metadona ($pK=8.9$). Esta posibilidad es consistente con un estudio previo [240] en el que los autores plantearon la hipótesis de que las bases débiles podrían ser eliminadas de la sangre al pasar a través del epitelio gástrico, excretándose hacia el estómago. Puesto que el jugo gástrico tiene un pH aproximado de 1 y el plasma de 7.4, cabría esperar que metadona se concentrara en el jugo gástrico, debido al efecto de atrapamiento iónico indicado anteriormente. Lynn et al. [214] también observaron que metadona administrada por vía intramuscular era excretada a altas concentraciones en el jugo gástrico de los pacientes en PMM. En consecuencia, la secreción de ácido gástrico estimulada por la ingesta de alimentos junto con el aumento del flujo sanguíneo hacia el estómago y la absorción de nutrientes [241] podrían favorecer la secreción de metadona hacia el estómago después de las comidas. Así, considerando que la circulación entero gástrica tiene lugar varias veces al día debido a la ingesta de comida, cabría esperar valores altos en el cociente de concentración S/P, como ocurría en los pacientes en PMM.

En otro estudio reciente realizado en 16 sujetos sanos a los que se administró neviparina en dosis únicas, se desarrolló un modelo farmacocinético poblacional incluyendo mecanismos de recirculación para la descripción de múltiples picos presentes en la disposición del fármaco en plasma [242]. Dicho modelo logró un mejor ajuste que los modelos convencionales, por lo que el estudio farmacocinético poblacional de un número mayor de sujetos en tratamiento con metadona que incluyese la aparición de múltiples picos post-dosis podría ser de utilidad para explicar la disposición de este medicamento en el organismo de los pacientes.

En la presente investigación, los picos postprandiales de metadona en saliva aparecieron entre 1 y 5 horas después de la ingesta de alimentos (media±SD = 1.97±1.36 h). Existen diferentes factores que podrían explicar esta variabilidad, tales como la composición de la comida, la rapidez en el tiempo de vaciado gástrico, la tasa de flujo sanguíneo que circula a través del estómago y la naturaleza de la barrera celular situada entre la sangre y el jugo gástrico [214,231,241]. Además, la reducción en la motilidad gástrica inducida por metadona [3,231] también podría explicar el retraso en la aparición de estos picos.

Valoración de diferentes técnicas de recogida de muestras salivales basadas en la estimulación y la no estimulación de saliva y posible aplicación a la clínica del tipo de pacientes del estudio

Un apartado que se considera de especial interés reseñar, por la problemática que generó durante la realización de este estudio, es el de analizar las diferentes técnicas de recogida de muestras salivales por su posible implicación clínica.

Como se ha demostrado en estudios anteriores [135,243,244], la variabilidad en la concentración de fármaco en saliva puede disminuirse mediante el uso de procedimientos de estimulación salival, como es el uso de ácido cítrico. Esta posibilidad se confirmó en la presente investigación, ya que la fracción estimulada S2 mostró una menor variabilidad en las concentraciones de metadona halladas que la fracción S1 y que las muestras recogidas con Salivette®. Sin embargo, las muestras S2 también contuvieron los niveles más bajos de metadona, llegando a ser indetectables en varios pacientes. Esto podría deberse a que S2 representa la fracción procedente de la parte superior de los conductos salivales [135], cuyo pH es muy similar al plasmático (7.4) [245]. Por lo tanto, cuanto más cercano es el pH salival al pK de metadona, una menor cantidad de fármaco libre difunde del plasma a la saliva y viceversa [233]. Como resultado, el efecto de atrapamiento iónico es menor, así como las concentraciones de metadona halladas.

Por otro lado, el muestreo de la fracción S2 se pudo estandarizar fácilmente en comparación con la fracción S1. Esta última, por el contrario, fue difícil de estandarizar debido a que los pacientes la retenían demasiado tiempo en la boca, mezclándola con la

fracción S2 antes de escupirla en el tubo colector. Además, tal y como se observa en la **Tabla 47** del apartado de resultados, en algunas muestras S1 no se pudo determinar la concentración de metadona, ya que cuanto mayor es el volumen de saliva recogida, más se diluye la muestra y más acerca su composición a la de la fracción S2 [135]. Por lo tanto, para hacer frente a este problema, se aconsejaría la recogida de un pequeño volumen de saliva (1 mL) en no más de 1 minuto para la obtención de una muestra representativa de la fracción S1.

Los dispositivos Salivette® utilizados permitieron la recogida de un volumen constante de saliva de aproximadamente 1 mL. Las mayores concentraciones de metadona se obtuvieron tras el muestreo con Salivette®, así como los mejores cocientes S/P. Otro estudio [212] encontró pérdidas de metadona de aproximadamente un 40% al usar Salivette®, en comparación con el “método de escupida”, a causa de la adsorción de metadona en el dispositivo. A pesar de que este parámetro no fue determinado en el presente estudio, el dispositivo Salivette® mostró ser el método más estable para la recogida de saliva, ya que no rompe el equilibrio en la formación de saliva dentro del conducto salival. La recogida de muestras con Salivette® durante más tiempo (5 minutos) también mostró uniformidad en el volumen de muestra recogida. Sin embargo, el volumen obtenido fue muy bajo en los pacientes 2 y 8, ya que alegaron tener la boca seca. Metadona, del mismo modo que ocurre con otros opiáceos y opioides, produce frecuentemente xerostomía [246]. Además, ambos pacientes estaban en tratamiento con otros fármacos (antihipertensivos, antidepresivos y anticonvulsivantes), los cuales también han demostrado causar una reducción sustancial del flujo salival [117]. En consecuencia, el muestreo de saliva con dispositivos Salivette® puede verse afectado por este tipo de medicación concomitante, impidiendo a los pacientes suministrar un volumen suficiente de saliva para análisis. Puesto que la estimulación del fluido oral aumenta la tasa de flujo salival [236], estos problemas de volumen de muestra no ocurrían si se utilizaran técnicas basadas en la estimulación salival.

Una limitación de los métodos de estimulación, sin embargo, es que producen un aumento del pH salival, lo que puede resultar en una reducción en las concentraciones de determinados fármacos [236]. Un ejemplo de este fenómeno ocurre con cocaína, cuyas concentraciones en muestras de saliva estimulada no pudieron ser detectadas a partir de las 2 horas post-dosis [122]. En otro estudio, las concentraciones de codeína en

saliva no estimulada fueron mayores que las obtenidas en saliva estimulada con ácido cítrico [123]. La presente investigación muestra que esta situación también ocurre con metadona. Dado que ninguno de los estudios publicados sobre el cociente S/P de metadona utilizó un método de estimulación salival, los valores obtenidos en este trabajo podrían ser de utilidad para descartar esta técnica a la hora de determinar concentraciones salivales de bases débiles con pK por encima del pH plasmático. En cambio, los dispositivos Salivette® podrían ser útiles para la recogida de saliva en estudios de monitorización terapéutica de metadona. Sin embargo, sería necesario establecer el grado de adsorción del fármaco al dispositivo de recogida de muestras salivales, ya que dicha adsorción probablemente varíe en función del analito y del dispositivo utilizado [235].

De acuerdo con todo lo expuesto, cabría destacar finalmente la conveniencia de utilizar la matriz salival como posible alternativa a la plasmática para la monitorización terapéutica de metadona, tanto en pacientes en mantenimiento con metadona como en pacientes en terapia del dolor. No obstante, sería necesario tener en cuenta la influencia del pH salival de cada individuo sobre las concentraciones salivales de metadona, ya que la corrección por el valor de pH determinado inmediatamente tras el muestreo salival mejoraría la relación entre las concentraciones en plasma y saliva.

Parece evidente que, a pesar de lo mucho estudiado y publicado sobre metadona y en concreto sobre los resultados de su administración a la especie humana, es mucho lo que aún queda por conocer, de manera que con la aportación realizada en este trabajo, si bien algunas cuestiones han quedado averiguadas, otras han surgido incluso como aspectos novedosos ni siquiera planteados con anterioridad, cuyo estudio se espera que contribuya a un uso lo más racional de este medicamento, con seguridad para el paciente, de una manera efectiva y eficiente y todo en base a criterios prácticos, clínicos y científicos.

VI. CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES

1. Se han desarrollado y validado dos metodías analíticas mediante la técnica de cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa para el análisis cuantitativo de metadona en plasma y saliva humanos siguiendo el mismo proceso de extracción líquido-líquido. Las metodías fueron validadas convenientemente mediante los ensayos de selectividad, linealidad y rango de calibración, efecto de la dilución, precisión y exactitud, recuperación, y estabilidad del analito en la matriz biológica, en las soluciones stock y en los extractos en las condiciones de trabajo.
2. Se ha establecido la función del error de cada una de las metodías analíticas previamente validadas que posteriormente fueron utilizadas en el transcurso de la presente memoria experimental. La función óptima del error analítico establecida resultó ser lineal para metadona en saliva y no lineal para metadona en plasma.
3. Las metodías analíticas validadas han permitido la cuantificación de niveles de metadona en 52 muestras plasmáticas y 219 muestras salivales de un total de 18 pacientes que utilizan metadona (los incluidos en un programa de mantenimiento con metadona, $n=4$; y los incluidos en terapia del dolor, $n=14$), obteniéndose los correspondientes tabulados concentración-tiempo tanto en plasma como en saliva a lo largo de un intervalo de administración entero.
4. El análisis estadístico que comparó en el análisis farmacocinético los distintos métodos de ponderación heteroscedástica con el método homoscedástico no mostró diferencias significativas, indicando que la elección entre los distintos algoritmos de ponderación sería en este caso de escasa importancia y no influiría de manera apreciable en la estimación de los parámetros farmacocinéticos de metadona.

5. El estudio en pacientes en terapia de mantenimiento con metadona permitió el establecimiento de posibles modelos cinéticos de disposición, obteniéndose coeficientes de correlación estadísticamente significativos tras el ajuste de la disposición de metadona en plasma a un modelo bicompartimental extravasal ($r=0.90$, $p<0.001$, $n=38$), y de metadona en saliva a un único compartimento extravasal con constantes de incorporación y de desaparición de primer orden ($r=0.92$, $p<0.001$, $n=36$).

6. Los ajustes realizados permitieron la estimación de los parámetros farmacocinéticos correspondientes en cada uno de los pacientes. Los valores medios de $t_{1/2\beta}$, CL/F , $Vd\beta/F$, $t_{max(ss)}$ y $C_p\text{media}(ss)$ para metadona en plasma se correspondieron con los obtenidos en la bibliografía. También se observó que el $t_{max(ss)}$ se alcanzaba más tarde en la matriz salival que en la plasmática, lo que sugeriría (1) la presencia de un cierto tiempo de retraso entre un compartimento y otro debido a procesos de distribución/redistribución en el organismo, y (2) que la tasa de excreción salival estaría relacionada con la concentración de fármaco en plasma ($r=0.5159$, $p<0.001$, $n=38$).

7. Los cocientes S/P obtenidos durante el intervalo de dosificación para cada uno de los pacientes en terapia de mantenimiento con metadona mostraron que durante la fase de supuesta eliminación del fármaco, el cociente S/P medio era inferior al cociente medio de áreas bajo la curva de 0 a 24 horas, indicando la posible existencia de grandes porciones de tiempo donde metadona se estaría absorbiendo, originando altos cocientes S/P a los que estarían contribuyendo tres posibles factores: (1) el pH salival débilmente ácido; (2) la modificación sistémica en la expresión de los transportadores de eflujo; y (3) la recirculación gastrointestinal de metadona.

8. El estudio en pacientes en terapia del dolor permitió investigar la influencia de dichos factores sobre el cociente S/P, donde se observó (1) que el pH salival débilmente ácido favorecería el paso de metadona libre en plasma hacia la saliva a causa del efecto de atrapamiento iónico, y que pH salivales bajos estarían asociados a un aumento en la concentración de metadona en este fluido, influyendo sobre el cociente S/P final; (2) que el impacto que tendría el pH en el proceso de transferencia de metadona hacia la saliva sería tal, que la contribución de los transportadores de eflujo sería mínima; y (3) que la aparición de picos postprandiales de metadona en saliva respaldaría la hipótesis de una muy probable recirculación gastrointestinal de fármaco que estaría repercutiendo sobre dicho cociente.

9. Se demostró también que la técnica utilizada para la recogida de saliva influiría sobre el cociente S/P final, obteniéndose valores más 15 veces superiores al trabajar con saliva no estimulada que con saliva estimulada. Los análisis de correlación efectuados permitirían deducir la concentración plasmática a pre-dosis en pacientes tratados con metadona a partir de muestras salivales obtenidas con dispositivos Salivette® ($r=0.79$, $p<0.01$, $n=12$), así como corroborar que el metabolismo de metadona aumentaría en tratamientos crónicos.

10. La valoración de las diferentes técnicas de recogida de muestras salivales condujo a descartar las técnicas basadas en la estimulación de saliva a la hora de determinar concentraciones salivales de bases débiles con pK por encima del pH plasmático en estudios de monitorización terapéutica. El método de muestreo recomendado en estos casos serían los dispositivos Salivette®, estableciendo previamente el grado de adsorción del fármaco al dispositivo. Sin embargo, en aquellos pacientes incapaces de producir saliva, la monitorización debería seguir realizándose a partir de muestras plasmáticas.

Firmado,

Eric Miguez Díez

Barcelona, 3 de septiembre de 2014

VII. BIBLIOGRAFÍA

VII. BIBLIOGRAFÍA

1. Vendramin A, Sciacchitano AM. Pharmacology and neurochemistry of methadone. *Heroin Addict Relat Clin Probl* 2009;11(3):11-28.
2. Kreek MJ, Borg L, Ducat E, Ray B. Pharmacotherapy in the treatment of addiction: methadone. *J Addict Dis* 2010;29(2):200-216.
3. Eap CB, Buclin T, Baumann P. Interindividual variability of the clinical pharmacokinetics of methadone: implications for the treatment of opioid dependence. *Clin Pharmacokinet* 2002;41(14):1153-1193.
4. Gutstein HB, Akil H. Opioid analgesics. En: Brunton LL, Lazo JS and Parker KL, editors. *Goodman & Gilman's The pharmacological basis of therapeutics*. 12th Ed., New York: McGraw-Hill Professional, 2010. p. 547-590.
5. Kapur BM, Hutson JR, Chibber T, Luk A, Selby P. Methadone: a review of drug-drug and pathophysiological interactions. *Crit Rev Clin Lab Sci* 2011;48(4):171-195.
6. American Academy of Pediatrics Committee on Drugs. Transfer of drugs and other chemicals into human milk. *Pediatrics* 2001;108(3):776-789.
7. Garrido MJ, Aguirre C, Troconiz IF, Marot M, Valle M, Zamacona MK, et al. Alpha 1-acid glycoprotein (AAG) and serum protein binding of methadone in heroin addicts with abstinence syndrome. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2000;38(1):35-40.
8. Eap CB, Cuendet C, Baumann P. Binding of d-methadone, l-methadone, and dl-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.
9. Collier JK, Barratt DT, Dahlen K, Loennechen MH, Somogyi AA. ABCB1 genetic variability and methadone dosage requirements in opioid-dependent individuals. *Clin Pharmacol Ther* 2006;80(6):682-690.
10. Kharasch ED, Hoffer C, Whittington D. 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* 2004;57(5):600-610.
11. Nanovskaya T, Nekhayeva I, Karunaratne N, Audus K, Hankins GD, Ahmed MS. Role of P-glycoprotein in transplacental transfer of methadone. *Biochem Pharmacol* 2005;69(12):1869-1878.

12. Perez de los Cobos J, Sinol N, Trujols J, del Rio E, Banuls E, Luquero E, et al. Association of CYP2D6 ultrarapid metabolizer genotype with deficient patient satisfaction regarding methadone maintenance treatment. *Drug Alcohol Depend* 2007;89(2-3):190-194.
13. Nilsson MI, Anggard E, Holmstrand J, Gunne LM. Pharmacokinetics of methadone during maintenance treatment: adaptive changes during the induction phase. *Eur J Clin Pharmacol* 1982;22(4):343-349.
14. Rostami-Hodjegan A, Wolff K, Hay AW, Raistrick D, Calvert R, Tucker GT. Population pharmacokinetics of methadone in opiate users: characterization of time-dependent changes. *Br J Clin Pharmacol* 1999;48(1):43-52.
15. Wolff K, Rostami-Hodjegan A, Shires S, Hay AW, Feely M, Calvert R, et al. The pharmacokinetics of methadone in healthy subjects and opiate users. *Br J Clin Pharmacol* 1997;44(4):325-334.
16. Plummer JL, Gourlay GK, Cherry DA, Cousins MJ. Estimation of methadone clearance: application in the management of cancer pain. *Pain* 1988;33(3):313-322.
17. Wolff K, Rostami-Hodjegan A, Hay AW, Raistrick D, Tucker G. Population-based pharmacokinetic approach for methadone monitoring of opiate addicts: potential clinical utility. *Addiction* 2000;95(12):1771-1783.
18. Campbell SD, Crafford A, Williamson BL, Kharasch ED. Mechanism of autoinduction of methadone N-demethylation in human hepatocytes. *Anesth Analg* 2013;117(1):52-60.
19. Ficha Técnica de Metasedin. Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios (AEMPS). Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Madrid, 2010. Disponible en: http://www.aemps.gob.es/cima/pdfs/es/ft/62422/FT_62422.pdf. Último acceso: 03/09/14.
20. Kreek MJ. Medical safety and side effects of methadone in tolerant individuals. *J Psychoactive Drugs* 1991;23(2):232-237.
21. Russell L, Levine D. Methadone-induced Torsades de pointes. *R I Med J* 2013;96(8):20-21.
22. Bruce RD, Moody DE, Altice FL, Gourevitch MN, Friedland GH. A review of pharmacological interactions between HIV or hepatitis C virus medications and opioid agonist therapy: implications and management for clinical practice. *Expert Rev Clin Pharmacol* 2013;6(3):249-269.

23. Wojnar-Horton RE, Kristensen JH, Yapp P, Ilett KF, Dusci LJ, Hackett LP. Methadone distribution and excretion into breast milk of clients in a methadone maintenance programme. *Br J Clin Pharmacol* 1997;44(6):543-547.
24. Liu AJ, Nanan R. Methadone maintenance and breastfeeding in the neonatal period. *Pediatrics* 2008;121(4):869-70.
25. Abdel-Latif ME, Pinner J, Clews S, Cooke F, Lui K, Oei J. Effects of breast milk on the severity and outcome of neonatal abstinence syndrome among infants of drug-dependent mothers. *Pediatrics* 2006;117(6):e1163-e1169.
26. Meites E. Opiate exposure in breastfeeding newborns. *J Hum Lact* 2007;23(1):13.
27. Geraghty B, Graham EA, Logan B, Weiss EL. Methadone levels in breast milk. *J Hum Lact* 1997;13(3):227-230.
28. American Academy of Pediatrics, Committee on Drugs. The transfer of drugs and other chemicals into human breast milk. *Pediatrics* 1983;72:375-383.
29. Philipp BL, Merewood A, O'Brien S. Methadone and breastfeeding: new horizons. *Pediatrics* 2003;111(6 Pt 1):1429-1430.
30. Malpas TJ, Darlow BA. Neonatal abstinence syndrome following abrupt cessation of breastfeeding. *N Z Med J* 1999;112(1080):12-13.
31. Glatstein MM, Garcia-Bournissen F, Finkelstein Y, Koren G. Methadone exposure during lactation. *Can Fam Physician* 2008;54(12):1689-1690.
32. Demirci JR, Bogen DL, Klionsky Y. Breastfeeding and Methadone Therapy: The Maternal Experience. *Subst Abus* 2014;4:0.[Epub ahead of print]
33. Soler PA. Interacciones medicamentosas con la metadona. *JANO* 2003;65(1486):48-50.
34. Rabanal M. Terapia de sustitución con metadona: interacciones farmacológicas y no farmacológicas. *BIT del Departament de Salut de la Generalitat de Catalunya* 2013;24(6):31-37.
35. McCance-Katz EF, Sullivan LE, Nallani S. Drug interactions of clinical importance among the opioids, methadone and buprenorphine, and other frequently prescribed medications: a review. *Am J Addict* 2010;19(1):4-16.

36. Centro de Información online de medicamentos de la AEMPS. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/fichasTecnicas.do?metodo=detalleForm>. Último acceso: 03/09/14.
37. Colom J, Duro P. Tratamiento de mantenimiento con metadona: manual de práctica clínica. Departament de Salut, Generalitat de Catalunya, 2009. Disponible en: http://hemerotecadrogues.cat/docs/manual_metadona_cast.pdf. Último acceso: 03/09/14.
38. Hiemke C, Baumann P, Bergemann N, Conca A, Dietmaier O, Egberts K, et al. AGNP consensus guidelines for therapeutic drug monitoring in psychiatry: update 2011. *Pharmacopsychiatry* 2011;44(6):195-235.
39. Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Pharmaceutical Press, 2011.
40. Scimeca MM, Savage SR, Portenoy R, Lowinson J. Treatment of pain in methadone-maintained patients. *Mt Sinai J Med* 2000;67(5-6):412-422.
41. Haroutiunian S, McNicol ED, Lipman AG. Methadone for chronic non-cancer pain in adults. *Cochrane Database Syst Rev* 2012;11:CD008025.
42. Nicholson AB. Methadone for cancer pain. *Cochrane Database Syst Rev* 2007;4(4):CD003971.
43. Bell J. Pharmacological maintenance treatments of opiate addiction. *Br J Clin Pharmacol* 2014;77(2):253-263.
44. Farrell M, Wodak A, Gowing L. Maintenance drugs to treat opioid dependence. *BMJ* 2012;344:e2823.
45. Joseph H, Stancliff S, Langrod J. Methadone maintenance treatment (MMT): a review of historical and clinical issues. *Mt Sinai J Med* 2000;67(5-6):347-364.
46. Sanchez-Niubo A, Fortiana J, Barrio G, Suelves JM, Correa JF, Domingo-Salvany A. Problematic heroin use incidence trends in Spain. *Addiction* 2009;104(2):248-255.
47. Comas Arnau D. Los jóvenes y el uso de drogas en la España de los años 90 (tesis doctoral). Madrid; Universidad Complutense de Madrid, 1994. Disponible en: <http://biblioteca.ucm.es/tesis/19911996/S/1/S1010701.pdf>. Último acceso: 03/09/14.

48. Torres MA, Santodomingo J, Pascual F, Freixa F, Álvarez C. Historia de las adicciones en la España Contemporánea. Plan Nacional Sobre Drogas. Ministerio de Sanidad y Consumo, Gobierno de España, 2009. Disponible en: http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/publica/pdf/HistoriaAdicciones_EspContem.pdf. Último acceso: 03/09/14.
49. Comas Arnau D. Las drogas en la sociedad española. En: España, sociedad y política. Salvador Giner San Julián (coord.), Madrid, Espasa-Calpe, 1990. p. 633-656.
50. Escohotado A. Historia General de las drogas. Espasa-Calpe, 2005. p. 714-719.
51. Barrio G, de la Fuente L, Cami J. The consumption of drugs in Spain and its position in European context. *Med Clin (Barc)* 1993;101(9):344-355.
52. De La Fuente L, Bravo MJ, Barrio G, Parras F, Suarez M, Rodes A, et al. Lessons from the history of the human immunodeficiency virus/acquired immunodeficiency syndrome epidemic among Spanish drug injectors. *Clin Infect Dis* 2003;37(5):S410-S415.
53. Heroína. Informes de la Comisión Clínica de la Delegación del Gobierno para el Plan Nacional Sobre Drogas, 2009. Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/publica/pdf/InformeHeroina.pdf>. Último acceso: 03/09/14.
54. Orden de 20 de mayo de 1983 por la que se regulan los tratamientos con metadona. Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE 127 de 28 de mayo de 1983.
55. Orden de 31 de octubre de 1985 por la que se regulan los tratamientos de deshabituación con metadona dirigidos a toxicómanos dependientes de opiáceos. Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE 269 de 9 de noviembre de 1985.
56. Resolución de 22 de noviembre de 1985, de la Dirección General de Salud Pública, sobre dosificación y criterios de aplicación de los tratamientos de metadona a toxicómanos dependientes de opiáceos. Ministerio de Sanidad y Consumo. BOE 284 de 27 de noviembre de 1985.
57. Torrens M, Fonseca F, Castillo C, Domingo-Salvany A. Methadone maintenance treatment in Spain: the success of a harm reduction approach. *Bull World Health Organ* 2013;91(2):136-141.
58. Real Decreto 75/1990, de 19 de enero, por el que se regulan los tratamientos con opiáceos de personas dependientes de los mismos. BOE 20 de 23 de enero de 1990.

59. Real Decreto 1131/1990, de 14 de septiembre, por el que se modifica el artículo 3.3 del Real Decreto 75/1990, de 19 de enero, por el que se regulan los tratamientos con opiáceos de personas dependientes de los mismos. BOE 224 de 18 de septiembre de 1990.
60. Real Decreto 5/1996, de 15 de enero, sobre la modificación del Real Decreto 75/1990, de 19 de enero, por el que se regulan los tratamientos con opiáceos de personas dependientes de los mismos y de ampliación de su anexo. BOE 44 de 20 de febrero de 1996.
61. De La Fuente L, Brugal MT, Domingo-Salvany A, Bravo MJ, Neira-Leon M, Barrio G. More than thirty years of illicit drugs in Spain: a bitter story with some messages for the future. *Rev Esp Salud Publica* 2006;80(5):505-520.
62. Observatorio Español de la Droga y las Toxicomanías. Situación y tendencias de los problemas de drogas en España. Ministerio de Sanidad, Política Social e Igualdad. Gobierno de España. Informe 2011. Disponible en: <http://www.pnsd.msc.es/Categoria2/observa/pdf/oed2011.pdf>. Último acceso: 03/09/14.
63. De La Fuente L, Barrio G, Royuela L, Bravo MJ. The transition from injecting to smoking heroin in three Spanish cities. The Spanish Group for the Study of the Route of Heroin Administration. *Addiction* 1997;92(12):1749-1763.
64. De La Fuente L, Molist G, Espelt A, Barrio G, Guitart A, Bravo MJ, et al. Mortality risk factors and excess mortality in a cohort of cocaine users admitted to drug treatment in Spain. *J Subst Abuse Treat* 2014;46(2):219-226.
65. García C. El consumo de heroína en EE UU creció un 80% entre 2007 y 2012. *El País* 2014 Feb 4. Disponible en: http://sociedad.elpais.com/sociedad/2014/02/04/actualidad/1391547232_689272.html. Último acceso: 03/09/14.
66. Delgado E, Jimenez I. España se salva del repunte mundial de la heroína. *Faro De Vigo* 2014 Feb 8. Disponible en: <http://www.farodevigo.es/sociedad-cultura/2014/02/08/espana-salva-repunte-mundial-heroína/963543.html>. Último acceso: 03/09/14.
67. Rego F. 6.000 nuevos enganchados a la heroína. *El Mundo* 2014 Feb 8. Disponible en: <http://www.elmundo.es/cronica/2014/02/08/52f61e2fe2704e587a8b4572.html>. Último acceso: 03/09/14.
68. López Penide A. La nueva edad de oro de la heroína. *La Voz de Galicia* 2013 Feb 4. Disponible en: http://www.lavozdegalicia.es/SSEE/print.jsp?idContenido=0003_201302G4P8995&idSeccion=9D499C8D0A80B1980007D8BB1AB0D78E. Último acceso: 03/09/14.

69. Arora A, Williams K. Problem based review: The patient taking methadone. *Acute Med* 2013;12(1):51-54.
70. Barrio G, Bravo MJ, Brugal MT, Diez M, Regidor E, Belza MJ, et al. Harm reduction interventions for drug injectors or heroin users in Spain: expanding coverage as the storm abates. *Addiction* 2012;107(6):1111-1122.
71. World Health Organization/United Nations Office on Drugs and Crime, Joint United Nations Programme on HIV/AIDS. WHO, UNODC, UNAIDS Technical guide for countries to set targets for universal access to HIV prevention, treatment and care for injecting drug users. Geneva: WHO, UNODC, UNAIDS; 2009. Disponible en: http://www.unodc.org/documents/hiv-aids/idu_target_setting_guide.pdf. Último acceso: 03/09/14.
72. Farre M, Mas A, Torrens M, Moreno V, Cami J. Retention rate and illicit opioid use during methadone maintenance interventions: a meta-analysis. *Drug Alcohol Depend* 2002;65(3):283-290.
73. Torrens M, Castillo C, Perez-Sola V. Retention in a low-threshold methadone maintenance program. *Drug Alcohol Depend* 1996;41(1):55-59.
74. Bravo MJ, Llorens N, Barrio G, Brugal MT, Santos S, Sordo L, et al. Methadone maintenance treatment: a protective factor for cocaine injection in a street-recruited cohort of heroin users. *Drug Alcohol Depend* 2010;112(1-2):62-68.
75. Marsch LA. The efficacy of methadone maintenance interventions in reducing illicit opiate use, HIV risk behavior and criminality: a meta-analysis. *Addiction* 1998;93(4):515-532.
76. Brugal MT, Domingo-Salvany A, Puig R, Barrio G, Garcia de Olalla P, de la Fuente L. Evaluating the impact of methadone maintenance programmes on mortality due to overdose and aids in a cohort of heroin users in Spain. *Addiction* 2005;100(7):981-989.
77. Torrens M, Domingo-Salvany A, Alonso J, Castillo C, San L. Methadone and quality of life. *Lancet* 1999;353(9158):1101.
78. Sanchez GV, Llibre JM, Torrens M, Sanvisens A, Mateu G, Knobel H, et al. Effectiveness of antiretroviral therapy in HIV-1-infected active drug users attended in a drug abuse outpatient treatment facility providing a multidisciplinary care strategy. *Curr HIV Res* 2012;10(4):356-363.
79. Bart G. Maintenance medication for opiate addiction: the foundation of recovery. *J Addict Dis* 2012;31(3):207-225.

80. Ling W, Wesson DR, Charuvastra C, Klett CJ. A controlled trial comparing buprenorphine and methadone maintenance in opioid dependence. *Arch Gen Psychiatry* 1996;53(5):401-407.
81. Johnson RE, Chutuape MA, Strain EC, Walsh SL, Stitzer ML, Bigelow GE. A comparison of levomethadyl acetate, buprenorphine, and methadone for opioid dependence. *N Engl J Med* 2000;343(18):1290-1297.
82. Llorente Fernandez E, Pares L, Ajuria I, Bandres F, Castanyer B, Campos F, et al. State of the art in therapeutic drug monitoring. *Clin Chem Lab Med* 2010;48(4):437-446.
83. European Medicines Agency. Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP). Guideline on bioanalytical method validation 2011.
84. Food and Drug Administration. Guidance for Industry: Bioanalytical Method Validation 2001.
85. Asociación Española de Farmacéuticos de la Industria - AEFI. Validación de métodos analíticos. Monografías de AEFI. Barcelona, 2001.
86. Leavitt SB, Shinderman M, Maxwell S, Eap CB, Paris P. When "enough" is not enough: new perspectives on optimal methadone maintenance dose. *Mt Sinai J Med* 2000;67(5-6):404-411.
87. Ward J, Mattick RP, Hall W. How long is long enough? Answers to questions about the duration of methadone maintenance treatment. En: J Ward, R.P Mattick y W. Hall, ed, *Methadone maintenance treatment and other opioid replacement therapies*. Amsterdam: Harwood Academic Publishers 1998. p. 5-36.
88. Torrens M, Castillo C, San L, del Moral E, Gonzalez ML, 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.
89. Eap CB, Bourquin M, Martin J, Spagnoli J, Livoti S, Powell K, et al. Plasma concentrations of the enantiomers of methadone and therapeutic response in methadone maintenance treatment. *Drug Alcohol Depend* 2000;61(1):47-54.
90. Moolchan ET, Umbricht A, Epstein D. Therapeutic drug monitoring in methadone maintenance: choosing a matrix. *J Addict Dis* 2001;20(2):55-73.
91. Shen B, Li S, Zhang Y, Yuan X, Fan Y, Liu Z, Hu Q, Yu C. Determination of total, free and saliva mycophenolic acid with a LC-MS/MS method: application to pharmacokinetic study in healthy volunteers and renal transplant patients. *J Pharm Biomed Anal* 2009;50(3):515-21.

92. Patsalos PN, Berry DJ. Therapeutic drug monitoring of antiepileptic drugs by use of saliva. *Ther Drug Monit* 2013;35(1):4-29.
93. Fisher DS, van Schalkwyk GI, Seedat S, Curran SR, Flanagan RJ. Plasma, oral fluid, and whole-blood distribution of antipsychotics and metabolites in clinical samples. *Ther Drug Monit* 2013;35(3):345-351.
94. Mullangi R, Agrawal S, Srinivas NR. Measurement of xenobiotics in saliva: is saliva an attractive alternative matrix? Case studies and analytical perspectives. *Biomed Chromatogr* 2009;23(1):3-25.
95. Scheidweiler KB, Marrone GF, Shakleya DM, Singleton EG, Heishman SJ, Huestis MA. Oral fluid nicotine markers to assess smoking status and recency of use. *Ther Drug Monit* 2011;33(5):609-618.
96. Nagakura T, Tanaka T, Arita M, Nishikawa K, Shigeta M, Wada N, et al. Salivary cortisol monitoring: determination of reference values in healthy children and application in asthmatic children. *Allergy Asthma Proc* 2012;33(4):362-369.
97. Lee D, Karschner EL, Milman G, Barnes AJ, Goodwin RS, Huestis MA. Can oral fluid cannabinoid testing monitor medication compliance and/or cannabis smoking during oral THC and oromucosal Sativex administration? *Drug Alcohol Depend* 2013;130(1-3):68-76.
98. Shetty SJ, Desai PB, Patil NM, Nayak RB. Relationship between serum lithium, salivary lithium, and urinary lithium in patients on lithium therapy. *Biol Trace Elem Res* 2012;147(1-3):59-62.
99. Brown KC, Patterson KB, Malone SA, Shaheen NJ, Prince HM, Dumond JB, et al. Single and multiple dose pharmacokinetics of maraviroc in saliva, semen, and rectal tissue of healthy HIV-negative men. *J Infect Dis* 2011;203(10):1484-1490.
100. Barnes AJ, Scheidweiler KB, Kolbrich-Spargo EA, Gorelick DA, Goodwin RS, Huestis MA. MDMA and metabolite disposition in expectorated oral fluid after controlled oral MDMA administration. *Ther Drug Monit* 2011;33(5):602-608.
101. Gbotosho GO, Happi CT, Lawal O, Sijuade A, Sowunmi A, Oduola A. A high performance liquid chromatographic assay of mefloquine in saliva after a single oral dose in healthy adult Africans. *Malar J* 2012;11:59-64.
102. Khan SA, George R, Charles BG, Taylor PJ, Heussler HS, Cooper DM, et al. Monitoring salivary melatonin concentrations in children with sleep disorders using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Ther Drug Monit* 2013;35(3):388-395.

103. Shiran MR, Hassanzadeh-Khayyat M, Iqbal MZ, Lagundoye O, Seivewright N, Lennard MS, et al. Can saliva replace plasma for the monitoring of methadone? *Ther Drug Monit* 2005;27(5):580-586.
104. Marchei E, Farrè M, Pellegrini M, García-Algar O, Vall O, Pacifici R, Pichini S. Pharmacokinetics of methylphenidate in oral fluid and sweat of a pediatric subject. *Forensic Sci Int.* 2010;196(1-3):59-63.
105. George L, Muro EP, Ndaró A, Dolmans W, Burger DM, Kisanga ER. Nevirapine concentrations in saliva measured by thin layer chromatography and self-reported adherence in patients on antiretroviral therapy at Kilimanjaro Christian Medical Centre, Tanzania. *Ther Drug Monit* 2014;36(3):366-370.
106. Moy KV, Ma JD, Morello CM, Atayee RS, Best BM. Monitoring oxycodone use in patients with chronic pain: analysis of oxycodone and metabolite excretion in saliva and urine. *J Opioid Manag* 2014;10(1):47-56.
107. Teeninga N, Guan Z, Freijer J, Ruiters AF, Ackermans MT, Kist-van Holthe JE, et al. Monitoring prednisolone and prednisone in saliva: a population pharmacokinetic approach in healthy volunteers. *Ther Drug Monit* 2013;35(4):485-492.
108. Henkin RI. Comparative monitoring of oral theophylline treatment in blood serum, saliva, and nasal mucus. *Ther Drug Monit* 2012;34(2):217-221.
109. Michael C, Bierbach U, Frenzel K, Lange T, Basara N, Niederwieser D, et al. Determination of saliva trough levels for monitoring voriconazole therapy in immunocompromised children and adults. *Ther Drug Monit* 2010;32(2):194-199.
110. Ghimenti S, Lomonaco T, Onor M, Murgia L, Paolicchi A, Fuoco R, et al. Measurement of warfarin in the oral fluid of patients undergoing anticoagulant oral therapy. *PLoS One* 2011;6(12):e28182.
111. Yoshizawa JM, Schafer CA, Schafer JJ, Farrell JJ, Paster BJ, Wong DT. Salivary biomarkers: toward future clinical and diagnostic utilities. *Clin Microbiol Rev* 2013;26(4):781-791.
112. Spiehler V. Drugs in saliva, in Moffat AC, Osselton MD, Widdop B. Clarke's analysis of drugs and poisons in pharmaceuticals, body fluids and postmortem material. Pharmaceutical Press, 2011.
113. Campo J, Perea MA, del Romero J, Cano J, Hernando V, Bascones A. Oral transmission of HIV, reality or fiction? An update. *Oral Dis* 2006;12(3):219-228.
114. Kidwell DA, Holland JC, Athanasis S. Testing for drugs of abuse in saliva and sweat. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;713(1):111-135.

115. Cone EJ. Oral fluid results compared to self reports of recent cocaine and heroin use by methadone maintenance patients. *Forensic Sci Int* 2012;215(1-3):88-91.
116. Glándulas salivales. Disponible en: <http://www.icarito.cl/herramientas/imagen.html?img=http://static.icarito.cl/200912/620767.jpg&imgTitle=G1%E1ndulas%20salivales&imgDesc=>. Último acceso: 03/09/14.
117. Aps JK, Martens LC. Review: The physiology of saliva and transfer of drugs into saliva. *Forensic Sci Int* 2005;150(2-3):119-131.
118. Allen KR. Screening for drugs of abuse: which matrix, oral fluid or urine? *Ann Clin Biochem* 2011;48(6):531-541.
119. Dawes C, Jenkins GN. The effects of different stimuli on the composition of saliva in man. *J Physiol* 1964;170:86-100.
120. Schramm W, Smith RH, Craig PA, Kidwell DA. Drugs of abuse in saliva: a review. *J Anal Toxicol* 1992;16(1):1-9.
121. Haeckel R. Factors influencing the saliva/plasma ratio of drugs. *Ann N Y Acad Sci* 1993;694:128-142.
122. Kato K, Hillsgrove M, Weinhold L, Gorelick DA, Darwin WD, Cone EJ. Cocaine and metabolite excretion in saliva under stimulated and nonstimulated conditions. *J Anal Toxicol* 1993;17(6):338-341.
123. O'Neal CL, Crouch DJ, Rollins DE, Fatah AA. The effects of collection methods on oral fluid codeine concentrations. *J Anal Toxicol* 2000;24(7):536-542.
124. Mercer SL, Coop A. Opioid analgesics and P-glycoprotein efflux transporters: a potential systems-level contribution to analgesic tolerance. *Curr Top Med Chem* 2011;11(9):1157-1164.
125. Hennessy M, Spiers JP. A primer on the mechanics of P-glycoprotein the multidrug transporter. *Pharmacol Res* 2007;55(1):1-15.
126. Hassan HE, Myers AL, Coop A, Eddington ND. Differential involvement of P-glycoprotein (ABCB1) in permeability, tissue distribution, and antinociceptive activity of methadone, buprenorphine, and diprenorphine: in vitro and in vivo evaluation. *J Pharm Sci* 2009;98(12):4928-4940.
127. Hung CC, Chiou MH, Teng YN, Hsieh YW, Huang CL, Lane HY. Functional impact of ABCB1 variants on interactions between P-glycoprotein and methadone. *PLoS One* 2013;8(3):e59419.

128. Lin JH, Yamazaki M. Role of P-glycoprotein in pharmacokinetics: clinical implications. *Clin Pharmacokinet* 2003;42(1):59-98.
129. Bouer R, Barthe L, Philibert C, Tournaire C, Woodley J, Houin G. 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* 1999;13(4):494-500.
130. Stormer E, Perloff MD, von Moltke LL, Greenblatt DJ. Methadone inhibits rhodamine123 transport in Caco-2 cells. *Drug Metab Dispos* 2001;29(7):954-956.
131. Dagenais C, Graff CL, Pollack GM. Variable modulation of opioid brain uptake by P-glycoprotein in mice. *Biochem Pharmacol* 2004;67(2):269-276.
132. Wang JS, Ruan Y, Taylor RM, Donovan JL, Markowitz JS, DeVane CL. Brain penetration of methadone (R)- and (S)-enantiomers is greatly increased by P-glycoprotein deficiency in the blood-brain barrier of Abcb1a gene knockout mice. *Psychopharmacology (Berl)* 2004;173(1-2):132-138.
133. Rodriguez M, Ortega I, Soengas I, Suarez E, Lukas JC, Calvo R. Effect of P-glycoprotein inhibition on methadone analgesia and brain distribution in the rat. *J Pharm Pharmacol* 2004;56(3):367-374.
134. Uematsu T, Yamaoka M, Doto R, Tanaka H, Matsuura T, Furusawa K. Expression of ATP-binding cassette transporter in human salivary ducts. *Arch Oral Biol* 2003;48(1):87-90.
135. Fagiolino P, Vazquez M, Maldonado C, Ruiz ME, Volonte MG, Orozco-Suarez S, et al. Usefulness of salivary drug monitoring for detecting efflux transporter overexpression. *Curr Pharm Des* 2013;19(38):6701-6708.
136. Methadone Hydrochloride. *European Pharmacopoeia*. 8th Edition, 2014:2731-2.
137. Methadone Hydrochloride. *U.S. Pharmacopeia National Formulary*. USP36-NF31, 2013:4280.
138. Backmund M, Meyer K, Henkel C, Soyka M, Reimer J, Schutz CG. Co-consumption of benzodiazepines in heroin users, methadone-substituted and codeine-substituted patients. *J Addict Dis* 2005;24(4):17-29
139. Gruber VA, McCance-Katz EF. Methadone, buprenorphine, and street drug interactions with antiretroviral medications. *Curr HIV/AIDS Rep* 2010;7(3):152-160.

140. Documento de consenso de GeSIDA/Plan Nacional sobre el Sida respecto al tratamiento antirretroviral en adultos infectados por el virus de la inmunodeficiencia humana (Actualización enero 2014). Disponible en: <http://www.gesida-seimc.org/contenidos/guiasclinicas/2014/gesida-guiasclinicas-2014-tar.pdf>. Último acceso: 03/09/14.
141. Causon R. Validation of chromatographic methods in biomedical analysis. Viewpoint and discussion. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;689(1):175-180.
142. Garden JS, Mitchell DG, Mills WN. Nonconstant variance regression techniques for calibration-curve-based analysis. *Anal Chem* 1980;52(14):2310-2315.
143. Van Houwelingen JC. Use and abuse of variance models in regression. *Biometrics* 1988;44(4):1073-1081.
144. Mariño EL, Lastra CF, Domínguez-Gil A. Estimación paramétrica en sistemas: aplicación en farmacocinética y monitorización de medicamentos en la práctica clínica (I). *Pharmaklin* 1987;1:195-201.
145. Jelliffe RW. Explicit determination of laboratory assay error patterns-A useful aid in therapeutic drug monitoring. *Drug Monit Toxicol* 1989;DM(89-4):1-5.
146. Daniel WW. Bioestadística: Base para el análisis de las ciencias de la salud. 4a ed. México: Limusa Wiley, 2006, 536-44.
147. Wolff K, Hay A, Raistrick D. Methadone in saliva. *Clin Chem* 1991;37(7):1297-1298.
148. Wagner JG. Farmacocinética Clínica. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, 1983.
149. Gibaldi G, Perrier D. Farmacocinética. Editorial Reverté, S.A. Barcelona, 1982.
150. Rio J, Hodnett N, Bidanset JH. The determination of propoxyphene, norpropoxyphene, and methadone in postmortem blood and tissues by high-performance liquid chromatography. *J Anal Toxicol* 1987;11(5):222-224.
151. Beck O, Boreus LO, Lafolie P, Jacobsson G. Chiral analysis of methadone in plasma by high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1991;570(1):198-202.
152. Wolff K, Sanderson M, Hay AW, Raistrick D. Methadone concentrations in plasma and their relationship to drug dosage. *Clin Chem* 1991;37(2):205-209.

153. Pierce TL, Murray AG, Hope W. Determination of methadone and its metabolites by high performance liquid chromatography following solid-phase extraction in rat plasma. *J Chromatogr Sci* 1992;30(11):443-447.
154. Schmidt N, Brune K, Geisslinger G. Stereoselective determination of the enantiomers of methadone in plasma using high-performance liquid chromatography. *J Chromatogr* 1992;583(2):195-200.
155. Kristensen K, Angelo HR, Blemmer T. Enantioselective high-performance liquid chromatographic method for the determination of methadone in serum using an AGP and a CN column as chiral and analytical column, respectively. *J Chromatogr A* 1994;666(1-2):283-287.
156. Norris RL, Ravenscroft PJ, Pond SM. Sensitive high-performance liquid chromatographic assay with ultraviolet detection of methadone enantiomers in plasma. *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994;661(2):346-350.
157. De Vos JW, Geerlings PJ, van den Brink W, Ufkes JG, van Wilgenburg H. Pharmacokinetics of methadone and its primary metabolite in 20 opiate addicts. *Eur J Clin Pharmacol* 1995;48(5):361-366.
158. Eap CB, Finkbeiner T, Gastpar M, Scherbaum N, Powell K, Baumann P. Replacement of (R)-methadone by a double dose of (R,S)-methadone in addicts: interindividual variability of the (R)/(S) ratios and evidence of adaptive changes in methadone pharmacokinetics. *Eur J Clin Pharmacol* 1996;50(5):385-389.
159. Rudaz S, Veuthey JL. Stereoselective determination of methadone in serum by HPLC following solid-phase extraction on disk. *J Pharm Biomed Anal* 1996;14(8-10):1271-1279.
160. Pham-Huy C, Chikhi-Chorfi N, Galons H, Sadeg N, Laqueille X, Aymard N, et al. Enantioselective high-performance liquid chromatography determination of methadone enantiomers and its major metabolite in human biological fluids using a new derivatized cyclodextrin-bonded phase. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1997;700(1-2):155-163.
161. Dyer KR, Foster DJ, White JM, Somogyi AA, Menelaou A, 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.
162. Rudaz S, Orтели D, Gex-Fabry M, Deglon JJ, Balant L, Veuthey JL. Development of validated stereoselective methods for methadone determination in clinical samples. *Chirality* 1999;11(5-6):487-494.

163. Boulton DW, Devane CL. Development and application of a chiral high performance liquid chromatography assay for pharmacokinetic studies of methadone. *Chirality* 2000;12(9):681-687.
164. Foster DJ, Somogyi AA, Dyer KR, White JM, Bochner F. Steady-state pharmacokinetics of (R)- and (S)-methadone in methadone maintenance patients. *Br J Clin Pharmacol* 2000;50(5):427-440.
165. Souverain S, Eap C, Veuthey JL, Rudaz S. Automated LC-MS method for the fast stereoselective determination of methadone in plasma. *Clin Chem Lab Med* 2003 Dec;41(12):1615-1621. 167. Batista R, Badre-Sentenac S, Bardin C, Chast F. Plasma assay of methadone enantiomers with high performance liquid chromatography. *Ann Pharm Fr* 2004;62(3):193-200.
166. Souverain S, Rudaz S, Ortelli D, Varesio E, Veuthey JL. Use of large particles support for fast analysis of methadone and its primary metabolite in human plasma by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;784(1):117-123.
167. Batista R, Badre-Sentenac S, Bardin C, Chast F. Plasma assay of methadone enantiomers with high performance liquid chromatography. *Ann Pharm Fr* 2004;62(3):193-200.
168. Liang HR, Foltz RL, Meng M, Bennett P. Method development and validation for quantitative determination of methadone enantiomers in human plasma by liquid chromatography/tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;806(2):191-198.
169. Whittington D, Sheffels P, Kharasch ED. Stereoselective determination of methadone and the primary metabolite EDDP in human plasma by automated on-line extraction and liquid chromatography mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2004;809(2):313-321.
170. Etter ML, George S, Graybiel K, Eichhorst J, Lehotay DC. Determination of free and protein-bound methadone and its major metabolite EDDP: enantiomeric separation and quantitation by LC/MS/MS. *Clin Biochem* 2005;38(12):1095-1102.
171. KuKanich B, X Lascelles BD, Papich MG. Validation of a high-pressure liquid chromatography and fluorescence polarization immunoassay for the determination of methadone in canine plasma. *Ther Drug Monit* 2005;27(3):389-392.
172. Rodriguez-Rosas ME, Medrano JG, Epstein DH, Moolchan ET, Preston KL, Wainer IW. Determination of total and free concentrations of the enantiomers of methadone and its metabolite (2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenyl-pyrrolidine) in human plasma by enantioselective liquid chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr A* 2005;1073(1-2):237-248.

173. Rook EJ, Hillebrand MJ, Rosing H, van Ree JM, Beijnen JH. The quantitative analysis of heroin, methadone and their metabolites and the simultaneous detection of cocaine, acetylcodeine and their metabolites in human plasma by high-performance liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2005;824(1-2):213-221.
174. Fernandez P, Morales L, Vazquez C, Bermejo AM, Tabernero MJ. HPLC-DAD determination of opioids, cocaine and their metabolites in plasma. *Forensic Sci Int* 2006;161(1):31-35.
175. Musshoff F, Trafkowski J, Kuepper U, Madea B. 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* 2006;41(5):633-640.
176. Quintela O, Lopez P, Bermejo AM, Lopez-Rivadulla M. Determination of methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine and alprazolam in human plasma by liquid chromatography-electrospray ionization mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2006;834(1-2):188-194.
177. Mercolini L, Mandrioli R, Conti M, Leonardi C, Gerra G, Raggi MA. Simultaneous determination of methadone, buprenorphine and norbuprenorphine in biological fluids for therapeutic drug monitoring purposes. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;847(2):95-102.
178. Shakleya DM, Jansson LM, Huestis MA. Validation of a LC-APCI-MS/MS method for quantification of methadone, 2-ethylidene-1,5-dimethyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EDDP) and 2-ethyl-5-methyl-3,3-diphenylpyrrolidine (EMDP) in infant plasma following protein precipitation. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2007;856(1-2):267-272.
179. Moody DE, Lin SN, Chang Y, Lamm L, Greenwald MK, Ahmed MS. An enantiomer-selective liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for methadone and EDDP validated for use in human plasma, urine, and liver microsomes. *J Anal Toxicol* 2008;32(3):208-219.
180. Ansermot N, Rudaz S, Brawand-Amey M, Fleury-Souverain S, Veuthey JL, Eap CB. Validation and long-term evaluation of a modified on-line chiral analytical method for therapeutic drug monitoring of (R,S)-methadone in clinical samples. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2009;877(23):2301-2307.
181. Bouzas NF, Dresen S, Munz B, Weinmann W. Determination of basic drugs of abuse in human serum by online extraction and LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem* 2009;395(8):2499-2507.

182. Gergov M, Nokua P, Vuori E, Ojanpera I. Simultaneous screening and quantification of 25 opioid drugs in post-mortem blood and urine by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Forensic Sci Int* 2009;186(1-3):36-43.
183. Dowling G, Regan L. A new mixed mode solid phase extraction strategy for opioids, cocaine, amphetamines and adulterants in human blood with hybrid liquid chromatography tandem mass spectrometry detection. *J Pharm Biomed Anal* 2011;54(5):1136-1145.
184. Ranjbari E, Golbabanezhad-Azizi AA, Hadjmohammadi MR. Preconcentration of trace amounts of methadone in human urine, plasma, saliva and sweat samples using dispersive liquid-liquid microextraction followed by high performance liquid chromatography. *Talanta* 2012;94:116-122.
185. Ortelli D, Rudaz S, Chevalley AF, Mino A, Deglon JJ, Balant L, et al. Enantioselective analysis of methadone in saliva by liquid chromatography-mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2000;871(1-2):163-172.
186. Dams R, Murphy CM, Choo RE, Lambert WE, De Leenheer AP, Huestis MA. LC-atmospheric pressure chemical ionization-MS/MS analysis of multiple illicit drugs, methadone, and their metabolites in oral fluid following protein precipitation. *Anal Chem* 2003;75(4):798-804.
187. Rodriguez-Rosas ME, Preston KL, Epstein DH, Moolchan ET, Wainer IW. Quantitative determination of the enantiomers of methadone and its metabolite (EDDP) in human saliva by enantioselective liquid chromatography with mass spectrometric detection. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2003;796(2):355-370.
188. Joyce C, Smyth WF, Ramachandran VN, O'Kane E, Coulter DJ. The characterisation of selected drugs with amine-containing side chains using electrospray ionisation and ion trap mass spectrometry and their determination by HPLC-ESI-MS. *J Pharm Biomed Anal* 2004;36(3):465-476.
189. Allen KR, Azad R, Field HP, Blake DK. Replacement of immunoassay by LC tandem mass spectrometry for the routine measurement of drugs of abuse in oral fluid. *Ann Clin Biochem* 2005;42(4):277-284.
190. Wylie FM, Torrance H, Anderson RA, Oliver JS. Drugs in oral fluid Part I. Validation of an analytical procedure for licit and illicit drugs in oral fluid. *Forensic Sci Int* 2005;150(2-3):191-198.
191. Quintela O, Crouch DJ, Andrenyak DM. Recovery of drugs of abuse from the Immunalysis Quantisal oral fluid collection device. *J Anal Toxicol* 2006;30(8):614-616.

192. Oiestad EL, Johansen U, Christophersen AS. Drug screening of preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Clin Chem* 2007;53(2):300-309.
193. Concheiro M, de Castro A, Quintela O, Cruz A, Lopez-Rivadulla M. Determination of illicit and medicinal drugs and their metabolites in oral fluid and preserved oral fluid by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2008;391(6):2329-2338.
194. Fernandez P, Morales L, Vazquez C, Lago M, Bermejo AM. Comparison of two extraction procedures for determination of drugs of abuse in human saliva by high-performance liquid chromatography. *J Appl Toxicol* 2008;28(8):998-1003.
195. Badawi N, Simonsen KW, Steentoft A, Bernhoft IM, Linnet K. Simultaneous screening and quantification of 29 drugs of abuse in oral fluid by solid-phase extraction and ultraperformance LC-MS/MS. *Clin Chem* 2009;55(11):2004-2018.
196. Simoes SS, Ajenjo AC, Franco JM, Vieira DN, Dias MJ. Liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the qualitative and quantitative analysis of illicit drugs and medicines in preserved oral fluid. *Rapid Commun Mass Spectrom* 2009;23(10):1451-1460.
197. Concheiro M, Gray TR, Shakleya DM, Huestis MA. High-throughput simultaneous analysis of buprenorphine, methadone, cocaine, opiates, nicotine, and metabolites in oral fluid by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2010;398(2):915-924.
198. Gray TR, Dams R, Choo RE, Jones HE, Huestis MA. Methadone disposition in oral fluid during pharmacotherapy for opioid-dependence. *Forensic Sci Int* 2011;206(1-3):98-102.
199. Heltsley R, DePriest A, Black DL, Robert T, Marshall L, Meadors VM, et al. Oral fluid drug testing of chronic pain patients. I. Positive prevalence rates of licit and illicit drugs. *J Anal Toxicol* 2011;35(8):529-540.
200. Lund HM, Oiestad EL, Gjerde H, Christophersen AS. Drugs of abuse in oral fluid collected by two different sample kits--stability testing and validation using ultra performance tandem mass spectrometry analysis. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2011;879(30):3367-3377.
201. Strano-Rossi S, Anzillotti L, Castrignano E, Felli M, Serpelloni G, Mollica R, et al. UHPLC-ESI-MS/MS method for direct analysis of drugs of abuse in oral fluid for DUID assessment. *Anal Bioanal Chem* 2011;401(2):609-624.
202. Garrido MJ, Troconiz IF. Methadone: a review of its pharmacokinetic/pharmacodynamic properties. *J Pharmacol Toxicol Methods* 1999;42(2):61-66.

203. McCance-Katz EF. (R)-methadone versus racemic methadone: what is best for patient care? *Addiction* 2011;106(4):687-688.
204. Ansermot N, Albayrak O, Schlapfer J, Crettol S, Croquette-Krokar M, Bourquin M, et al. Substitution of (R,S)-methadone by (R)-methadone: Impact on QTc interval. *Arch Intern Med* 2010;170(6):529-536.
205. Rentsch KM. The importance of stereoselective determination of drugs in the clinical laboratory. *J Biochem Biophys Methods* 2002;54(1-3):1-9.
206. McDowall RD, Doyle E, Murkitt GS, Picot VS. Sample preparation for the HPLC analysis of drugs in biological fluids. *J Pharm Biomed Anal* 1989;7(9):1087-1096.
207. Souverain S, Rudaz S, Veuthey JL. Matrix effect in LC-ESI-MS and LC-APCI-MS with off-line and on-line extraction procedures. *J Chromatogr A* 2004;1058(1-2):61-66.
208. Kang GI, Abbott FS. Analysis of methadone and metabolites in biological fluids with gas chromatography--mass spectrometry. *J Chromatogr* 1982;231(2):311-319.
209. Chikhi-Chorfi N, Pham-Huy C, Galons H, Manuel N, Lowenstein W, Warnet JM, et al. Rapid determination of methadone and its major metabolite in biological fluids by gas-liquid chromatography with thermionic detection for maintenance treatment of opiate addicts. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 1998;718(2):278-284.
210. Lynn RK, Leger RM, Gordon WP, Olsen GD, Gerber N. New gas chromatographic assay for the quantification of methadone. Application in human and animal studies. *J Chromatogr* 1977;131:329-340.
211. Alvarez Diaz N, Esteve Zarazaga R. Dehabituación in drug-addicts and chronic pain. *Psicothema* 2009;21(2):199-205.
212. Bermejo AM, Lucas AC, Tabernero MJ. Saliva/plasma ratio of methadone and EDDP. *J Anal Toxicol* 2000;24(1):70-72.
213. Eap CB, Bertschy G, Baumann P, Finkbeiner T, Gastpar M, Scherbaum N. High interindividual variability of methadone enantiomer blood levels to dose ratios. *Arch Gen Psychiatry* 1998;55(1):89-90.
214. Lynn RK, Olsen GD, Leger RM, Gordon WP, Smith RG, Gerber N. The secretion of methadone and its major metabolite in the gastric juice of humans: comparison with blood and salivary concentrations. *Drug Metab Dispos* 1976;4(5):504-509.

215. Lopez ML, Bano MD, Guillen JL. Long-term stability of methadone in clinical plasma samples stored at -20 degrees C. *J Anal Toxicol* 2002;26(4):236-238.
216. Lauriault G, LeBelle MJ, Lodge BA, Savard C. Stability of methadone in four vehicles for oral administration. *Am J Hosp Pharm* 1991;48(6):1252-1256.
217. Tod M, Padoin C, Louchahi K, Moreau-Tod B, Petitjean O, Perret G. Application of optimal sampling theory to the determination of metacycline pharmacokinetic parameters: effect of model misspecification. *J Pharmacokinet Biopharm* 1994;22(2):129-146.
218. Aarons L. Effect of experimental design on assay calibration. *The Analyst* 1981;106:1249-54.
219. Aarons L, Toon S, Rowland M. Validation of assay methodology used in pharmacokinetic studies. *J Pharmacol Methods* 1987;17:337-46.
220. Mariño EL, Fernandez Lastra C, Gonzalez Lopez F, Dominguez-Gil A, Garcia Santalla JL, Vorca G, et al. Parametrization by non-linear regression and bayesian estimation of bentazepam in a multiple dosage regimen in humans. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1987;25(11):627-632.
221. Fernandez Lastra C, Gonzalez Lopez F, Dominguez-Gil A, Mariño EL. Discrimination of kinetic models in heteroscedastic parametric estimation of bentazepam following multiple dosing. *Int J Clin Pharmacol Ther Toxicol* 1988;26(7):335-338.
222. Jelliffe RW, Maire P, Sattler F, Gomis P, Tahani B. Adaptive control of drug dosage regimens: basic foundations, relevant issues, and clinical examples. *Int J Biomed Comput* 1994;36(1-2):1-23.
223. Zufia L, Aldaz A, Castellanos C, Giraldez J. Simple and rapid determination of carboplatin in plasma by high-performance liquid chromatography. Error pattern and application to clinical pharmacokinetic studies. *J Chromatogr B Biomed Sci Appl* 2001;764(1-2):457-464.
224. Mariño EL, Jansat JM, March MA, Lastra CF. Parametrization by nonlinear regression analysis of the active acid metabolite of ebastine using different weighting methods. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1996;34(12):546-549.
225. Jansat JM, Lastra CF, Mariño EL. Comparative study of different weighting methods in non-linear regression analysis: implications in the parametrization of carebastine after intravenous administration in healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Ther* 1998;36(6):340-344.

226. Dodge WF, Jelliffe RW, Zwischenberger JB, Bellanger RA, Hokanson JA, Snodgrass WR. Population pharmacokinetic models: effect of explicit versus assumed constant serum concentration assay error patterns upon parameter values of gentamicin in infants on and off extracorporeal membrane oxygenation. *Ther Drug Monit* 1994;16(6):552-559.
227. Idkaidek N, Arafat T. Saliva versus plasma pharmacokinetics: theory and application of a salivary excretion classification system. *Mol Pharm* 2012;9(8):2358-2363.
228. Lam G, Chiou WL. Determination of the steady-state volume of distribution using arterial and venous plasma data from constant infusion studies with procainamide. *J Pharm Pharmacol* 1982;34(2):132-134.
229. Gourlay SG, Benowitz NL. Arteriovenous differences in plasma concentration of nicotine and catecholamines and related cardiovascular effects after smoking, nicotine nasal spray, and intravenous nicotine. *Clin Pharmacol Ther* 1997;62(4):453-463.
230. Galeazzi RL, Benet LZ, Sheiner LB. Relationship between the pharmacokinetics and pharmacodynamics of procainamide. *Clin Pharmacol Ther* 1976;20(3):278-289.
231. Davies NM, Takemoto JK, Brocks DR, Yanez JA. Multiple peaking phenomena in pharmacokinetic disposition. *Clin Pharmacokinet* 2010;49(6):351-377.
232. Chu S, Schubert ML. Gastric secretion. *Curr Opin Gastroenterol* 2013;29(6):636-641.
233. Hsu YC, Chen BG, Yang SC, Wang YS, Huang SP, Huang MH, et al. Methadone concentrations in blood, plasma, and oral fluid determined by isotope-dilution gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Bioanal Chem* 2013;405(12):3921-3928.
234. López-Rivadulla M, Cruz-Landeira A, de Castro-Ríos A, Concheiro M, Quintela O. Informe de evaluación del dispositivo Draeger Drugtest 5000 para la detección de drogas de abuso en saliva. Dirección General de Tráfico, 2011. Disponible en: <http://www.dgt.es/Galerias/seguridad-vial/investigacion/estudios-e-informes/INFORME-EVALUACION-DEL-DISPOSITIVO-DRAEGER-DRUGTEST-17.pdf>. Último acceso: 03/09/14.
235. Drummer OH. Introduction and review of collection techniques and applications of drug testing of oral fluid. *Ther Drug Monit* 2008;30(2):203-206.
236. Choo RE, Huestis MA. Oral fluid as a diagnostic tool. *Clin Chem Lab Med* 2004;42(11):1273-1287.

237. Haeckel R. Interpretation of salivary drug concentrations. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989;27(4):223-226.
238. Fagiolino P, Vazquez M, Eiraldi R. Clearance and bioavailability study through arterio-venous drug concentrations relationship. *Eur J Pharm Sci* 2013;48(4-5):825-829.
239. El-Guebaly N, Davidson WJ, Sures HA, Griffin W. The monitoring of saliva drug levels: psychiatric applications. *Can J Psychiatry* 1981;26(1):43-48.
240. Shore PA, Brodie BB, Hogben CA. The gastric secretion of drugs: a pH partition hypothesis. *J Pharmacol Exp Ther* 1957;119(3):361-369.
241. Matheson PJ, Wilson MA, Garrison RN. Regulation of intestinal blood flow. *J Surg Res* 2000;93(1):182-196.
242. Ibarra M, Vazquez M, Fagiolino P. Population pharmacokinetic model to analyze nevirapine multiple-peaks profile after a single oral dose. *J Pharmacokinet Pharmacodyn* 2014;41(4):363-373.
243. Haeckel R, Muhlenfeld HM. Reasons for intraindividual inconstancy of the digoxin saliva to serum concentration ratio. *J Clin Chem Clin Biochem* 1989;27(9):653-658.
244. Siegel IA, Ben-Aryeh H, Gozal D, Colin AA, Szargel R, Laufer D. Comparison of unbound and total serum theophylline concentrations with those of stimulated and unstimulated saliva in asthmatic children. *Ther Drug Monit* 1990;12(5):460-464.
245. Hinderling PH. Red blood cells: a neglected compartment in pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Pharmacol Rev* 1997;49(3):279-295.
246. Jones CM, Isherwood G. Advice on methadone and oral health: dental public health in action. *Community Dent Health* 2013;30(2):68-70.

VIII. DIFUSIÓN

VIII. DIFUSIÓN DE LA TESIS DOCTORAL

Publicaciones

1) Miguez-Díez E, Modamio P, Lastra CF, Arrufat FX, Serra M, Reig S, Mariño EL. Development and validation of a rapid and reliable high-performance liquid chromatography method for methadone quantification in human plasma and saliva. *Clin Chem Lab Med* 2013;51(12):e309-312.

Factor de impacto (2013 JCR Science Edition): 2.955

Categoría: MEDICAL LABORATORY TECHNOLOGY

Cuartil: Q1

2) Miguez-Díez E, Modamio P, Vázquez M, Lastra CF, Montes MJ, Retamoso I, Papa P, Fagiolino P, Mariño EL. Correlation of methadone concentrations in plasma and saliva collected with and without stimulation in pain management patients. *Clin Chem Lab Med* 2014. Accepted, *In Press*.

Factor de impacto (2013 JCR Science Edition): 2.955

Categoría: MEDICAL LABORATORY TECHNOLOGY

Cuartil: Q1

Comunicaciones a congreso

Miguez-Díez E, Pitarch-Sierra A, Modamio P, Lastra CF, Arrufat FX, Serra M, Reig S, Mariño EL. HPLC-UV method development and validation for quantitative determination of methadone in human plasma. *Int J Clin Pharm* 2013;35:1007.

Formato: Póster

Congreso: 41st ESCP Symposium on Clinical Pharmacy; Personalised and safe therapy. Barcelona, 29-31 octubre 2012

Factor de impacto (2013 JCR Science Edition): 1.250

Categoría: PHARMACOLOGY & PHARMACY

Cuartil: Q3

