

00563



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

“INFLUENCIA DE LA DESNUTRICION  
CALORICO - PROTEICA SOBRE LAS  
CONCENTRACIONES SANGUINEAS DEL  
NIMESULIDE EN RATAS”

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRIA EN FARMACIA  
(BIOFARMACIA)**

PRESENTA:

**MIRIAM DEL CARMEN CARRASCO PORTUGAL**

ASESOR. DR. FRANCISCO JAVIER FLORES MURRIETA



MEXICO, D. F.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

2002



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.



OF.CPCQ.23/02

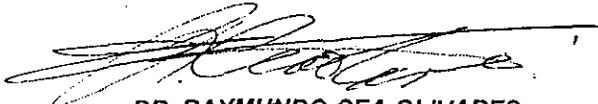
**BIÓL. FRANCISCO INCERA UGALDE**  
Jefe de la Unidad de Administración del Posgrado  
**Presente**

Me es grato informarle que la alumna **MIRIAM DEL CARMEN CARRASCO PORTUGAL**, con número de cuenta 97809539 y expediente 5971007, presentará su examen para optar por el grado de Maestro en Ciencias Químicas (Farmacia-Biofarmacia), quien defenderá el proyecto de investigación titulado: "Influencia de la desnutrición calórico-protéica sobre las concentraciones sanguíneas del nimesulide en ratas", ante el siguiente jurado:

Presidente	Dr. Gilberto Castañeda Hernández	CINVESTAV
Vocal	Dr. Andrés Navarrete Castro	Facultad de Química, UNAM
Secretario	Dra. Helgi Jung Cook	Facultad de Química, UNAM
Primer suplente	Dra. Patricia García López	Instituto de Cancerología
Segundo suplente	Dr. Vinicio Granados Soto	CINVESTAV

Sin otro particular de momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente.  
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"  
Cd. Universitaria, D.F. a 10 de enero de 2002.



**DR. RAYMUNDO CEA OLIVARES**  
Coordinador del Programa

c.c.p. Integrantes del Jurado  
Presidente del SAO  
Interesado  
Expediente  
Sección Escolar de la División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química.

## DEDICATORIAS

A mis padres Ramón Octavio Carrasco y Norma Alicia Portugal, por permitirme crecer en un ambiente muy agradable en donde siempre reinó el amor, el respeto y la felicidad.

A mis hermanos, Siria Aidé, Ramón Octavio y Norma Alicia, por todos esos momentos que hemos compartido juntos.

A mis sobrinos, Ana Karen, Mónica Xiomara y Kevin Jasiel, mis pequeños traviesos que nos alegran tanto.

A mi tía Sandra, por estar siempre tan unida a nosotros.

A mis abuelitas, Carmen Yáñez y Amparo Miranda, por ser siempre tan lindas.

A José Manuel, por ser mi sayo.

## AGRADECIMIENTOS

Primero le doy gracias a Dios por permitirme llegar a este momento.

Agradezco de manera muy especial al Dr. Francisco Javier Flores Murrieta por todos sus conocimientos compartidos y por su gran amistad.

Gracias a todos mis amigos del INP, muy especialmente al Dr. Ismael Lares Asseff por su confianza y colaboración en este trabajo de investigación y a Guadalupe Angélica Camacho por su apoyo y colaboración.

A mis maestros y amigos del CINVESTAV, Dr. Gilberto Castañeda, Dr. Vinicio Granados, Guadalupe Vidal, Héctor Vázquez y José Pérez.

A todos mis sinodales, por la atención de revisar este trabajo.

A mis maestros de la UNAM y a mis compañeros, Ruth Ma. Ruiz, Raúl Morales, Carlos Francisco, Elizabeth, Diana, Leticia, Ernesto y Vicente; a mis amigas del 38-104, Luz Ma. López y Geovana Vergara; a mis amigos Sinaloenses, Samuel, Jorge, Xochitl, Iliana, Josefina, Marco, Mony y al Profesor Romero.

## ÍNDICE

RESUMEN	1
INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO I. FUNDAMENTOS	4
I.1 Mecanismo de acción	5
I.2 Características farmacocinéticas	8
I.2.1 Absorción	9
I.2.2 Distribución	10
I.2.3 Eliminación	10
I.3 Indicaciones Terapéuticas	11
I.4 Reacciones secundarias	12
I.5 Toxicidad del nimesulide	12
I.6 Interacciones del nimesulide con otros fármacos	13
I.7 Efecto de la desnutrición en la farmacocinética de los compuestos	13
I.7.1 Definición de nutrición	14
I.7.2 Algunos tipos de desnutrición	14
I.7.3 Patogenia de la desnutrición	16
I.7.4 Desnutrición por aporte inadecuado de proteínas	20
I.7.4.1 Proteínas sanguíneas	20
I.7.5 Influencia de la dieta en el comportamiento de los medicamentos	21
I.7.6 Evidencias de fármacos que sufren alteraciones farmacocinéticas por la desnutrición	23
CAPÍTULO II. OBJETIVOS	26
II.1 Objetivo general	26
II.2 Objetivos particulares	26
CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN	27
CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS	28
CAPÍTULO V. DISEÑO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	29
V.1 Parámetros de validación	29
V.1.1 Selectividad	30
V.1.2 Intervalo de validación	30
V.1.3 Linealidad	31
V.1.4 Exactitud	31
V.1.5 Precisión	32
V.1.6 Recuperación	33
V.1.7 Límite de cuantificación	33
V.1.8 Límite de detección	33
V.1.9 Seguimiento durante el estudio	34
V.1.10 Selectividad	34
V.1.11 Intervalo de la curva de calibración y linealidad	34
V.1.12 Exactitud y precisión	34
V.1.13 Adecuación del sistema	35
V.2 Condiciones para determinar el nimesulide	35
V.3 Preparación de las soluciones	37
V.3.1 Preparación de la solución amortiguadora	37
V.3.2 Preparación del buffer de fosfatos	37
V.3.3 Preparación del HCl 1N	37

V.4 Procedimiento de extracción	38
V.5 Sistema cromatográfico	38
V.6 Validación del método	39
V.7 Resultados	39
V.8 Discusión	41
<b>CAPÍTULO VI. EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DEL NIMESULIDE EN RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS</b>	45
VI.1 Material y métodos	46
VI.1.1 Población	46
VI.1.2 Técnica de canulación de la arteria caudal de la rata	46
VI.2 Diseño experimental	47
VI.2.1 Condiciones de alimentación para los dos grupos de ratas	50
VI.2.2 Composición del alimento para desnutrir a las ratas	52
VI.3 Análisis farmacocinético	53
VI.4 Análisis estadístico	53
VI.5 Resultados	54
VI.5.1 Farmacocinética del nimesulide en ratas control	54
VI.6 Discusión	59
VI.6.1 Concentraciones sanguíneas del nimesulide en ratas normales a tres dosis diferentes	59
VI.6.2 Concentraciones sanguíneas del nimesulide en ratas desnutridas	60
<b>CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES</b>	63
<b>CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	64

## RESUMEN

La desnutrición está considerada como un problema de salud pública en México y es muy común encontrarse con este padecimiento en los servicios médicos de hospitales. Muchos medicamentos cuando se administran a pacientes con desnutrición presentan cambios en su comportamiento cinético sobre todo los que se metabolizan por hígado, principalmente por vía citocromo P450. Este factor debe ser considerado en la farmacoterapia para obtener mejores resultados en los tratamientos; por lo que el objetivo de este estudio fue evaluar las concentraciones sanguíneas del nimesulide en ratas con desnutrición de tercer grado, para establecer posibles diferencias entre éstas y su grupo control. Para alcanzar el objetivo se planteó lo siguiente: diseñar y validar una microtécnica para cuantificar el nimesulide en sangre, estudiar el curso temporal del nimesulide administrado vía oral a tres dosis diferentes (5, 10 y 20 mg/kg de peso) y finalmente establecer la comparación de las concentraciones sanguíneas entre el grupo de ratas control y desnutridas a las dosis de 10 mg/kg. El análisis de las muestras se realizó por cromatografía de líquidos de alta resolución y el análisis farmacocinético se hizo mediante una estrategia no compartimental. Se diseñó y validó una microtécnica para cuantificar el nimesulide en muestras de 100  $\mu$ L de sangre la cual cumple con los criterios de validación. Los resultados indican que el comportamiento cinético del nimesulide a las dosis evaluadas, es similar y solo presentó diferencias significativas para la dosis inferior de 5 mg/kg en la comparación de  $C_{max}/dosis$  vs dosis, con relación a las otras dos dosis de 10 y 20 mg/kg. Al comparar algunos parámetros farmacocinéticos del nimesulide entre el grupo control y el grupo con desnutrición severa a la dosis de 10 mg/kg, no se presentaron cambios significativos en ninguno de los parámetros evaluados ( $C_{max}$ ,  $t_{max}$  y ABC). De acuerdo a los resultados obtenidos el método desarrollado resultó ser eficaz, sencillo y reproducible cumpliendo con los lineamientos de validación. Así mismo, se observó que la dosis de 5 mg/kg alcanzó una mayor concentración, lo cual se puede deber a la baja solubilidad del nimesulide y que a una dosis menor exista una mejor disolución, por lo tanto una mejor absorción y posiblemente por ese motivo las concentraciones alcanzadas a esta dosis hayan sido mayores. No se observaron diferencias significativas en las concentraciones del nimesulide entre ratas control y desnutridas.

## INTRODUCCIÓN

Para la administración de los medicamentos es necesario no solamente conocer los mecanismos de absorción, distribución y eliminación. La administración de un fármaco puede dividirse en dos fases principalmente, la primera conocida como farmacocinética, en la cual se relacionan los niveles del fármaco en el organismo con el tiempo y la segunda fase denominada farmacodinamia en donde la concentración del fármaco en el sitio de acción está relacionada con la magnitud del efecto producido.

Por lo tanto, para que un fármaco llegue al sitio de acción y produzca el efecto farmacológico deseado, es necesario que primero se lleven al cabo los procesos farmacocinéticos de absorción (si se trata de una administración diferente a la intravascular), distribución y eliminación, efectuándose cada uno de estos procesos de manera simultánea; éstos son importantes en la evaluación de las concentraciones sanguíneas de los fármacos. Los parámetros farmacocinéticos utilizados para evaluar la cantidad de fármaco absorbido y la velocidad a la cual se absorbe dicho fármaco, son: Área bajo la curva (ABC) la cual expresa la cantidad de fármaco absorbido; la concentración máxima ( $C_{max}$ ) la cual indica la velocidad y la cantidad de fármaco absorbida y finalmente el tiempo en el que se alcanza la concentración máxima ( $t_{max}$ ) que está relacionado con la velocidad de absorción (Rowland y Tozer, 1989; Brandau y Wehner, 1979).

Otro aspecto que es de suma importancia en la eficacia de los tratamientos de los medicamentos es tener un esquema de dosificación adecuado para cada paciente, y poder lograr de esta manera que el paciente independientemente de los padecimientos que presenta, tenga concentraciones terapéuticas del medicamento, de manera que se produzca el efecto

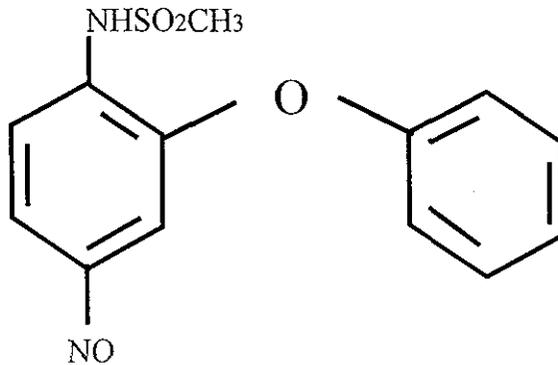
farmacológico deseado. En este caso hay que considerar situaciones especiales en las que se pudiera ver cambiada la farmacocinética, como pueden ser estados patológicos del paciente, edad, sexo y estados de desnutrición, entre otros.

En el caso de la desnutrición se ha observado que algunos de los fármacos que se metabolizan en hígado por vía citocromo P<sub>450</sub> (CYP) sufren ciertas modificaciones farmacocinéticas como son los casos de metronidazol, ácido acetil salicílico, gentamicina, cloranfenicol, entre otros. Por lo que es de suma importancia estudiar a cada uno de los fármacos o a los más importantes y poder establecer estas diferencias, si es que existen. En un estudio que se realizó con metronidazol en una población pediátrica desnutrida se recomendó realizar un ajuste de dosis con una reducción del 60% en la dosis para niños con problemas de desnutrición severa (Lares-Asseff, 1993), por lo que deben de considerarse estos factores en la farmacoterapia para que así se puedan obtener mejores resultados en los tratamientos farmacológicos.

## CAPÍTULO I. FUNDAMENTOS

El nimesulide (4-nitro-2-(fenoxi) metanosulfonamida) es un fármaco no esteroideal con una importante actividad analgésica, anti-inflamatoria y con un mejor efecto antipirético comparado con los demás fármacos de este grupo (Grant y Moore, 1975; Piel y cols, 1997; Swingle y cols, 1976).

El nimesulide es un agente anti-inflamatorio de carácter ácido (Biscarini y cols, 1988), con una estructura química (figura 1) que lo diferencia de la mayoría de los analgésicos anti-inflamatorios no esteroideales (AINEs) que generalmente tienen mayor número de grupos carboxilos y ésta es una de las características a la cual se le atribuye su mejor efectividad como antipirético (Yasuaki y cols, 1997).



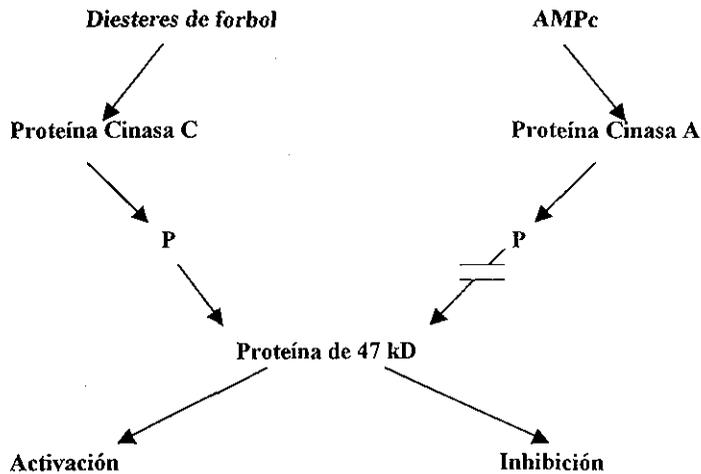
**FIGURA 1**  
Estructura química del nimesulide (Bernareggi, 1998).

## I.1 MECANISMO DE ACCIÓN

El nimesulide actúa inhibiendo la síntesis de prostaglandinas (Vigdahl y Tukey, 1979); recientemente el nimesulide ha sido uno de los AINEs más atractivos ya que es muy selectivo por la ciclo-oxigenasa-2 (COX-2). Esta inhibición puede explicar la disminución en la incidencia de los efectos secundarios y la disminución del daño gástrico ya que se ha comprobado que a dosis eficaces con que se inhibe el edema producido por carragenina no tiene efecto sobre la síntesis de prostaglandinas gástricas y tromboxano B<sub>2</sub>; (Aslanian y cols, 1994). El mecanismo de acción del nimesulide sobre el radical superóxido confiere a la molécula un perfil terapéutico diferente con respecto de aquellos fármacos anti-inflamatorios que funcionan únicamente como inhibidores de la biosíntesis de las prostaglandinas.

Este fármaco afecta el ensamble de la NADPH-oxidasa y sus cofactores en la membrana plasmática de los leucocitos, esto explica, al menos en parte, el mecanismo por el cual el nimesulide inhibe la producción de radicales oxígeno (Bevilacqua y cols, 1994). También se ha demostrado que el nimesulide no puede afectar la proteína cinasa C por sí mismo, pero si puede adicionarse a los leucocitos antes de la estimulación, y éstos a su vez inhiben la translocación de la proteína cinasa C a la membrana plasmática. En neutrófilos humanos, es necesaria la fosforilación de una proteína de 47 kD para la activación de la NADPH-oxidasa. Esta reacción puede ser catalizada por la proteína cinasa C con subsecuente activación de la NADPH-oxidasa, o por la proteína cinasa A dependiente de AMPc. En la mayoría de los casos, la fosforilación de

la proteína de 47 kD no está seguida por activación de la NADPH-oxidasa y es posible que la regulación de la NADPH-oxidasa esté dada por una competencia entre la proteína cinasa C y la proteína cinasa A, a la fosforilación de la proteína de 47 kD (Kramer, 1988); esto lo podemos ver esquematizado en la figura 2.



**FIGURA 2**

Ruta propuesta para entender la activación o inhibición de la NADPH-oxidasa por nimesulide (Kramer, 1988).

Además de ser muy efectivo como analgésico, anti-inflamatorio y antipirético, el nimesulide tiene otras propiedades farmacológicas tales como la inhibición de la fosfodiesterasa tipo IV (Bevilacqua y Vago, 1994), la reducción en la formación del anión superóxido, la prevención de la inactivación de la alfa1-proteasa (Ottoneo y cols, 1993), la inhibición de las

proteasas: elastasa y colagenasa (Pelletier y Martel, 1993) y la inhibición de la actividad y liberación de histamina (Berti y cols, 1990).

Los radicales superóxido se producen por neutrófilos y macrófagos, que en la oxidación del ácido araquidónico están presentes en gran cantidad durante la inflamación.

La alfa-1-antitripsina, regula la actividad proteolítica de la elastasa y es capaz de pasar de la circulación sanguínea a los tejidos inflamados y de inhibir esta enzima, debido a la afinidad que tienen los radicales superóxidos con la alfa-1-tripsina.

El descubrimiento de que la elastasa de los neutrófilos contribuye sustancialmente a la destrucción del tejido conectivo en varias condiciones patológicas, particularmente las enfermedades del aparato respiratorio, ha llevado a buscar inhibidores adecuados de esta enzima para uso terapéutico; tal es el caso del nimesulide quien logra reducir eficazmente la disponibilidad del radical superóxido en el microambiente de los neutrófilos, que tiene un efecto protector sobre la alfa-1-antitripsina contribuyendo a su acción anti-inflamatoria al limitar la actividad destructiva de la elastasa y evitando el daño tisular; marcando una diferencia con los AINEs que no actúan sobre los radicales superóxidos.

El nimesulide demostró *in vivo* una potencia anti-inflamatoria tres veces superior a la indometacina e *in vitro* inhibió la síntesis de prostaglandinas con una potencia mayor a la del ácido acetil salicílico (Yasuaki y cols, 1997; Rondel y cols, 1984).

En niños con infección del tracto respiratorio superior y fiebre, el nimesulide resultó ser más efectivo que el paracetamol en términos de eficacia anti-inflamatoria y antipirética, aunque ambos fármacos fueron bien tolerados (Ugazio y cols, 1993).

A diferencia del ácido acetil salicílico, del naproxén y de la indometacina, el nimesulide no induce alteraciones gástricas en la biosíntesis del  $\text{PGI}_2$  y  $\text{PGE}_2$ , que sean significativas para la citoprotección gástrica, por esta razón tiene buena tolerancia y baja incidencia de efectos secundarios gástricos (Bernareggi, 1993).

La acción anti-inflamatoria del nimesulide es producida al limitar la acción de los radicales superóxido que provocan daño tisular, el efecto antipirético se debe a que reduce la vasodilatación y la acción analgésica se debe a la inhibición de la síntesis de prostaglandinas, reduciéndose así el dolor (Bevilacqua y Magni, 1993).

## **I.2 CARACTERÍSTICAS FARMACOCINÉTICAS**

El nimesulide se absorbe con rapidez a nivel gastrointestinal y los parámetros farmacocinéticos encontrados en humanos al administrar la dosis oral de 100 mg 2 veces al día se muestran en la tabla 1 (Bernareggi, 1993 y 1998).

TABLA 1

## PARÁMETROS FARMACOCINÉTICOS DEL NIMESULIDE EN HUMANOS

Vida media de eliminación	1.8-4.73 h
Concentración máxima	2.86-6.5 mg/L
Tiempo de concentración máxima	1.22-2.75 h
Volumen de distribución	0.18-0.39 L/ kg
Depuración total	31.02-106.16 mL/ h/ kg

La unión del nimesulide a proteínas plasmáticas es de alrededor del 99% (Bree y cols, 1993). Este fármaco en humanos se metaboliza en forma extensa vía CYP, aunque se desconoce cual isoenzima.

### 1.2.1 ABSORCIÓN

En estudios realizados en humanos se ha visto que el nimesulide se absorbe rápidamente en tracto gastrointestinal (GI). Los estudios de biodisponibilidad (Bernareggi, 1993 y 1998) han indicado que la velocidad de absorción y la cantidad de nimesulide absorbido es muy similar entre las diferentes formulaciones (tabletas, suspensión, formulación granular), alcanzando valores muy similares en la  $C_{max}$ ,  $t_{max}$  y ABC. Después de la administración oral de 100 mg y mediante la toma de muestras durante un periodo de 12 horas, se encontraron los siguientes parámetros farmacocinéticos:  $C_{max}=2.86-6.50$  mg/L,  $t_{max}=1.22-2.75$  h y  $ABC=14.65-54.09$  mgh/L. Esta absorción rápida del nimesulide hace que los efectos

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

farmacológicos generalmente se presentan muy rápido, entre los 30 y 60 minutos, tiempos a los que normalmente se alcanza la  $C_{max}$ .

No se han realizado estudios del nimesulide en administración intravenosa, por lo tanto, no se ha determinado la biodisponibilidad absoluta (F) del nimesulide. Se asume que la absorción oral del nimesulide después de una administración oral es completa, tanto en humanos como en ratas; también se ha comprobado que la absorción del nimesulide no está influenciada por la presencia de alimentos (Bernareggi, 1998).

### **1.2.2 DISTRIBUCIÓN**

La fase de distribución del nimesulide no se puede identificar usualmente en la curva concentración plasmática-tiempo lo cual indica que el proceso de distribución del nimesulide es rápido (Bernareggi, 1998).

Generalmente, el análisis farmacocinético del nimesulide se ha realizado utilizando el método de modelo independiente y el grado de la distribución del fármaco se ha evaluado por la estimación del volumen de distribución ( $V_d/F$ ), el cual oscila entre 0.18 y 0.39 L/kg, indicando que el nimesulide está localizado principalmente en el fluido extracelular. El nimesulide tiene muy poca afinidad por los componentes de los tejidos y no se acumula en este compartimento, mientras que su gran afinidad por proteínas plasmáticas es alta, principalmente a albúmina, a la cual se une en un 99% aproximadamente (Bree y cols, 1993 y Vilageliu, 1983).

### **1.2.3 ELIMINACIÓN**

La depuración plasmática de nimesulide (Cl) varía del 31.02-106.16 mL/h/kg y se le atribuye exclusivamente a la depuración metabólica.

El nimesulide tiene una depuración baja, asumiéndose que el hígado es el único órgano metabolizador de este fármaco y que la absorción del fármaco al cruzar la pared intestinal es completa.

El nimesulide se caracteriza por una muy buena biodisponibilidad (Reiner y Magni, 1982), se distribuye muy bien en hígado, bilis, riñón y plasma y finalmente es biotransformado en metabolitos, siendo el principal metabolito el 4-hidroxinimesulide (Allemon y Lebacq, 1993), el cual se elimina principalmente por vía renal (Diamond, 1976) y en menor cantidad por bilis (Chang y cols, 1975). La eliminación del nimesulide no se ve influenciada por el género ni la edad (Bemareggi, 1993).

### **I.3 INDICACIONES TERAPÉUTICAS**

Es ampliamente utilizado en dismenorrea (Pulkkinen, 1987), inflamación y dolor dental (Forsell, 1978), traumatismo (luxaciones, esguinces, torceduras y fracturas), artritis reumatoide (Reiner y Magni, 1982), osteoartritis, bursitis, en intervenciones quirúrgicas como coadyuvante para el alivio de la inflamación (Comaro, 1983) y dolor producido por infecciones agudas de las vías respiratorias.

## I.4 REACCIONES SECUNDARIAS

A las dosis recomendadas es bien tolerado; ocasionalmente se presentan pirosis, náuseas y gastralgias leves y transitorias, se han observado casos raros de erupción cutánea de tipo alérgico.

## I.5 TOXICIDAD DEL NIMESULIDE

En un estudio realizado en 16 sujetos sanos se probaron 3 dosis diferentes de nimesulide (400, 600 y 800 mg) divididos en 2 tomas diarias y el placebo, se analizó la tolerancia y la toxicidad renal. Para verificar la tolerancia del nimesulide se realizaron exámenes clínicos a los sujetos y se les cuestionó de manera indirecta sobre reacciones adversas. Así como, también se llevó un control de ellos con pruebas bioquímicas y hematológicas durante el estudio y se analizaron las concentraciones plasmáticas y urinarias en los días 1, 3, 7 y 10, en donde se utilizaron marcadores selectivos de nefrotoxicidad (Glicoproteína Tamm-Horsfall, retinol unido a proteínas de la orina y  $\beta$ -N-acetil glucosaminidasa).

A la dosis alta de nimesulide (800 mg diarios) se le asoció con dolor abdominal e indigestión; mientras que las dosis de 400 y 600 mg diarios fueron bien toleradas. Las alteraciones no fueron clínicamente significativas en los estudios hematológicos y bioquímicos durante el experimento y los análisis diarios de orina fueron normales. Por lo tanto, las pruebas de toxicidad renal mostraron evidentemente que no existía nefrotoxicidad asociada con la administración de nimesulide en 14 de 16 sujetos que fueron estudiados; mientras que 2 sujetos

presentaron modestos incrementos en las concentraciones de glicoproteína Tamm-Horsfall o  $\beta$ -N-acetilglucosaminidasa durante el tratamiento de nimesulide de 800 mg diarios, pero los demás resultados fueron normales. De esta manera, se probó que el nimesulide a las dosis de 400 y 600 mg diarios fue bien tolerado en todos los sujetos sometidos a este estudio siendo estas dosis mayores a las recomendadas para uso clínico (Warrington y cols, 1993). Por otro lado, Fusetti y cols (1993) afirman que el nimesulide es bien tolerado ya que se observó una incidencia de efectos adversos iguales a las que presentaron los sujetos a los que se les administró solamente el placebo.

## **I.6 INTERACCIONES DEL NIMESULIDE CON OTROS FÁRMACOS**

Existen algunas evidencias de que el nimesulide puede disminuir la biodisponibilidad oral de la furosemida. El nimesulide es un fármaco que se une importantemente a proteínas plasmáticas y puede desplazar a furosemida y ácido salicílico de las uniones a proteínas pero no puede desplazar a warfarina de estas uniones. Además, se ha descrito que después de la administración de nimesulide a pacientes con terapia crónica de teofilina, los niveles de teofilina se disminuyeron sin producir cambios en la función respiratoria (Perucca, 1993).

## **I.7 EFECTO DE LA DESNUTRICIÓN EN LA FARMACOCINÉTICA DE LOS COMPUESTOS**

La desnutrición es un problema muy palpable en nuestros días sobre todo en los países en vías de desarrollo, como es el caso de nuestro país, México, en donde se considera un problema de salud pública. La desnutrición calórico-protéica grave (DCPG) altera los procesos

farmacocinéticos como consecuencia de los trastornos del aparato digestivo (Viteri y Schneider, 1974), función renal (Gordillo y cols, 1957), composición corporal (Paniagua y cols, 1980). También produce trastornos enzimáticos a nivel hepático, algunos de los cuales tienen que ver con la biotransformación de los fármacos (Gómez y cols, 1957).

### I.7.1 DEFINICIÓN DE NUTRICIÓN

Se puede definir la nutrición como la combinación de fenómenos por los que el organismo vivo recibe y utiliza los nutrimentos exógenos, para conservar sus funciones y para la formación y conservación de tejidos. Cuando el cuerpo no recibe o no utiliza los nutrimentos esenciales, aparece la *desnutrición* (Cooper y cols, 1970).

### I.7.2 ALGUNOS TIPOS DE DESNUTRICIÓN

Se conoce como **desnutrición calórico-protéica**, al conjunto de síntomas y signos clínicos y bioquímicos que se observan generalmente en niños como una consecuencia de ingesta alimenticia deficiente, acompañada en ocasiones por utilización de dietas de variados contenidos calóricos, pero bajo contenido protéico. Esta deficiencia nutricional se presenta cuando las células del organismo no cuentan con las cantidades de nutrientes esenciales para cumplir las funciones metabólicas normales. La nutrición es quizá el factor ubicuo que afecta el crecimiento, la salud física y mental y el desarrollo como tal.

La desnutrición calórico-protéica grave determina una disminución de la capacidad inmunológica (Kumate, 1976; Chandra y Schrimshaw, 1980), lo que hace que el sujeto sea más vulnerable a los procesos infecciosos. Por lo tanto, la presencia de enfermedades concomitantes obliga al uso terapéutico de medicamentos.

Se conoce como **desnutrición de tercer grado** cuando el individuo presenta un déficit de peso de acuerdo a su edad, igual o mayor al 40%, comparado con los estándares y como criterio principal deben estar presente los signos universales y circunstanciales de la desnutrición; además de considerar el déficit peso/talla. Los signos universales de la desnutrición son, el síndrome de desaceleración del crecimiento y desarrollo, la dilución, la disfunción y la atrofia. Los signos circunstanciales son el edema, las lesiones en piel, el pelo, los ojos, la lengua, la atrofia muscular y las alteraciones en hueso.

Cuando el sujeto recibe una alimentación inadecuada o insuficiente, puede sufrir *invalidez permanente, inanición y muerte. Las deficiencias nutricionales también pueden ser causa de retraso mental, ceguera y deformaciones físicas*, por lo cual es necesario comprender las causas subyacentes de estas anomalías y otras, dependientes de la alimentación inadecuada, para así poder conocer también la mejor forma de corregirlas (Cooper y cols, 1970).

El concepto de deficiencias nutricionales como causa de enfermedades específicas, evolucionó a partir de los primeros trabajos con el escorbuto y el beriberi, transcurriendo muchas décadas para que se reconociera que otras enfermedades relacionadas con la desnutrición fuesen resultado de deficiencias específicas. Solo después de estudiar cabalmente los trastornos anatomopatológicos resultantes de la carencia experimental y controlada de nutrientes específicos en animales o en el hombre, fue posible comprender la función de cada nutriente en

el metabolismo. La deficiencia de un nutrimento puede aumentar la necesidad o ración necesaria de otro, o alterar su metabolismo, y en esta forma presentar síntomas de identificación difícil (Cooper y cols, 1970).

También se ha demostrado que existen muchas personas que no alcanzan el estado nutricional promedio estimado según los índices dietéticos, bioquímicos y clínicos, y no lo saben (Cooper y cols, 1970; Lares-Asseff, 1995).

### **1.7.3 PATOGENIA DE LA DESNUTRICIÓN**

En la desnutrición por diversas circunstancias se pueden destruir las relaciones armónicas de proporción entre los componentes de la dieta, a veces ésta es completa y equilibrada en sus componentes pero insuficiente en su aporte energético; si en este caso el impulso constitucional de crecimiento no es frenado el paciente continuará creciendo a expensas de sus propias proteínas, especialmente de las musculares, o puede ser que se utilicen las proteínas de la dieta como vehículo de energía y no como elemento plástico y el resultado será un déficit secundario de proteínas que impedirá el crecimiento del individuo.

Todo esto confirma que las funciones de la nutrición son armónicas y solidarias (Lares-Asseff, 1995) y explica la enorme variedad de cuadros clínicos que se pueden presentar por este padecimiento de acuerdo al equilibrio que se puede establecer entre los requerimientos y el aporte de nutrientes; además de que también se presentan una serie de cambios metabólicos colaterales que pueden entrar en juego.

La expresión clínica de carencia de nutrientes no es específica pero está condicionada a las prioridades de requerimiento y por lo tanto varía de acuerdo a la edad, al tejido considerado y al estado previo de nutrición (Lares-Asseff, 1995).

De acuerdo a la urgencia bioquímica, metabólica o funcional, algunos tejidos se ven preservados por más tiempo por efecto de la desnutrición; lo que sería la expresión de mecanismos homeostáticos de intensidad y de duración variable. La mayoría de los tejidos del organismo del desnutrido crónico tienden a la atrofia, pero esto no ocurre en tejido nervioso, en las glándulas suprarrenales ni en el esqueleto. La piel y sus estructuras accesorias son las primeras en sentir el balance negativo, así como también, los músculos aumentan su contenido acuoso y disminuyen en tonicidad; a excepción del músculo cardíaco. Los tejidos hematopoyéticos tampoco se ven afectados de manera rápida por la desnutrición.

En los procesos patogénicos de la desnutrición se pueden distinguir las siguientes etapas:

1. **Balance negativo.** Corresponde básicamente a un periodo agudo que origina homeostasis inmediata. Se traduce por un desequilibrio que puede verse como “desarmonía” en relación con los patrones considerados como normales y se ve reflejado en pérdida de peso, fenómenos de dilución, atrofia de las masas musculares, etc.
2. **Detención de crecimiento y desarrollo.** Se aprecia clínicamente en la etapa subaguda del proceso, es la expresión de una homeostasis mediata y puede interpretarse como una tendencia a mantener la armonía bioquímica, funcional y anatómica previamente alcanzada. Dentro de este grupo se catalogan los siguientes

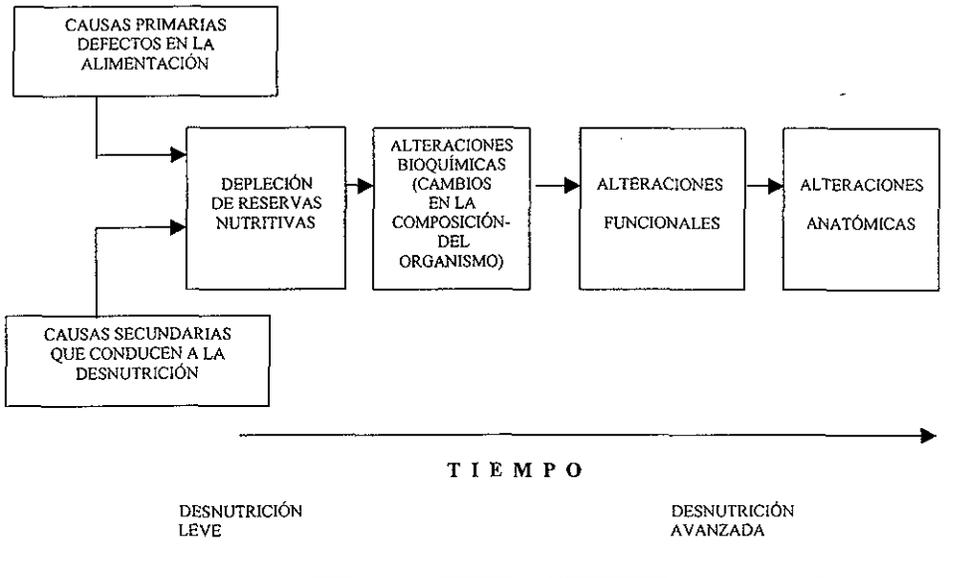
fenómenos: detención del crecimiento en talla, el desarrollo óseo y la conducta neuromotora y retraso en la iniciación de los fenómenos puberales (Ramos Galván y cols, 1960, 1964 y 1967).

3. **Adaptación.** Significa cronicidad y por lo tanto podría hablarse de homeostasis tardía (Lares-Asseff, 1995) y los fenómenos que participan en esta situación son: piel atrófica, caída del cabello, facies de Cushing, metabolismo bajo, temperatura corporal disminuida, anemia normocítica y normocrómica, gamaglobulina elevada y tal vez, algunos aspectos neuróticos de la conducta.
  
4. **Homeorresis.** Esta se da cuando los factores etiológicos continúan actuando en forma intensa, de modo que en la homeostasis tardía no se establece un nuevo y final equilibrio. El peso queda en concordancia con la talla, a partir de ese momento el crecimiento físico será de acuerdo al nivel somático alcanzado. Gradualmente se reúnen datos para caracterizar bioquímica y enzimáticamente al sujeto en situación de homeorresis (Lares-Asseff, 1995), pero la experiencia clínica parece demostrar que en los grupos de desnutridos existen tres momentos de la vida en los que el fenómeno se presenta con mayor frecuencia; al nacimiento, al final de la edad preescolar y al iniciarse la pubertad.

En la desnutrición crónica existe una alteración del patrón protéico del organismo y ese patrón de distribución no es estático, sino que varía de acuerdo a la intensidad y a la duración de la deficiencia protéica y de la ingesta energética.

Todos estos fenómenos conducen a cambios en la composición química, modificaciones funcionales y alteraciones morfológicas, que se encuentran resumidas en la figura 3.

**FIGURA 3**  
**PATOGENIA DE LA DESNUTRICIÓN** (Lares-Asseff, 1995).



## 1.7.4 DESNUTRICIÓN POR APORTE INADECUADO DE PROTEÍNAS Y ALIMENTOS CALORÍGENOS.

La desnutrición por aporte inadecuado de proteínas es la forma más grave y extendida de enfermedad carencial en el mundo, y ataca con más frecuencia a niños en los años de crecimiento rápido. Los términos empleados para describir la desnutrición por insuficiencia de alimentos proteínicos y calóricos, son *kwashiorkor*, o síndrome policarencial infantil y *marasmo*; el primero proviene de una dieta insuficiente de proteínas, pero en términos generales suficiente en calorías, en tanto que el *marasmo* es causado por una dieta insuficiente en proteínas y calorías (Cooper y cols, 1970). Se ha manejado que aproximadamente 350 millones de niños menores de 6 años de edad en el mundo, que representan el 70% de la población mundial, son atacados durante este periodo de vida por estos trastornos.

### 1.7.4.1 PROTEÍNAS SANGUÍNEAS

La concentración de una proteína en el plasma depende del balance entre la síntesis, distribución en el organismo y la pérdida, ya sea por catabolismo o por eliminación (Cravioto, 1958). La albúmina se encuentra en partes iguales dentro y fuera del espacio vascular y para que su concentración en el plasma se mantenga constante, debe serlo también en el espacio extravascular. De las alteraciones bioquímicas que se observan en la desnutrición, la hipoalbuminemia es la más característica, en este caso se debe a la síntesis deficiente que se origina por un aporte insuficiente, incompleto y desequilibrado de aminoácidos a través de una dieta que con frecuencia es casi exclusivamente vegetal (Lares-Asseff, 1995). La síntesis deficiente produce un desdoblamiento de las proteínas tisulares, lo cual se traduce en una

alteración en los niveles plasmáticos. Se ha encontrado que la albúmina total en el organismo se reduce hasta en un 50% en los enfermos con kwashiorkor, siendo la reducción proporcionalmente mayor en el espacio extravascular; esto parece tener relación con la intensidad y duración del balance negativo de nitrógeno y relacionarse además con la dilución presente en la desnutrición.

En la desnutrición de tercer grado, las diferencias básicas en el patrón de seroproteínas estriban en los niveles de albúmina y alfa globulina, por lo que la existencia o ausencia del edema está relacionado a ellas más que a otras fracciones de las proteínas (Ramos-Galván, 1967).

### **I.7.5 INFLUENCIA DE LA DIETA EN EL COMPORTAMIENTO DE LOS MEDICAMENTOS**

Son muchos los factores que contribuyen a la variabilidad del metabolismo de los fármacos, siendo uno de los principales el estado nutricional del individuo, el cual produce alteraciones en diferentes niveles de la actividad enzimática afectándose así también, el metabolismo de algunos fármacos y esto a su vez influye la intensidad y duración de la acción de los medicamentos, por lo que deben de considerarse estos factores en la farmacoterapia (Walter-Sack y Klotz, 1996).

Se han realizado muchos estudios con relación a la influencia de la dieta o composición de los alimentos sobre la transformación de los fármacos (Thomas, 1995 y Walter-Sack y Klotz, 1996), así como también se han realizado algunos trabajos en donde se observa que existen diferencias entre organismos considerados normales y los que presentan algún grado de desnutrición (Castilla-Serna y cols, 1988). Schimke en 1962 demostró que las enzimas del ciclo

de la urea se ven incrementadas por una dieta rica en proteínas. Mc Fartane y Von Holt mostraron en 1969, que las enzimas degradativas para la leucina disminuyeron en ratas alimentadas con una dieta baja en proteínas. Luean et al (1973) iniciaron una investigación sobre el metabolismo de fármacos en ratas jóvenes alimentadas crónicamente con dietas bajas en proteínas, que simulaban el valor de las proteínas de las dietas empleadas por niños en áreas en donde la desnutrición calórico–protéica es prevalente. Los resultados demostraron que los hígados de ratas crónicamente desnutridas tienen una capacidad disminuida de los microsomas oxidativos que metabolizan los fármacos.

La desnutrición es un proceso usualmente complejo en el cual ocurren muchas deficiencias de manera simultánea, los cambios ocurren en casi cada órgano del cuerpo (Whitehead y Alleyne, 1972). Además de los cambios fisiopatológicos que ocurren con la desnutrición calórico–protéica, las deficiencias de vitaminas (Campbell y Hayes, 1974), minerales y elementos traza se acompañan de diversos cambios metabólicos en los tejidos, por lo que hay un gran potencial para la alteración de la respuesta farmacológica en la desnutrición, que no se produce solamente por cambios de la cinética de los fármacos, sino que también es producida por cambios en la entrada y la localización de los fármacos en los tejidos, así como por la alteración potencial en las interacciones fármaco–receptor (Crouthamel, 1973).

### 1.7.6 EVIDENCIAS DE FÁRMACOS QUE SUFREN ALTERACIÓN FARMACOCINÉTICA POR LA DESNUTRICIÓN

Se han estudiado varios modelos farmacocinéticos de medicamentos que se metabolizan por diferentes vías y se han observado cambios en algunas enzimas que metabolizan algunos fármacos sobre todo los que se metabolizan vía CYP y sus isoenzimas (Walter-Sack y Klotz, 1996).

En algunas ocasiones las interacciones fármaco-nutrientes o la deficiencia de nutrientes pueden dirigir al fracaso terapéutico representando problemas clínicos que se manifiestan con reacciones adversas o toxicidad. Estos problemas son muy importantes en la práctica clínica y pueden interferir con los procesos farmacocinéticos y con la respuesta farmacológica de los medicamentos (Thomas, 1995). En ocasiones, las interacciones fármaco-nutrientes pueden ser causa de una alteración en los procesos farmacocinéticos y esto tiene como consecuencia el fracaso terapéutico. Ciertas deficiencias nutricionales pueden interferir en los procesos farmacocinéticos ya que el estado de nutrición juega un papel importante en la respuesta farmacológica de los medicamentos (Thomas, 1995). Algunos factores que afectan la biodisponibilidad también pueden verse alterados por la alimentación y a su vez afectar la farmacocinética. Las interacciones fármaco-nutriente son especialmente importantes en la diabetes mellitus (diuréticos de la tiazida, corticoides, *AINEs*, etc.), enfermedades cardiovasculares (diuréticos, digitálicos, etc.) y en ciertos desórdenes genéticos como en la intolerancia a la lactosa (Montgomery, 1991; Kitler, 1994).

En muchos casos la variabilidad intra e inter individual en la acción de los fármacos está determinada por la función hepática, la cual es dependiente del flujo sanguíneo hepático y de la capacidad metabólica y ambos parámetros se pueden ver modificados por diferentes factores, tales como enfermedades hepáticas, interacción de los fármacos, edad, dieta y estado nutricional, entre otros (Walter-Sack y Klotz, 1996).

El metabolismo de los fármacos se lleva a cabo por reacciones de fase I y de fase II. Estas reacciones están catalizadas por diferentes enzimas. Muchos nutrientes y micronutrientes pueden afectar las reacciones de fase I (oxidación); la baja de proteínas en la dieta reduce las enzimas NADPH dependientes y disminuye la velocidad de biotransformación de sustancias que se metabolizan por fase I. En niños con desnutrición calórico-proteica la excreción de sulfadiacina, antipirina y cloranfenicol está disminuida. Las reacciones de fase II envuelven una conjugación dependiente sobre el organismo que provee los carbohidratos, aminoácidos, grasas y proteínas, por lo que la falta de estos en la alimentación pueden producir cambios en el metabolismo de los fármacos (Thomas, 1995).

Se ha comprobado que en la administración de gentamicina y cloranfenicol en sujetos sanos y en sujetos con problemas de desnutrición grave se presentan cambios significativos en algunos parámetros farmacocinéticos. En el caso de gentamicina se han visto cambios en el tiempo de vida media ( $t_{1/2}$ ), depuración (Cl) y volumen de distribución (Vd) (Lares-Asseff, 1995); mientras que en el caso del cloranfenicol se presentan cambios significativos en la velocidad de eliminación ( $K_c$ ),  $t_{1/2}$ , y Cl. Estos estudios fueron realizados en una población pediátrica control comparada con una población con problemas de desnutrición grave (Lares-Asseff, 1995). También existen estudios farmacocinéticos para metronidazol realizados en una

población pediátrica control (recuperados de la desnutrición) y una población pediátrica con desnutrición severa en donde se observaron diferencias significativas en el tiempo de vida media el cual fue menor en los niños recuperados de la desnutrición ( $t_{1/2}=5.09$  h) con respecto a los desnutridos ( $t_{1/2}=10.21$  h) y también se presentaron diferencias significativas en la depuración de este fármaco con valores de 0.166 y 0.077 L/h/kg para niños recuperados de la desnutrición y niños con desnutrición severa, respectivamente (Lares-Asseff, 1992). Con base en esto se ha recomendado el ajuste de dosis con una reducción del 60% del metronidazol en niños con problemas de desnutrición severa (Lares-Asseff, 1993) correspondiente a 12 mg/kg/día, remarcando con esto la necesidad de dosificar de manera individual a los sujetos bajo condiciones particulares como en este caso es la *desnutrición*.

En otro estudio se observó que el estado nutricional asociado con enfermedades autoinmunes (asma) altera la farmacocinética del ácido acetil salicílico (ASA) y sus metabolitos ya que se presentaron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de ASA; así como, en el ABC y depuración siendo menores estos parámetros en niños desnutridos (Lares-Asseff y cols, 1999).

## **CAPÍTULO II. OBJETIVOS**

### **II.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar la biodisponibilidad del nimesulide en ratas con desnutrición de tercer grado, para establecer si existen diferencias significativas entre éstas y el grupo control.

### **II.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- 1) Diseñar y validar una microtécnica para cuantificar el nimesulide en sangre de rata.
- 2) Estudiar el curso temporal de las concentraciones sanguíneas del nimesulide a tres dosis diferentes (5, 10 y 20 mg/kg).
- 3) Comparar los niveles sanguíneos del nimesulide en ratas control y en ratas con desnutrición de tercer grado.

## CAPÍTULO III. JUSTIFICACIÓN

Se ha encontrado que algunos fármacos que se administran de manera indistinta en sujetos considerados normales y en sujetos con problemas de desnutrición tienen un comportamiento farmacocinético diferente ya que la composición y la funcionalidad del organismo pueden ser distintas en ambos casos, por lo cual es necesario la realización de estudios para evaluar si existen esas diferencias.

Existen pocos estudios del comportamiento farmacocinético de los medicamentos cuando se administran a poblaciones desnutridas, por lo que es importante realizar estos estudios sobre todo, cuando se trata de fármacos que se metabolizan vía CYP, complejo enzimático que sufre algunos cambios en condiciones de desnutrición.

## CAPÍTULO IV. HIPÓTESIS

Debido a las características de los organismos cuando presentan desnutrición de tercer grado, existirán diferencias importantes en las concentraciones sanguíneas de nimesulide en el grupo de ratas control y el grupo de ratas desnutridas.

## **CAPÍTULO V. DISEÑO Y VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO**

### **V.1 PARÁMETROS DE VALIDACIÓN.**

Para la realización de estudios farmacocinéticos es necesario contar con métodos lo suficientemente sensibles, de tal forma que nos permitan cuantificar adecuadamente las concentraciones del fármaco en el fluido biológico. Actualmente existen diversas técnicas para realizar estas cuantificaciones como son la cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR), la cromatografía de gases, el radioinmunoanálisis y los métodos microbiológicos, entre otros.

Actualmente la técnica más utilizada es la CLAR debido a que es muy selectiva y capaz de separar el compuesto de interés de metabolitos u otras sustancias, además de que se puede cuantificar la mayoría de los fármacos.

Por las características de las columnas que se utilizan en la técnica CLAR, se requiere realizar procesos de semipurificación del fluido biológico, estos procesos tienen la finalidad de eliminar las sustancias que dañan las columnas empleadas para la separación de los compuestos y así tener una matriz lo más pura posible que permita cuantificar de manera precisa y exacta las concentraciones de las sustancias de interés.

Los procesos de semipurificación de las muestras pueden ser tan simples como la precipitación de proteínas hasta procesos de cromatografía en cartuchos.

Independientemente de la técnica utilizada para la cuantificación de los fármacos es necesario que ésta sea previamente validada, para que así los resultados obtenidos sean confiables, por lo que existen ciertos criterios de validación, los cuales se dividen en dos partes.

- 1) La validación que se realiza durante el montaje del método analítico y
- 2) La validación que se lleva a cabo como evaluación de la calidad del método durante la determinación de las muestras provenientes del sujeto de estudio (NOM-177-SSA1- 1998).

La validación previa al estudio comprende la evaluación de varios parámetros: selectividad, intervalo de calibración y linealidad, precisión y exactitud intra e interdías, recuperación, límite de cuantificación y límite de detección.

**V.1.1 Selectividad.** Este parámetro determina si el método es capaz de separar al compuesto de interés, con respecto a otras sustancias, ya sean exógenas o endógenas que puedan interferir con la cuantificación del mismo. Para ello se colecta la matriz biológica proveniente de seis sujetos distintos y se somete al proceso de semipurificación para después analizarse por el método correspondiente. No debe existir ninguna señal que interfiera con la cuantificación del compuesto de interés.

**V.1.2 Intervalo de Validación.** Es el rango de concentraciones que se emplean para validar el método analítico. Este intervalo se determina de acuerdo a las concentraciones esperadas en el estudio farmacocinético, en función de la dosis del fármaco que se administre, es importante definir este intervalo al inicio del montaje del método analítico, en virtud de que todas las validaciones se realizan dentro de este intervalo.

**V.1.3 Linealidad.** La linealidad se define como la relación matemática existente entre la concentración a evaluar con respecto a la respuesta observada. Esta respuesta puede ser la absorción de luz ultravioleta, la emisión de fluorescencia, la generación de una corriente eléctrica, etc. En la mayoría de los casos la relación matemática que se sigue entre la concentración y la respuesta es la ecuación de una recta (de ahí el término linealidad). Sin embargo, en algunas ocasiones como en el caso del radioinmunoanálisis, la relación no es recta, pero está bien descrita por una ecuación determinada. Es indispensable que la linealidad se evalúe en todo el intervalo de concentraciones que se determinarán (intervalo de validación), ya que en función de la ecuación obtenida en la curva de calibración se realiza la cuantificación de las concentraciones por interpolación. El número de estándares requeridos en validación para definir la ecuación de la curva calibración dependerá del rango de concentraciones a evaluar y de las características de la respuesta del detector en función de la concentración, pero en general se recomienda que sean al menos cinco puntos.

**V.1.4 Exactitud.** Se define como la concordancia de los valores obtenidos con los reales. Este parámetro se evalúa mediante la adición de concentraciones conocidas del fármaco a analizar y se determina el valor que se obtiene con el método analítico. Se recomienda que se realice en un mismo día y en días distintos. En general, cuando se evalúa en un mismo día es recomendable que se realice al menos por quintuplicado en tres diferentes concentraciones (una baja, una intermedia y una alta) todas dentro del intervalo de validación del método. Adicionalmente para la evaluación entre días, se recomienda que se realicen a las mismas concentraciones que las usadas para la evaluación de un mismo día, pero en este caso, se realiza al menos por duplicado para cada una de las concentraciones en al menos tres días distintos. Se

recomienda que la exactitud del método sea de  $\pm 15\%$  del valor teórico de la concentración, es decir, se tolera obtener concentraciones medidas entre 85 y 115% del valor teórico. Sin embargo esta tolerancia se puede ampliar a  $\pm 20\%$  en el caso del límite de cuantificación del método. En el caso del radioinmunoanálisis, se recomienda que el valor promedio medido esté dentro de un  $\pm 20\%$  del valor teórico en todos los puntos de evaluación con excepción del límite de cuantificación, en el que se tolera que esté dentro de un  $\pm 25\%$  del valor teórico.

**V.1.5 Precisión.** Este parámetro nos indica que tan variable es el método tanto en un mismo día de análisis como en distintos días. Este parámetro se calcula basándose en la desviación estándar relativa (coeficiente de variación) que resulta de dividir la desviación estándar del método entre el valor de la media obtenida, todo ello multiplicado por 100 para expresarlo como porcentaje. Al igual que en el caso de la exactitud, se recomienda la evaluación de este parámetro en un mismo día y en distintos días. Cuando se evalúa en un mismo día se recomienda que se realice por quintuplicado en tres diferentes concentraciones (las mismas empleadas en la exactitud) todas dentro del intervalo de calibración. Para la evaluación en días diferentes, se recomienda que se realice a las mismas concentraciones que las usadas en la evaluación en un mismo día, pero en este caso se realiza al menos por duplicado para cada una de las concentraciones durante tres días distintos. Se recomienda un coeficiente de variación en ambos casos menor al 15%, con excepción de que en el límite de cuantificación se tolera hasta un 20%. Al igual que en la exactitud, en el caso de radioinmunoanálisis, también se dan tolerancias más amplias, ya que se pide que el coeficiente de variación para todas las concentraciones sea de hasta el 20% y en el límite de cuantificación se amplía a 25% (NOM-177-SSA1-1998).

**V.1.6 Recuperación.** Las muestras biológicas a analizar deben de ser sometidas a procesos de semipurificación, durante estos procesos es factible que se pierda fármaco, debido a ello, es importante que se evalúe la recuperación del compuesto a analizar. En general, se tolera que la recuperación del fármaco durante el proceso analítico completo pueda ser menor del 100%, pero se recomienda que sea reproducible en todas las concentraciones que corresponden al rango de validación.

**V.1.7 Límite de cuantificación.** Éste corresponde al estándar más pequeño que puede ser medido de una manera fidedigna y que cumple con los criterios de exactitud y precisión antes descritos. Es muy importante conocer este valor, ya que toda concentración que se encuentre por debajo de este límite no puede ser utilizada en el análisis farmacocinético y estadístico, ya que todo valor inferior a éste no es cuantificado adecuadamente. Dicho de otra forma, el punto más bajo de la curva que reúne los requisitos de exactitud y precisión es la concentración mínima cuantificable.

**V.1.8 Límite de detección.** Es la concentración mínima cuya señal puede distinguirse del ruido de fondo. Este parámetro es informativo acerca de la sensibilidad del método y en un momento dado, hasta que concentración es factible poder establecer la validación del método. Es recomendable realizar un reporte que proporcione este parámetro, solamente con propósitos informativos y se considera más importante el límite de cuantificación con respecto al límite de detección.

Existen otros parámetros deseables a evaluar tales como la robustez y la tolerancia que dependiendo del uso del método validado son o no necesarios. Estos dos parámetros indican si

cambios pequeños en las características analíticas pueden tener consecuencias significativas en la cuantificación de los compuestos. Como es deseable que durante los estudios de comparación de biodisponibilidad no se modifiquen las condiciones analíticas, no es tan importante la evaluación de estos parámetros.

**V.1.9 Seguimiento durante el estudio.** Para corroborar que el método no ha cambiado sus características, es fundamental realizar la evaluación del método durante el análisis de las muestras del estudio a realizar (farmacocinético o de biodisponibilidad) y los parámetros a evaluar son la selectividad, el intervalo de validación, la linealidad, la exactitud y la precisión.

**V.1.10 Selectividad.** En este caso se evalúa con las muestras biológicas libres de fármacos (muestra al tiempo 0) de los sujetos de estudio. Se verifica que no aparezcan señales que puedan interferir con la cuantificación del o de los compuestos de interés.

**V.1.11 Intervalo de la curva calibración y linealidad.** Durante el seguimiento del comportamiento del método en el estudio, se sugiere verificar que el intervalo de la curva de calibración sea adecuado en función de las concentraciones obtenida en el estudio farmacocinético; es decir, se revisa que la calibración abarque todas las concentraciones que se determinen; es recomendable que cada día de trabajo se realice una curva de calibración igual a la realizada en la validación previa al estudio y que la cuantificación de los compuestos de interés se determine por interpolación con esa curva.

**V.1.12 Exactitud y precisión.** Éstas se evalúan por duplicado a tres niveles de concentraciones (baja, intermedia y alta con respecto a la curva de calibración, pero dentro de

este intervalo), es deseable que estas concentraciones sean las mismas empleadas en los análisis interdías. Los criterios de aceptación son iguales a la validación previa al estudio, adicionalmente estas muestras sirven como control de calidad para evaluar si el trabajo realizado en ese día fue adecuado. En general, se acepta que de las seis concentraciones evaluadas, al menos cuatro de ellas deben de estar dentro de un rango de  $\pm 20\%$  del valor teórico nominal. Se permite que dos de ellas se salgan de esta tolerancia, sin embargo, estas dos no deben ser de la misma concentración.

**V.1.13 Adecuación del sistema.** Al inicio de cada día de trabajo es fundamental revisar que el equipo esté funcionando adecuadamente. Debido a ello, se corren algunas rutinas para establecer si el equipo ha cambiado o no su comportamiento normal. Es indispensable que el equipo funcione correctamente antes de realizar el análisis de las muestras en cada uno de los diferentes días de trabajo. Cualquier anomalía en el funcionamiento se debe corregir antes de analizar las muestras.

## V.2 CONDICIONES PARA DETERMINAR EL NIMESULIDE.

En la actualidad ya existen algunos reportes de la determinación del nimesulide en muestras de plasma y orina de 1 mL. Entre los métodos descritos para la determinación de nimesulide se encuentran los reportados por Castoldi y cols (1988) y Pulkkinen y cols (1991). Castoldi realizó una doble extracción con benceno y Pulkkinen realizó una doble extracción con benceno y tolueno. En la técnica de Castoldi tanto la solución del nimesulide, su metabolito y el estándar interno (tolbutamida) fueron disueltos en metanol. La técnica de extracción la realizó en 1 mL de plasma a la que le agregó 10  $\mu\text{L}$  del estándar interno tolbutamida (2.5  $\mu\text{g}/10 \text{ mL}$ ). Se acidificó con HCl concentrado a  $\text{pH}=1$ . La extracción la realizó con benceno por doble

extracción, se centrifugó por 10 minutos, se separó la capa orgánica y se evaporó bajo corriente de nitrógeno y calentamiento, se resuspendió el residuo seco en 200  $\mu\text{L}$  de fase móvil y finalmente se transfirió a un vial y se inyectaron al sistema cromatográfico de manera automática 5  $\mu\text{L}$ . El sistema cromatográfico fue una bomba 510, un detector de longitud de onda variable modelo 490, la longitud de onda fue de 230 nm, inyector automático 710, columna de fase inversa  $\text{C}_{18}$  (30 cm x 4.6 mm y 10  $\mu\text{m}$  de tamaño de partícula). La fase móvil estuvo compuesta de una solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M pH=5 y metanol en una proporción 50%-50%, v/v a un flujo de 1 mL/min y a una temperatura de 25°C.

Debido a lo tedioso de estos métodos, al tiempo prolongado de procesamiento de las muestras y a la cantidad de muestra necesaria para la cuantificación del nimesulide, se decidió diseñar un nuevo método para determinar este compuesto en 100  $\mu\text{L}$  de sangre; ya que en los métodos antes mencionados determinan el nimesulide en muestras de 1 mL de plasma u orina; y nuestra necesidad metodológica fue determinarlo en un volumen menor. Por lo antes mencionado, se decidió desarrollar un método diferente a los ya reportados, el cual se validó antes de ser utilizado para la cuantificación de las muestras sanguíneas de nimesulide de las ratas que se utilizaron en este estudio.

### **V.3 PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES.**

La solución inicial se preparó disolviendo el nimesulide y la indometacina (estándar interno, E.I.) en metanol, a una concentración de 1 mg/mL, a partir de ella se realizaron las diluciones necesarias para los puntos que conformaron la curva de calibración, utilizando como solvente la fase móvil, F.M. (42% acetonitrilo y 58% de amortiguador de fosfato de potasio monobásico 0.05 M a pH = 5).

#### **V.3.1 PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA.**

Se pesaron 6.8 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  y se disolvieron en 1 L de  $\text{H}_2\text{O}$ , teniendo así una solución 0.05 M, a esta solución amortiguadora se le reguló el pH a 5 con KOH concentrado y así se utilizó para la preparación de la fase móvil.

#### **V.3.2 PREPARACIÓN DEL AMORTIGUADOR DE FOSFATOS.**

Esta solución se preparó de la misma forma que la anterior pero su pH se reguló a 7.4.

#### **V.3.3 PREPARACIÓN DEL HCl 1N.**

Se ponen 9.82 mL de HCl y se llevan a 100 mL con  $\text{H}_2\text{O}$  en un matraz aforado.

#### V.4 PROCEDIMIENTO DE EXTRACCIÓN.

En un tubo cónico de rosca de 15 mL se colocaron 100  $\mu$ L de sangre adicionando 400  $\mu$ L de amortiguador de fosfatos pH=7.4. Posteriormente se adicionaron 200  $\mu$ L de E.I. (indometacina) de una concentración de 10  $\mu$ g/mL. Las muestras se acidificaron con 100  $\mu$ L de HCl 1N, se les adicionaron 6 mL de éter etílico como solvente, los tubos se agitaron en vortex y posteriormente las muestras fueron centrifugadas. Se separó la fase orgánica y se colocó en un tubo cónico de boca ancha, para que finalmente se evaporara a baño maría entre 45-50°C bajo corriente de nitrógeno. Los extractos secos se reconstituyeron con 200  $\mu$ L de fase móvil y se inyectaron 100  $\mu$ L al sistema cromatográfico.

#### V.5 SISTEMA CROMATOGRÁFICO.

Se utilizó un cromatógrafo Waters, formado por una Bomba 501, un detector de longitud de onda variable Modelo 484, un inyector Rheodyne 7725i de asa de 100  $\mu$ L y un Registrador Servogor modelo 120. La separación de los compuestos se llevó a cabo en una Columna de fase inversa Symmetry Cs (150 mm x 3.9 mm) eluida con una fase móvil constituida por una mezcla de solución amortiguadora de fosfatos 0.05 M, pH=5 y acetonitrilo v/v (52: 48), respectivamente. La velocidad de flujo fue de 1.8 mL/min. La detección se realizó por UV a una longitud de onda de 290 nm. La cuantificación se realizó por la relación de alturas del nimesulide y el estándar interno.

## V.6 VALIDACIÓN DEL MÉTODO.

La validación del método se realizó por la adición de concentraciones conocidas de nimesulide e indometacina de muestras de sangre de rata libre de ambos compuestos y estas muestras fueron extraídas como se explicó en la sección V.4.

Para determinar la linealidad del método se prepararon curvas patrón en el rango de concentraciones de 0.2 a 5  $\mu\text{g/mL}$ . La concentración de estándar interno fue de 10  $\mu\text{g/mL}$ . El cálculo de la concentración real se determinó por la relación de alturas del nimesulide y el estándar interno.

## V.7 RESULTADOS

En la figura 4 se pueden observar los cromatogramas típicos obtenidos después de la inyección sanguínea de extractos en el sistema cromatográfico. Los tiempos de retención de la indometacina (estándar interno) y del nimesulide fueron de 4.2 y 8.2 minutos, respectivamente. En el panel (A) se tiene la extracción de sangre de rata libre de nimesulide y estándar interno (blanco) y se puede apreciar que no existe ningún otro pico que interfiera con los compuestos de interés. En el panel (B) se tiene una extracción a la que se le agregaron concentraciones conocidas del E.I. y nimesulide, se observan los picos característicos de estos compuestos a los tiempos de retención de 4.2 min y a los 8.2 min, respectivamente. Finalmente, en el panel (C) se

observa la inyección de una muestra de rata ya extraída y a la cual se le administró el nimesulide por vía oral y en el proceso de extracción se le agregó una concentración conocida de E.I. (indometacina de 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), presentándose también en este caso los picos característicos para cada uno de los compuestos. En la figura 5 se observa la relación lineal entre la altura de los picos cromatográficos del nimesulide y el estándar interno; el rango de concentraciones fue 0.2 y 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y se obtuvo un valor de  $r=0.9995$ .

La recuperación del nimesulide y el estándar interno de las muestras sanguíneas fue similar y estuvo dentro de un rango del 90-100%, estos valores se obtuvieron al comparar la altura de los picos cromatográficos de las extracciones sanguíneas con su respectiva solución estándar.

Se evaluó la variabilidad interdía e intradía también y los valores de exactitud y precisión se obtuvieron por análisis de sextuplicados de muestras de sangre libres de fármaco a las cuales se les agregaron las siguientes concentraciones de nimesulide 0.45, 1.5 y 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  lo cual está representado en la tabla 2; en el análisis de los datos podemos observar que tanto para la variabilidad intra como inter individual no existen coeficientes de variación superiores al 12% y la exactitud se encuentra dentro de un rango de 94.8 al 111.7%, lo que demuestra que el método puede ser utilizado para los fines que se realizó y el límite de detección del método fue de 40  $\text{ng}/\text{mL}$ .

**TABLA 2.**  
**EXACTITUD Y PRECISIÓN DEL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE NIMESULIDE.**

Concentración agregada (µg/mL)	Relaciones de altura (N/E.I.)	Concentración determinada (µg/mL)	Exactitud (%)	Coefficiente de variación (%)
<b>Intradía</b>				
0.45	0.3226 ± 0.0038	0.42 ± 0.005	94.8	2.9
1.5	1.1146 ± 0.0340	1.67 ± 0.051	111.7	6.8
4.0	2.8190 ± 0.1396	4.36 ± 0.216	109.2	11.0
<b>Interdía</b>				
0.45	0.3353 ± 0.0160	0.44 ± 0.021	98.7	9.8
1.5	1.0956 ± 0.0374	1.64 ± 0.056	109.4	6.9
4.0	2.6353 ± 0.1573	4.07 ± 0.243	101.9	11.9

Los datos se expresan como la media (n=6) ± E.E.

## V.8 DISCUSIÓN

En los resultados se observa que la técnica para la determinación del nimesulide requiere una cantidad más pequeña de muestra (100 µL de sangre) que en otras técnicas ya existentes en la literatura (Pulkinen, 1987 y Castoldi y cols, 1988) Esto es muy importante en los estudios farmacocinéticos en especies pequeñas por la cantidad de muestras que se tienen que tomar, con esta técnica es necesario una sola extracción con éter etílico, y por lo tanto se pueden manipular mayor número de muestras por día reduciendo así el tiempo de extracción (las técnicas ya reportadas realizan 2 o mas extracciones). Además de los beneficios ya mencionados, esta técnica cuenta con los lineamientos de validación que actualmente se exigen.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

En la figura 4 se observa que se tienen picos bien definidos y afilados tanto para el nimesulide como para el estándar interno (indometacina), con tiempos de retención de 4.2 minutos para el estándar interno y de 8.2 minutos para nimesulide, mostrándose también que en la muestra blanco no existe ninguna impureza de la matriz biológica que interfiera con los picos de interés.

El método es lineal en el intervalo de concentración de 0.2 a 5  $\mu\text{g/mL}$  como se observa en la figura 5. El coeficiente de correlación mínimo aceptable debe ser mayor a 0.99 según la NOM-177-SSA1-1998 y en este estudio el coeficiente de correlación fue de 0.9995 con coeficientes de variación en todos los casos menores al 15%. En la evaluación de la variabilidad intra e interdía se obtuvieron coeficientes de variación entre 2.9 y 11.9% con valores de exactitud desde 94.8% hasta 111.7%. Por lo tanto, todos los datos obtenidos para la validación del método analítico se encuentran dentro de los límites aceptables (NOM-177-SSA1-1998).

Con este criterio se validó el método empleado en este trabajo por lo que su uso garantiza que la cuantificación del nimesulide es precisa siempre y cuando se cumpla con estos parámetros de validación y se verifique su funcionalidad corriendo diariamente una curva de calibración y duplicados de los controles de calidad.

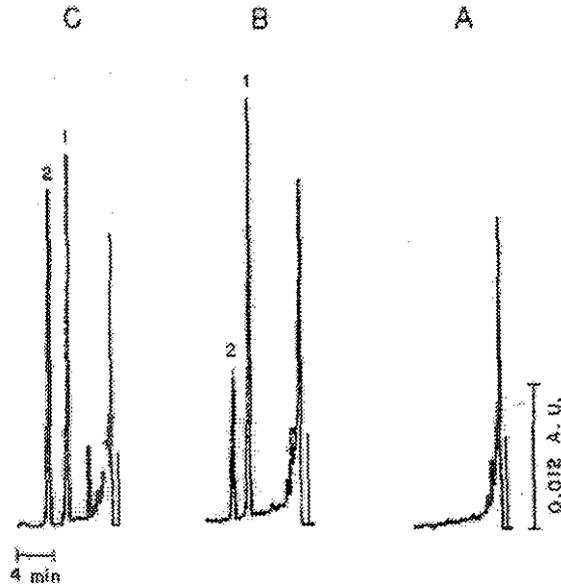


FIGURA 4

Cromatogramas típicos del nimesulide resultado de la inyección de una extracción de sangre al sistema cromatográfico. A) Extracción de sangre libre de fármaco (blanco), B) Pico obtenido al inyectar una extracción de sangre de 1  $\mu\text{g/mL}$  de estándar interno (1) o nimesulide (2), y C) Extracción de una muestra de sangre obtenida de una rata 12 h después de la administración oral de 10 mg/kg de nimesulide.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

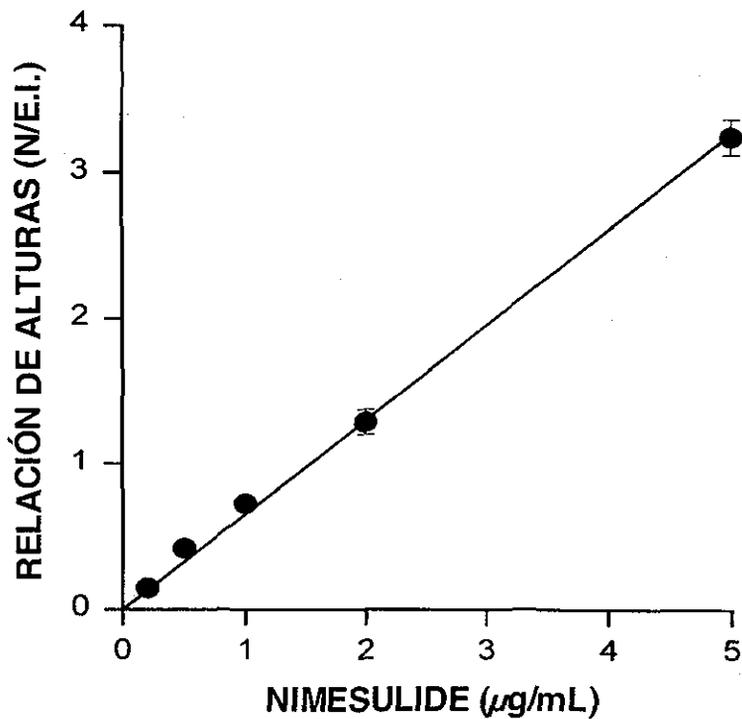


FIGURA 5

Curva de calibración del método para la determinación del nimesulide en muestras de sangre total, establecido en un rango de concentraciones de 0.2 a 5  $\mu\text{g/mL}$ . Estos datos se expresan como el promedio de 6 determinaciones  $\pm$  E.E.

## **CAPÍTULO VI. EVALUACIÓN DE LAS CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DEL NIMESULIDE EN RATAS CONTROL Y DESNUTRIDAS.**

Entre los muchos factores que pueden cambiar el comportamiento farmacocinético de los medicamentos se encuentra la desnutrición, por lo que uno de los objetivos de este trabajo de investigación es establecer si las concentraciones sanguíneas del nimesulide se modifican en ratas con desnutrición de tercer grado cuando se comparan con su grupo control.

En el primer capítulo se establecieron los conceptos de desnutrición, así como las evidencias de fármacos que han cambiado su farmacocinética en estados de desnutrición, en el capítulo cinco se explicó la técnica con la que se cuantificó el nimesulide en sangre y se demostró que el método es confiable para realizar el estudio de las concentraciones sanguíneas del mismo. En este capítulo se expondrán las condiciones bajo las cuales se llevó al cabo esta investigación desde el diseño del experimento, tipo de población, técnica de canulación en las ratas, tiempos de muestreo, condiciones de alimentación y tipo de alimento; así como el análisis farmacocinético y estadístico de los datos.

## **VI.1 MATERIAL Y MÉTODOS**

### **VI.1.1 POBLACIÓN**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Wistar de 45 días de nacidas las cuales se parearon por edad y peso al nacimiento y se construyeron dos grupos. El grupo A consistió en ratas normales con respecto a su edad y peso y estuvo conformado por 24 ratas las cuales se dividieron en 3 grupos, al grupo 1 se le administró una dosis oral de nimesulide de 5 mg/kg, al grupo 2 se le administró la dosis de 10 mg/kg y al grupo 3 se le administró la dosis superior de 20 mg/kg esto con el objetivo de establecer si existe proporcionalidad en la farmacocinética del nimesulide en ratas Wistar ya que en la literatura no hay evidencias reportadas al respecto.

El grupo B estuvo compuesto por las 8 ratas con desnutrición de tercer grado a las cuales se les administró una dosis oral de nimesulide de 10 mg/kg.

### **VI.1.2 TÉCNICA DE CANULACIÓN DE LA ARTERIA CAUDAL DE LA RATA.**

Con el fin de poder tomar muestras sanguíneas a diferentes intervalos de tiempo en las ratas, se procedió a canular la arteria caudal de la siguiente forma: se pesaron las ratas, se calculó la dosis de anestésico i.m., (rompún y ketamina) a una dosis de 3 mg/kg y 35 mg/kg de peso, respectivamente. Una vez anestesiada la rata, se fijó en la plancha quirúrgica con tela adhesiva en las patas y en posición boca arriba, se limpió la parte de la cola en donde se realizó la incisión, se expuso la arteria caudal con ayuda de pinzas quirúrgicas y se colocaron 2 hilos, uno en la parte superior y el otro en la parte inferior del lugar donde se colocó la cánula (una combinación de PE-10 y PE-50) de acuerdo a lo descrito por Granados-Soto y

cols, 1995. Se realizó una incisión parcial en la arteria y se introdujo la cánula, se fijó con los hilos previamente colocados y finalmente, se revisó que estuviera permeable. Una vez terminado el proceso de canulación, se dejó a la rata recuperarse de la anestesia y después se tomó la primera muestra correspondiente al tiempo 0 (blanco) e inmediatamente se administró el nimesulide por vía oral.

## VI.2 DISEÑO EXPERIMENTAL.

El trabajo experimental se dividió en dos partes

**I.- Curso temporal de las concentraciones sanguíneas del nimesulide en ratas control.** Un conjunto de 24 ratas se dividió en 3 grupos de 8 ratas cada uno, las cuales tuvieron un peso promedio de 285 g. El grupo 1 recibió una dosis única de 5 mg/kg de nimesulide por vía oral a través de una sonda orogástrica; el grupo 2 recibió la dosis de 10 mg/kg y el grupo 3 recibió la dosis de 20 mg/kg. Las ratas de este grupo recibieron el alimento que normalmente consumen en el bioterio y tanto el alimento como el agua fueron "*ad libitum*" (Figura 6).

**II.- Curso temporal de las concentraciones sanguíneas del nimesulide en ratas desnutridas.** Un conjunto de 8 ratas sometidas a una alimentación especial para que pierdan peso y al alcanzar un déficit de éste igual o mayor al 40% con respecto a sus controles (Figura 6), se canularon y se les administró el nimesulide a una dosis de 10 mg/kg.

Estas ratas tuvieron un peso promedio de 170 g y fueron alimentadas de manera especial con alimento preparado en el I.N.P. el cual se especifica en la tabla 3.

La toma de muestras para todos los grupos de ratas fue el mismo, se tomaron 200  $\mu\text{L}$  de sangre de la arteria caudal (previamente canulada) al tiempo 0 antes de la administración del fármaco, a los 10, 20, 30 y 45 minutos y a las 1.0, 1.5, 2, 3, 4, 6, 8 y 12 h después de la administración del nimesulide. Las muestras de sangre se almacenaron en un congelador a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su posterior análisis por CLAR de acuerdo en lo descrito en el capítulo V.

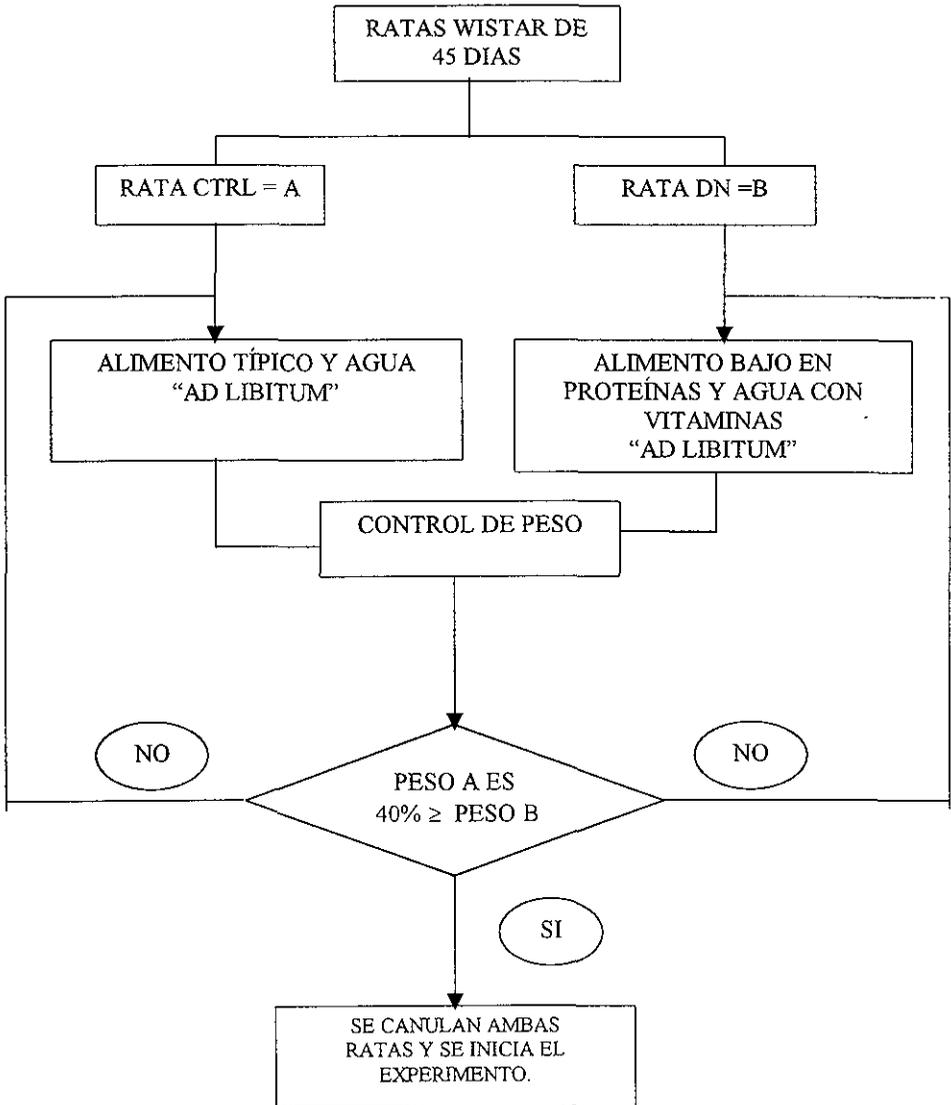


FIGURA 6

Esquema del diseño experimental utilizado para la evaluación de los niveles plasmáticos de nimesulide en ratas control (A) y desnutridas (B).

## VI. 2.1 CONDICIONES DE ALIMENTACIÓN PARA LOS DOS GRUPOS DE RATAS.

Las ratas del grupo A se alimentaron "Ad libitum", con alimento especial para ratas y también bebieron agua "Ad libitum". El grupo de ratas desnutridas se alimentaron con una dieta especial baja en proteínas y en el agua se les adicionó vitaminas y bebieron el agua "ad libitum". Este tipo de alimentación se les dio a partir de los 45 días de nacidas para que al momento de alcanzar la desnutrición de tercer grado tuvieran un peso aproximado de 170 g de tal manera que soportaran el tiempo de ayuno y las tomas de muestras durante 12 h.

Para determinar el momento de la desnutrición severa se llevó al cabo el control de peso diario y curvas de crecimiento para cada una de las ratas; en el momento que el grupo de ratas desnutridas presentó un déficit de peso del 40% o mayor se consideró como una desnutrición de tercer grado y fue entonces cuando se inició el estudio farmacocinético, (Figura 7).

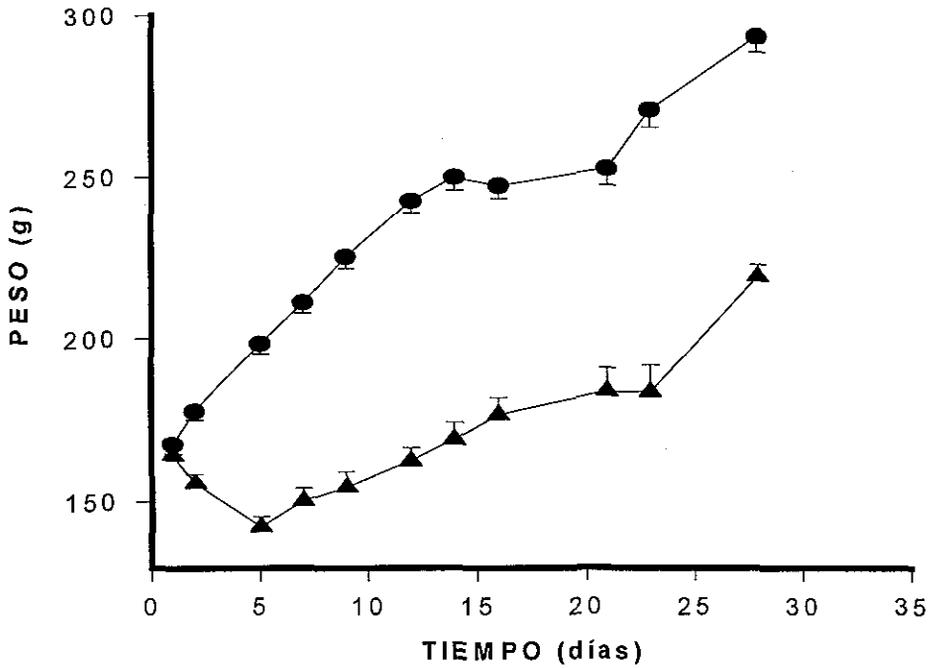


FIGURA 7

Evolución temporal del peso de las ratas alimentadas con una dieta convencional (●) y aquellas que se les dio una dieta hipoprotéica para provocarles la desnutrición (▲). Los datos se expresan como el promedio  $\pm$  el error estándar.

## VI.2.2 COMPOSICIÓN DEL ALIMENTO PARA DESNUTRIR A LAS RATAS.

El alimento utilizado para desnutrir a las ratas se preparó en las instalaciones de investigación del I.N.P. en el que gran parte de la purina fue reemplazada por almidón y por salvado, es decir, un gran contenido de carbohidratos y fibra. En la tabla 3 se muestra el contenido exacto de los diferentes componentes; además es necesario mencionar que el alimento utilizado para la alimentación normal en las ratas es purina la cual tiene un contenido balanceado de proteínas, carbohidratos, minerales y vitaminas, lo que permite una adecuada nutrición de las ratas.

**TABLA 3.**

Contenido del alimento que se utilizó para producir la desnutrición en las ratas.

Contenido alimenticio	Proporción (%)	Peso (g), 500 g de masa
Purina	3.93	19.65
Almidón	58.44	292.20
Salvado	37.53	187.65
Minerales	0.10	0.50

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### VI.3 ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.

El análisis farmacocinético se realizó mediante un método no compartimental. Se graficaron las curvas individuales y de las gráficas se obtuvieron la  $C_{max}$  y  $t_{max}$ . El ABC se obtuvo por el método de los trapecoides (Rowland y Tozer, 1989). Todo el análisis farmacocinético se realizó utilizando el programa WinNonlin Professional (Pharsight, Corporation, CA, EUA).

### VI.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La evaluación de la proporcionalidad en los parámetros farmacocinéticos con respecto a la dosis se evaluó por análisis de varianza seguida de una prueba de Tukey.

Con el fin de determinar si existen diferencias significativas entre el grupo de ratas control y desnutridas, se realizó la prueba t de Student para datos no pareados para ABC y  $C_{max}$ . La  $t_{max}$  se comparó mediante una prueba de U de Mann-Whitney.

## VI.5 RESULTADOS

### VI.5.1 FARMACOCINÉTICA DE NIMESULIDE EN RATAS CONTROLES

En esta parte del trabajo se evaluó el curso temporal del nimesulide a tres dosis diferentes (5, 10 y 20 mg/kg) con un comportamiento cinético muy similar entre los grupos, esto lo podemos observar en la figura 8. En la tabla 4 se muestran los parámetros farmacocinéticos de las tres dosis administradas y para establecer si la farmacocinética del nimesulide es lineal podemos apreciar en la figura 9 que a las tres dosis evaluadas no se presentaron cambios significativos al comparar ABC/Dosis VS Dosis administrada, aunque se observa un ligero incremento para la dosis de 5 mg/kg; sin embargo en la comparación de  $C_{max}$ /Dosis VS Dosis administrada, la dosis de 5 mg/kg presentó diferencias significativas con respecto a las dosis de 10 y 20 mg/kg.

**TABLA 4**

Parámetros de biodisponibilidad del nimesulide a 3 dosis diferentes.

Dosis (mg/kg)	$T_{max}$ (h)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g/mL}$ )	ABC ( $\text{mg/L}\cdot\text{h}$ )
5	$6.33 \pm 1.4$	$0.95 \pm 0.1$	$5.77 \pm 0.8$
10	$5.25 \pm 1.0$	$1.18 \pm 0.2$	$8.64 \pm 1.2$
20	$6.67 \pm 0.4$	$2.19 \pm 0.2$	$16.80 \pm 1.1$

Estos datos se expresan como la media de una  $n=8 \pm \text{E.E.}$

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

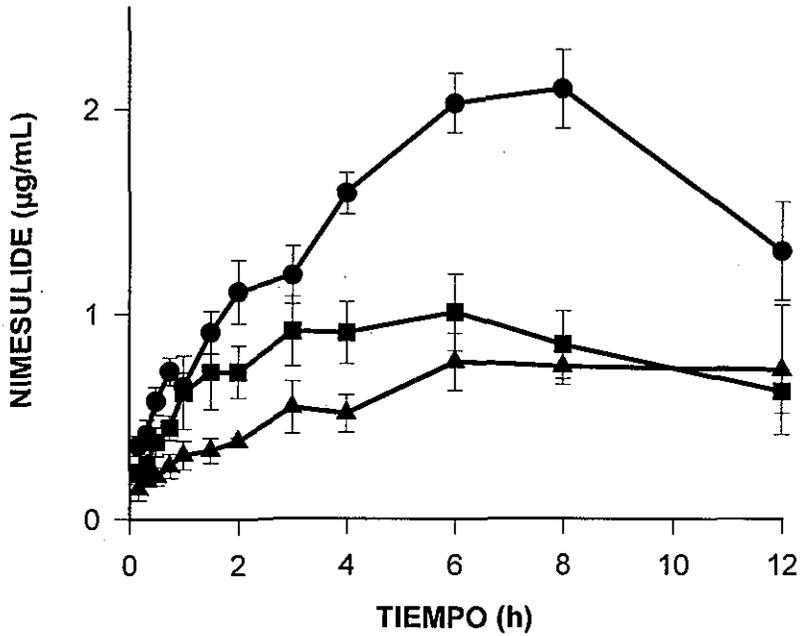


FIGURA 8

Concentraciones sanguíneas del nimesulide administrado por vía oral a tres dosis diferentes, ▲ 5 mg/kg, ■ 10 mg/kg y ● 20mg/kg expresado por el promedio de 8 ratas para cada dosis  $\pm$  el error estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

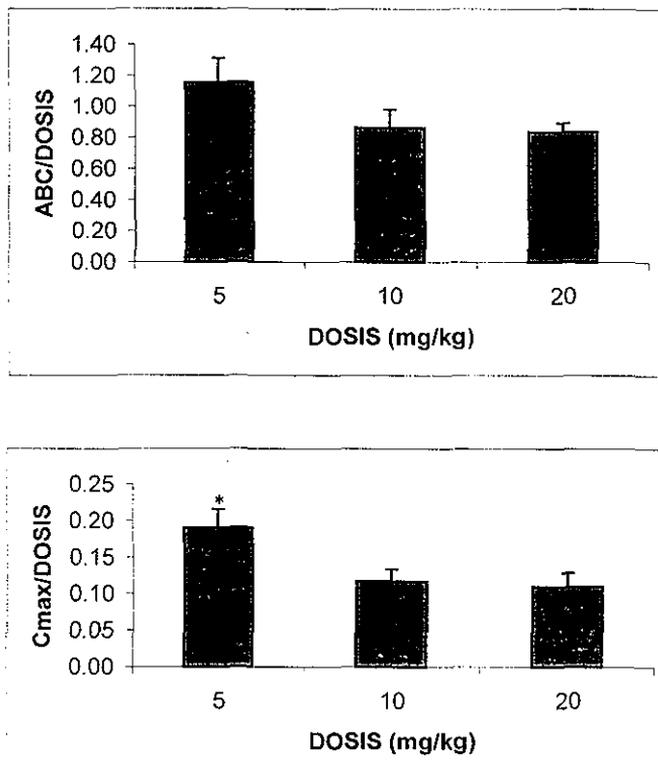


FIGURA 9

Comparación de los parámetros Cmax y ABC normalizados por la dosis para establecer si la farmacocinética del nimesulide es lineal. Los datos se expresan como el promedio de 8 ratas  $\pm$  el error estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

Una vez evaluada la farmacocinética del nimesulide en ratas normales se procedió a evaluarla en ratas desnutridas. La comparación del comportamiento farmacocinético del nimesulide a la dosis de 10 mg/kg en ratas control contra ratas desnutridas se observa en la figura 10, en esta figura se ven disminuciones en las concentraciones sanguíneas de nimesulide en las ratas desnutridas y cierta tendencia de aumento en el  $t_{max}$  pero sin alcanzar diferencias significativas con ninguna de las pruebas con que fueron evaluadas (t de Student y U de Mann-Whitney), los parámetros obtenidos en ambos casos los podemos ver en la tabla 5.



**TABLA 5**

Parámetros obtenidos de las ratas control vs desnutridas.

Grupo	Tmax (h)	Cmax (µg/mL)	ABC (mg/L*h)
Controles	5.25 ± 1.03	1.18 ± 1.03	8.64 ± 1.19
Desnutridas	7.48 ± 1.09	1.03 ± 0.10	8.27 ± 0.85

Estos valores se expresan como la media de  $n=8 \pm E.E.$ , la dosis oral administrada fue de 10 mg/kg y el ABC está calculada de 0 a 12 h.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

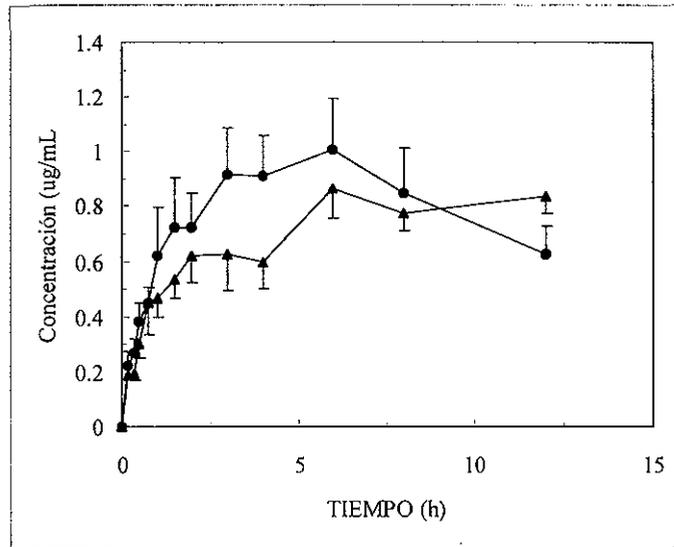


FIGURA 10

Curso temporal de las concentraciones sanguíneas del nimesulide a la dosis de 10 mg/kg (vía oral) del grupo control ● vs el grupo desnutrido ▲. Los datos se expresan como el promedio de 8 ratas ± el error estándar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## **VI.6 DISCUSIÓN**

### **VI.6.1 CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DEL NIMESULIDE EN RATAS NORMALES A TRES DOSIS DIFERENTES**

En la actualidad no existe ningún reporte en donde se haya realizado un estudio del nimesulide en ratas con fines farmacocinéticos. Sin embargo, si se han realizado algunos estudios en esta especie con otros fines, como es el caso de un estudio en donde se observa la selectividad del nimesulide sobre la ciclooxigenasa-2, la dosis que utilizaron en este experimento fue la de 10 mg/kg 2 veces al día vía intragástrica (Karmeli, 2000) y la dosis que nosotros utilizamos fue la misma pero la usamos como dosis única por kg de peso de la rata y adicionalmente evaluamos las dosis de 5 y 20 mg/kg; por lo tanto es éste el primer estudio de farmacocinética del nimesulide en ratas.

El estudio de las concentraciones sanguíneas en las ratas a las que se les administró el fármaco a diferentes dosis (5, 10 y 20 mg/kg) muestra una tendencia de comportamiento similar; sin embargo, para establecer si el comportamiento farmacocinético del nimesulide era lineal a las tres dosis evaluadas se comparó el ABC/DOSIS VS DOSIS administrada y  $C_{max}$ /DOSIS VS DOSIS administrada y solamente hubo diferencias significativas para la dosis de 5 mg/kg con respecto a las dosis de 10 y 20 mg/kg en la comparación de  $C_{max}$ /DOSIS VS DOSIS; lo cual puede ser debido a la poca solubilidad del nimesulide y que a la dosis menor se haya solubilizado mejor que a las dosis de 10 y 20 mg. Por lo anterior se cree que la absorción del nimesulide pudo

haber sido mejor para la dosis inferior y por eso alcanzó una  $C_{max}/DOSIS$  mayor a las otras dos dosis evaluadas.

En este trabajo podemos ver una absorción lenta del nimesulide tanto en el grupo control como en el de las ratas desnutridas, lo cual creemos que se debe a una situación farmacéutica de solubilidad del compuesto ya que éste se administro suspendido en carboximetilcelulosa debido a que es poco soluble en agua (Singla AK y cols, 2000) por lo que es posible que por diferencia de tamaño de las partículas, la solubilidad del nimesulide se haya dado poco a poco y por lo tanto esto se reflejó en una absorción lenta. Sin embargo, no se puede descartar un posible proceso de recirculación enterohepática en las ratas a diferencia con los humanos, ya que el nimesulide en humanos se elimina por heces del 17.9–36.2 % y en ratas la eliminación por heces es de aproximadamente el 68%. Esto indica que hay una mayor excreción del nimesulide y sus metabolitos por vía biliar en ratas (Bernareggi, 1998). Aunque habitualmente los fármacos administrados a ratas se metabolizan más rápido que en humanos, existen también las excepciones como es el caso de diclofenac (Torres-López y cols, 1997) que en ratas presenta recirculación enterohepática y en humanos no, por lo que la vida media en humanos es de 1-2 h y en ratas se prolonga hasta 16 h; lo que también pudo haber sucedido en este caso.

#### **VI.6.2 CONCENTRACIONES SANGUÍNEAS DEL NIMESULIDE EN RATAS DESNUTRIDAS.**

Se ha estudiado el comportamiento farmacocinético de otros medicamentos en individuos con desnutrición en donde se han reportado cambios en algunos de los parámetros farmacocinéticos (Reghuram, 1981 y 1982; Krishnaswamy y cols, 1981; Shobha y cols, 1991;

Bolme y cols, 1995; Raj y cols, 1998 y Touw, 1998). Sin embargo, también se han reportado casos en donde la desnutrición no da lugar a cambios farmacocinéticos, como es el caso de estreptomicina (Prasad, 1978).

Con respecto al nimesulide no existe ningún reporte que describa si existen diferencias significativas con relación a la desnutrición; por lo que en este estudio se compararon las concentraciones sanguíneas del nimesulide entre un grupo de ratas desnutridas y su control, observándose que éstas no presentan cambios significativos en los parámetros evaluados al administrarles una dosis de 10 mg/kg de peso. Sin embargo, es necesario tomar en cuenta que la dosis administrada se corrigió por kg de peso, lo que hizo que las ratas desnutridas recibieran una dosis total menor que la que recibieron las ratas controles; si no se hubiera administrado la dosis corregida por kg de peso es posible que se hubieran podido observar concentraciones mayores en las ratas desnutridas, aunque con esta corrección se pudo ver que no existen diferencias significativas en los parámetros evaluados.

Es evidente que en las ratas desnutridas no se puede observar la fase de caída del nimesulide con la misma claridad que en las ratas controles, por lo que pudiera ser posible que al menos alguno de los procesos farmacocinéticos esté modificado. El cernimiento de cual característica farmacocinética está modificada se deberá de elucidar en un estudio posterior.

Se ha descrito que la desnutrición es un factor que puede modificar la farmacocinética de algunos compuestos como los que ya se han mencionado, sobre todo aquellos que se metabolizan vía CYP (Brosen, 1990; Nelson, 1993), y la dieta probablemente representa la mayor ruta de expresión y desarrollo de los citocromos.

El nimesulide se metaboliza principalmente por oxidación por lo cual se esperaba observar cambios en su metabolismo, los cuales no se expresaron claramente en ninguno de los parámetros farmacocinéticos analizados, pero sin embargo, en este estudio no fue posible medir la Cl, que es el parámetro farmacocinético más apropiado para el estudio del metabolismo de los fármacos *in vivo* ya que la Cl mide la capacidad de eliminación del fármaco del organismo.

Por otro lado, el nimesulide tiene la propiedad de unirse importantemente a proteínas plasmáticas y se ha descrito que en estado de desnutrición la albúmina sérica se encuentra disminuida; sin embargo, a la dosis de 10 mg/kg de peso de nimesulide no hay saturación de las proteínas (Bree F y cols, 1993), lo cual puede explicar que no existan cambios entre ambos grupos en este estudio.

Por lo explicado en esta sección se considera importante que en un futuro se realice un estudio en el que el tiempo de muestreo sea mayor para así poder discernir si realmente existen cambios significativos debido a la desnutrición expresados en los parámetros de eliminación. Además es importante mencionar que a la fecha no se conocen las isoenzimas del complejo CYP que metabolizan el nimesulide, por todo esto es muy difícil llegar a concluir con este único estudio si la desnutrición es un fenómeno que afecta la farmacocinética del nimesulide o no.

## CAPÍTULO VII. CONCLUSIONES

De acuerdo con los resultados, el micrométodo de cromatografía de líquidos de alta resolución desarrollado es rápido, sencillo y reproducible además cumple con los lineamientos de validación, presentando una correlación de 0.9995 y un límite de detección de 40 ng/mL.

En la comparación del ABC y Cmax normalizados por la dosis, se presentaron solo cambios significativos entre la Cmax para la dosis de 5 mg/kg con respecto a las dosis de 10 y 20 mg/kg, lo cual se puede deber a los problemas de solubilidad que presenta el nimesulide por lo que a dosis mayores, es mayor la dificultad de disolverlo, por lo tanto, tiene mayor problema de absorción y pudiera ser que por eso las concentraciones alcanzadas por las 2 dosis mayores sean menores que en la dosis de 5 mg/kg.

En la comparación de las concentraciones sanguíneas al administrar el nimesulide a la dosis de 10 mg/kg de peso por vía oral a ratas control y ratas desnutridas no se observaron diferencias significativas. El curso temporal del nimesulide parece no ser afectado por la desnutrición en las ratas Wistar. Sin embargo, no es posible descartar cambios.

**CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Allemon AM, Lebacqz E. Study of the excretion balance and metabolism of  $^{14}\text{C}$  nimesulide after single oral dose administration in 6 healthy male volunteers. *Helsinki Healthcare*. 1993.

Bernareggi A. The pharmacokinetic profile of nimesulide in healthy volunteers. The pharmacokinetic profile of nimesulide in healthy volunteers. *Drugs*. 1993; 46 Suppl 1:64-72.

Bernareggi A. Clinical pharmacokinetics of nimesulide. *Clinical Pharmacokinetics*. 1998; 35(4):247-274.

Berti F, Rossoni G, Buschi A, Robuschi M, Villa LM. Antianaphylactic and antihistaminic activity of the non-steroidal antiinflammatory compound nimesulide in guinea-pig. *Arzneimittelforschung*. 1990; 40(9):1011-1016.

Bevilacqua M, Magni E. Recent contributions to knowledge of the mechanism of action of nimesulide. *Drugs*. 1993; 46 Suppl1:40-47.

Bevilacqua M, Vago T, Baldi G. Nimesulide decreases superoxide production by inhibiting phosphodiesterase type IV. *Eur J Pharmacol*. 1994; 268(3): 415-423.

Biscarini L, Patoia L, DelFavero A. Nimesulide: a new nonsteroidal anti-inflammatory agent. *Drugs Today*. 1988; 24:23-27.

Bohme P, Ericksson M, Paalzow L, Stintzing G, Zerihun G, Woldemariam T. Malnutrition and pharmacokinetics of penicilline in ethiopian children. *Pharmacol Toxicol*. 1995; 76(4):259-262.

Brandau P, Wehner HU. Losungsgeschwindigkeit und Bioverfügbarkeit von Phenytoin-Zubereitungen. *Arzneim. Forsch.* **1979**; 29:552.

Bree F, Nguyen P, Urien P, Albengres E, Macciocchi A, Tillement JP. Nimesulide Binding to components withing blood. *Drugs.* **1993**; 46 Suppl 1:83-90.

Brosen K. Recent developments in hepatic drug oxidation. Implications for clinical pharmacokinetics. *Clin Pharmacokinet.* **1990**; 18(3):220-239.

Campbell TC, Hayes JR. Role of nutrition in the drug metabolizing enzyme system. *Pharmacological Reviews.* **1974**; 26:171.

Casciarri I, Bernareggi A. Disposition of total radioactivity and plasma levels of nimesulide in rats after intravenous and oral administration. *Bochringer Mamheim Italia.* **1991**.

Castilla-Serna L, Ramírez-López E, Alva-González D, Serrano-Money F y Cravioto J. Efecto de la nutrición y ambiente sobre el metabolismo noradrenérgico en el sistema nervioso central. Rehabilitación nutricional y ambiental. *Bol Med Hosp Infant Méx.* **1988**; 45(9):555-564.

Castoldi D, Monzani V, Tofanetti O. Simultaneous determination of nimesulide and hidroxynimesulide in human plasma and urine by high-performance liquid chromatography. *J Chromatog.* **1988**; 425(2):413-418.

Chandra RK, Scrimshaw NS. Immunocompetence in nutritional assement. *Am J Clin Nutr.* **1980**; 33:2694.

Chang SF, Miller AM, Johnson JD, Ober RE, Miller H. Comparative absortion of R-805 formulations in man. *Academy of Pharm. Sciences, 19 th National Meeting Atlanta.* **1975**; 132.

Cooper, Mitchell, Rynbergen, Anderson, Dibble. *Nutrición y dieta*. 1970; Cap.16, décimoquinta edición. 239-263.

Cornaro G. A new nonsteroidal anti-inflammatory drug in the treatment of inflammations due to parodontal surgery. *Curr Ther Res*. 1983; 33(6) 982-989.

Cravioto J. Algunos aspectos del metabolismo protéico en niños crónicamente desnutridos. *Bol Med Hosp Infant* 1958; 15:823.

Crouthamel WG, New Areas of Research in: The effect of disease states on drug pharmacokinetics; Leslie Z. Bener (Ed). *Washington American Pharmacological Association and Academy of Pharmaceutical Sciences*. 1973; pp.1-12.

Diamond G. Single dose study using R805-14C. Standard dossier. *Helsinn Healthcare*. 1976; 181-210.

Forssell KA. Dose-dependent of sensory nerve activity in the feline dental pulp by anti-inflammatory drugs. *Acta Physiol. Scand*. 1978; 102:434-440.

Fusetti G, Magni E, Armandola MC. Tolerability of nimesulide. *Drugs*. 1993; 46 Suppl 1:277-280.

Gómez F, Ramos Galván R, Cravioto J, Frenk S, Janeway, Gamble JL. Intracellular composition and homeostatic mechanism in severe infant malnutrition. *Tissue Composition Pediatrics*. 1957; 20:105.

Gordillo G, Soto R, Metcoff J, López-Montaña E, García Antillón L. Intracellular composition and homeostatic mechanism in chronic severe infantile malnutrition. *Renal Adjustments. Pediatrics*. **1957**; 20:303.

Granados-Soto V, López-Muñoz FJ, Hong E, Flores-Murrieta FJ. Relationship between pharmacokinetics and the analgesic effect of ketorolac in the rat. *J Pharmacol Exp Ther*. **1995**; 272:352-356.

Grant TJ, Moore GGI, Swingle KF. Anti-inflammatory activity of 4-nitro-2-phenoxyethanesulfonamide (R-805). *Fed Proc*. **1975**; 34:759-764.

Karmeli F, Cohen P, Rachmilewitz D. Cyclo-oxygenase-2 inhibitors ameliorate the severity of experimental colitis in rats. *Eur J Gastroenterol Hepatol*. **2000**; 12(2):223-231.

Kitler ME. Clinical trials and transgenic pharmacology. *Drug saf*. **1994**; 11(5):378-391.

Kramer IM, vander Bend RL, Verhoeven AJ, Roos D. The 47 kD a protein involved in the NADPH:O<sub>2</sub> oxidoreductase activity of human neutrophils is phosphorylated by cyclic AMP-dependent protein kinase without induction of a respiratory burst. *Biochimica et Biophysica Acta*. **1988**; 971:189-196.

Krishnaswamy K, Ushasri V, Naidu NA. The effect of malnutrition on the pharmacokinetics of phenylbutazone. *Clin Pharmacokinet*. **1981**; 6(2):152-159.

Kumate J. Observaciones inmunológicas en niños con desnutrición avanzada. *Gac Med Méx*. **1976**; 1563.

Lares-Asseff I. Repercusiones de la desnutrición calórico-protéica grave sobre la biotransformación de fármacos. *Tesis de doctorado*, **1995**.

Lares-Asseff I, Cravioto J, Santiago P, Pérez B. A new dosing regimen for metronidazole in malnourished children. *Scan J Infect Dis.* **1993**; 25:115-121.

Lares-Asseff I, Flores-Pérez J, Juárez Olguín H, Ramírez-Lacayo M, Loredó-Abdalá. Carbajal-Rodríguez L. Influence of nutritional status on the pharmacokinetics of acetylsalicylic acid and its metabolites in children with autoimmune disease. *Am J Clin Nutr.* **1999**; 69:318-324.

Lares-Asseff I, Santiago P, Pérez-Ortíz B. Pharmacokinetic of metronidazole in severely malnourished and nutritionally rehabilitated children. *Clin Pharmacol Ther.* **1992**; 5(1):42-50.

Luean EA. Effects of protein-calorie malnutrition on drug metabolism in rat liver microsomes. *J Nutr.* **1973**; 103:811.

Mc Fortane IG y Von Holt. Metabolismo of leucine in protein-calorie deficient rats. *Biochem J.* **1969**; 111:565.

Montgomery RD. Magnesium metabolism in infantile protein malnutrition. *Lancet.* **1991**; 2:74.

Nelson KJ, Coulston AM, Sucher KP, Tseng RY. Prevalence of formulation in the elderly admitted to long-term-care facilities. *J Am Diet Assoc.* **1993**; 9(34):459-461.

Norma Oficial para estudios de bioequivalencia-biodisponibilidad. *Secretaría de Salud. Norma oficial Mexicana NOM-177-SSA-1998. Diario Oficial de la Federación. Tomo DXLVIII, No. 4, México, D.F., mayo 7 de 1999*; 44-67.

Ottonello L, Dapino P, Pastorino G. Nimesulide as downregulator of the activity of the neutrophil myeloperoxidase pathway. *Drugs.* **1993**; 46 supp 1:29-33.

Paniagua R, Santos AD, Muñoz R, Luengas J, Frenk S. Renal function in protein-energy malnutrition. *Pediatrics Res* **1980**; 14:1260

Pelletier JP, Martel-Pelletier J. Effects of nimesulide and naproxen on the degradation and metalloprotease synthesis of human osteoarthritic cartilage. *Drugs*. 1993; 46 suppl 1:34-39.

Perucca E. Drug interactions with nimesulide. *Drugs*. 1993; 46 Suppl 1:79-82.

Piel G, Pirotte B, Delneuve I, Neven P, Llabres G, Delarge J, Delattre L. Study of the influence of both cyclodextrins and L-lysine on the aqueous solubility of nimesulide isolation and characterization of nimesulide-L-lysine-ciclodextrin complexes. *J Pharmaceut Sci*. 1997; 86(4):475-479.

Prasad JS, Krishnaswamy K. Streptomycin pharmacokinetics in malnutrition. *Chemotherapy*. 1978; 24(6):333-337.

Pulkkinen MO. Alterations in intrauterine pressure menstrual fluid prostaglandin F levels, and pain in dysmenorrheic women treated with nimesulide. *J Clinical Pharmacol*. 1987; 27:65-69.

Pulkkinen MO, Vuento M, Macciocchi A. Distribution of oral nimesulide in female genital tissues. *Biopharm Drug Dispos*. 1991; 12(2):113-117.

Raghuram TC, Krishnawamy K. Tetracycline absorption in malnutrition. *Drug Nutr Interact*. 1981; 1(1):23-29.

Raghuram TC, Krishnawamy K. Pharmacokinetics of tetracycline in nutritional edema. *Chemotherapy*. 1982; 28(6):428-433.

Raj NS, Misra A, Guleria R, Pande JN. Theophylline clearance in undernourished asthma patients. *Indian J Chest Dis Allied Sci*. 1998; 40(3):175-178.

Ramos Galván R, Pérez Navarrete JL, Cravioto J. *Algunos aspectos de crecimiento y desarrollo en el niño mexicano. Bol Med Hosp Inf México. 1960; 17:455.*

Ramos Galván R. Desnutrición y crecimiento físico. *Bol Med Hosp Inf México. 1964; 21 Supl 1:11.*

Ramos Galván R. Crecimiento en la desnutrición. *Gac Méd México. 1967; 97:1527.*

Reiner M, Magni E. Efficacy and safety of nimesulide in the short-term treatment of rheumatoid arthritis. *Curr Ther Res. 1982; 31(6):906-912.*

Rondel RK, Eberhardt R, Koch J, Schurmann W. Treatment of primary essential dysmenorrhoea with nimesulide a double-blind cross over study. *Curr Ther Res. 1984; 35(1):123-129.*

Rowland M, Tozer TN. *Clinical Pharmacokinetics: Concepts and Applications, Second Edition, Ed Lea & Febiger, Philadelphia, London 1989.*

Schmike RT. Differential effects of fasting and protein-free diets on levels of urea cycle enzymes in rats liver. *J Biol Chem. 1962; 237:1921.*

Sebrell, W.H JR. Changing concept of malnutrition *Am J clin Nutr. 1967; 20(6):653-658.*

Shoba JC, Raghuram TC, Kumar AD, Krishnaswamy K. Antipyrine kinetics in under nourished diabetics. *Eur J Pharmacol. 1991; 41(4):359-361.*

Singla AK, Chawla M, Singh A. Nimesulide: some pharmaceutical and pharmacological aspects-an update. *J Pharm Pharmacol. 2000; 52(5):467-486.*

Swingle KF, Moore GGI, Grant TJ. 4-nitro-2-phenoxyethanesulfonamide (R-805): a chemically novel anti-inflammatory agent. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1976; 221:132-136.

Thomas JA. Drug-Nutrient Interactions. *Nutrition Reviews.* 1995; 53(10):271-282.

Torres-López JE, Robles MB, Pérez-Urizar J, Flores-Murrieta FJ, Granados-Soto V. Determination of diclofenac in microwhole blood samples by high-performance liquid chromatography with electrochemical detection. Application in a pharmacokinetic study. *Arzneimittelforschung.* 1997; 47(9):1040-1043.

Touw DJ. Clinical pharmacokinetics of antimicrobial drugs in cystic fibrosis. *Pharm World Sci.* 1998; 20(4):149-160.

Ugazio AG, Guarnaccia S, Berardi M, Renzetti I. Clinical and pharmacokinetic study of nimesulide in children. *Drugs.* 1993; 46 suppl 1:215-218.

Vighdahl RL, Tukey RH. Mechanism of action of novel anti-inflammatory drugs Diflumidone and R-805. *Biochem Pharmacol.* 1977; 26:307-311.

Vilageliu J. Nimesulide evaluation of protein binding and the effects of possible displacers (TSD No. 3545C) *Helsinn Healthcare.* 1983.

Viteri FE, Schneider RE. Gastrointestinal alteration in PCM. *Medical Clinical of North America,* 1974; 58:1487.

Walter-Sack I, Klotz U. Influence of diet and nutritional status on drug metabolism. *Clin Pharmacokinet.* 1996; 31(1):47-64.

Warrington SJ, Ravic M, Dawney A. Renal and general tolerability of repeated doses of nimesulide in normal subjects. *Drugs*. 1993; 46 Suppl 1:263-269.

Whitehead RG, Alleyne GAO. Pathophysiological factors of importance in protein-calorie malnutrition. *Clinical Science*. 1966; 39:400.

Yasuaki T, Kazuyuki Y, Keiichiro I. Inhibition of brain cyclooxygenase-2 activity and the antipyretic action of nimesulide. *Eur J Pharmacol*. 1997; 330:221-229.