



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS  
QUÍMICAS**

**EFFECTO DE LA DESNUTRICIÓN EN LA BIODISPONIBILIDAD Y  
FARMACOCINÉTICA DE AXETIL CEFUROXIMA EN RATAS JÓVENES**

TESIS  
PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
**DOCTOR EN CIENCIAS**

PRESENTA

Q. A. ILIANA ELVIRA GONZÁLEZ HERNÁNDEZ



TUTOR: DRA. ANGELA SOTELO LÓPEZ

AÑO:2008



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradezco especialmente a mi asesora, la Profesora Emérita Angela Sotelo López por haberme brindado su dedicación y tiempo para lograr mi formación profesional. Estoy profundamente agradecida por todas sus enseñanzas. Gracias por todo su apoyo.

A los miembros de mi comité tutorial integrado por la Dra. Helgi Jung Cook y el Dr. Héctor Bourges Rodríguez por las sugerencias y todo el apoyo brindado durante la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado por sus excelentes observaciones y comentarios durante la revisión de este manuscrito.

A la M. en C. Leticia Gil Vieyra (Departamento de Farmacia, Facultad de Química, UNAM) por su valiosa asesoría técnica y ayuda a lo largo del desarrollo del trabajo experimental.

A la Q. A. Sarah González (alumna de la Facultad de Química) por su colaboración en el estudio de los modelos de desnutrición.

Al CONACYT y a la DGEP por las becas otorgadas para la realización de mis estudios de posgrado.

A la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

Este trabajo se desarrolló en el Laboratorio 111 del Departamento de Farmacia, Conjunto E de la Facultad de Química de la UNAM.

Parte de este proyecto de investigación fue presentado en el 14 Congreso Latinoamericano de Nutrición Florianópolis, Brasil

Noviembre 2006

# ÍNDICE

	<b>Página</b>
<b>Resumen</b>	1
<b>Abstract</b>	3
<b>Introducción</b>	4
<b>1. Antecedentes</b>	5
1.1 Desnutrición energético proteínica	5
1.1.2 Clasificación de la DEP de acuerdo a las causas que la producen	5
1.1.3 Clasificación de la DEP de acuerdo a la gravedad	7
1.1.3.1 Clasificación de la DEP grave	8
1.1.4 Modificaciones metabólicas en la DEP	8
1.1.5 DEP grave: marasmo y kwashiorkor	14
1.1.5.1 Marasmo	16
1.1.5.2 Kwashiorkor	15
1.1.6 Desnutrición e infección	19
1.2 Proceso farmacocinético	21
1.2.1 Biodisponibilidad	22
1.2.2 Absorción	22
1.2.3 Distribución	23
1.2.4 Biotransformación	24
1.2.5 Excreción	24
1.3 Cefuroxima	25
1.3.1 Axetil cefuroxima	25
1.3.2 Acción farmacológica	26
1.3.3 Farmacocinética	27
<b>2. Hipótesis</b>	29
<b>3. Objetivos</b>	30
<b>4. Parte experimental</b>	32

4.1 Validación del método analítico para la cuantificación de cefuroxima en plasma de rata	33
4.1.1 Condiciones cromatográficas	33
4.1.2 Extracción de la cefuroxima a partir del plasma de rata	34
4.1.2.1 Preparación de la solución patrón de cefuroxima	34
4.1.2.2 Curva de calibración	34
4.1.2.3 Proceso de extracción	35
4.1.3 Validación del método analítico	35
4.1.3.1 Especificidad	35
4.1.3.2 Intervalo	36
4.1.3.3 Linealidad	36
4.1.3.4 Recuperación absoluta	36
4.1.3.5 Precisión	37
4.1.3.5.1 Repetibilidad	37
4.1.3.5.2 Reproducibilidad	37
4.1.3.6 Exactitud	37
4.1.3.7 Límite de cuantificación	37
4.1.3.8 Estabilidad	38
4.1.3.8.1 Condiciones de almacenamiento	38
4.1.3.8.2 Ciclos de congelación-descongelación	38
4.2 Primer estudio preliminar	39
4.3 Segundo estudio preliminar	43
4.4 Estudio final	45
4.4.1 Modelos de desnutrición	47
4.4.1.1 Animales	47
4.4.1.2 Caracterización de los modelos de desnutrición	48
4.4.1.2.1 Contenido total de proteínas plasmáticas por el método de biuret	48
4.4.1.2.2 Cuantificación del contenido de grasa en hígado por el método de Folch	51
4.4.1.2.3 Determinación de la actividad enzimática de las esterasas del intestino delgado	53

4.4.1.2.4	Cuantificación de proteína en hígado y mucosa intestinal por el método de Lowry	55
4.4.1.2.5	Estudio de microscopía electrónica de transmisión del intestino delgado	58
4.4.2	Estudios farmacocinéticos	58
4.4.2.1	Estudio I	58
4.4.2.2	Estudio II	59
4.4.2.3	Modelaje farmacocinético	59
4.4.3	Análisis estadístico	60
<b>5.</b>	<b>Resultados y discusión</b>	<b>61</b>
5.1	Validación del método analítico para la cuantificación de cefuroxima en plasma de rata	61
5.1.1	Especificidad	61
5.1.2	Intervalo	63
5.1.3	Linealidad	63
5.1.4	Recuperación absoluta	63
5.1.5	Precisión	63
5.1.5.1	Repetibilidad	63
5.1.5.2	Reproducibilidad	64
5.1.6	Exactitud	65
5.1.7	Límite de cuantificación	65
5.1.8	Estabilidad	65
5.2	Primer estudio preliminar	66
5.3	Segundo estudio preliminar	71
5.4	Estudio final	76
5.4.1	Evaluación de los modelos de desnutrición	77
5.4.1.2	Consumo de alimento	78
5.4.1.3	Indicadores bioquímicos: proteínas plasmáticas totales y grasa en hígado	81
5.4.1.4	Estudio de microscopía electrónica de transmisión del intestino delgado	84
5.4.1.5	Actividad de las esterasas del intestino delgado	86

5.4.2 Estudios farmacocinéticos	87
5.4.2.1 Estudio 1	87
5.4.2.2 Estudio 2	95
5.4.2.2.1 Peso corporal	95
5.4.2.2.2 Estudio farmacocinético	97
<b>6. Conclusiones</b>	102
<b>7. Perspectivas</b>	103
<b>Bibliografía</b>	104
<b>Apéndice. Artículo publicado</b>	

## ÍNDICE DE TABLAS

	<b>Página</b>
<b>Tabla No. 1.</b> Características de los tipos de desnutrición grave	15
<b>Tabla No. 2.</b> Composición de las dietas empleadas en el primer estudio preliminar	41
<b>Tabla No. 3.</b> Composición de las dietas empleadas en el segundo estudio preliminar	43
<b>Tabla No. 4.</b> Composición de las dietas empleadas en el estudio final	46
<b>Tabla No. 5.</b> Ingredientes empleados en la elaboración de las dietas	46
<b>Tabla No. 6.</b> Preparación de la curva patrón de albúmina	50
<b>Tabla No. 7.</b> Repetibilidad del método analítico	64
<b>Tabla No. 8.</b> Reproducibilidad del método analítico	64
<b>Tabla No. 9.</b> Exactitud del método analítico	65
<b>Tabla No. 10.</b> Estabilidad de la cefuroxima durante el almacenamiento	66
<b>Tabla No. 11.</b> Estabilidad de la cefuroxima durante los ciclos de congelación-descongelación	66
<b>Tabla No. 12.</b> Primer estudio preliminar. Peso corporal de los grupos T y K al inicio y al final del período de 28 días	68
<b>Tabla No. 13.</b> Primer estudio preliminar. Consumo de alimento, energía y proteína durante un período de 28 días	68
<b>Tabla No. 14.</b> Segundo estudio preliminar. Peso corporal inicial y final de los grupos T, M y K	72
<b>Tabla No. 15.</b> Segundo estudio preliminar. Consumo de alimento, proteína y energía durante un período de 21 días	73
<b>Tabla No. 16.</b> Peso corporal y ganancia en peso al final de la fase de desnutrición	78
<b>Tabla No. 17.</b> Consumo de alimento, energía y proteína durante la fase de desnutrición	79
<b>Tabla No. 18.</b> Indicadores bioquímicos	82
<b>Tabla No. 19.</b> Contenido de proteína y actividad específica de las esterasas de la fracción proximal del intestino delgado	86

<b>Tabla No. 20.</b> Estudio 1. Concentraciones plasmáticas de cefuroxima a diferentes tiempos	92
<b>Tabla No. 21.</b> Estudio 1. Parámetros farmacocinéticos de la cefuroxima	93
<b>Tabla No. 22.</b> Estudio 2. Concentraciones plasmáticas de cefuroxima después del período de recuperación de los grupos desnutridos	98
<b>Tabla No. 23.</b> Estudio 2. Parámetros farmacocinéticos de la cefuroxima después del período de recuperación de los grupos desnutridos	99

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>Figura No. 1.</b> Estructura química de la cefuroxima	25
<b>Figura No. 2.</b> Estructura química de la axetil cefuroxima	26
<b>Figura No. 3.</b> Diagrama general del proyecto de investigación	32
<b>Figura No. 4.</b> Cromatogramas representativos de blanco de plasma y plasma adicionado con cefuroxima	62
<b>Figura No. 5.</b> Primer estudio preliminar. Incremento en peso corporal durante un período de 28 días	67
<b>Figura No. 6.</b> Primer estudio preliminar. Perfil de concentraciones plasmáticas de cefuroxima en función del tiempo	70
<b>Figura No. 7.</b> Segundo estudio preliminar. Incremento en peso corporal durante un período de 21 días	72
<b>Figura No. 8.</b> Segundo estudio preliminar. Perfil de concentraciones plasmáticas en función del tiempo	75
<b>Figura No. 9.</b> Incremento en peso corporal de los grupos T, M y K	77
<b>Figura No. 10.</b> Imágenes de microscopía electrónica de transmisión del segmento proximal del intestino delgado	85
<b>Figura No. 11.</b> Estudio 1. Perfil farmacocinético de cefuroxima en plasma	90
<b>Figura No. 12.</b> Estudio 1. Perfil farmacocinético de cefuroxima en plasma de acuerdo con la dosis administrada por kg de peso corporal	92
<b>Figura No. 13.</b> Incremento en peso corporal durante la fase de recuperación de los grupos desnutridos	96
<b>Figura No. 14.</b> Estudio 2. Perfil farmacocinético de cefuroxima en plasma después del período de recuperación de los grupos desnutridos	97
<b>Figura No. 15.</b> Estudio 2. Perfil farmacocinético de cefuroxima en plasma de acuerdo con la dosis administrada por kg de peso corporal después del período de recuperación de los grupos desnutridos	98

## GLOSARIO

**Aminoácido limitante.** Es aquel aminoácido indispensable que esté en menor proporción respecto a la proteína de referencia para el grupo etáreo correspondiente. La proteína de referencia que se emplea actualmente es la establecida por el Comité de Expertos FAO/OMS/UNU en 1985.

**Depuración.** Volumen de plasma a partir del cual el fármaco es removido por unidad de tiempo.

**Edema.** Es el agrandamiento de órganos, piel u otras estructuras corporales causado por acumulación de líquido en el espacio tisular intercelular o intersticial y también en las cavidades del organismo. Dicha acumulación puede llevar a un aumento rápido de peso durante un período corto (de días a semanas).

**Eficiencia de conversión proteínica.** Capacidad que tiene una proteína de la dieta para generar proteína corporal.

**Emaciación.** manifestación aguda de desnutrición de corta duración, donde el peso para la edad y la estatura son bajos, pero la altura para la edad es normal.

**Esteatosis.** Acumulación anormal de grasa.

**Hepatomegalia.** Agrandamiento palpable del hígado, puede ser producido por la infiltración de grasa en este órgano.

**Kwashiorkor.** Una de las formas serias de la desnutrición energético proteínica. Se encuentra en niños que tienen una dieta por lo general baja en energía y proteína. A menudo los alimentos suministrados al niño poseen un alto contenido de hidratos de carbono.

**Marasmo.** Una de las formas de desnutrición energético proteínica grave en la que la principal carencia es de alimentos en general, y por lo tanto, de todos los nutrimentos y también de energía.

**Vida media de eliminación.** Tiempo para que se reduzca la concentración del fármaco en el plasma en un 50%.

**Volumen de distribución.** Cantidad de fármaco en el organismo dividida por la concentración en el plasma.

## ABREVIACIONES

**ABC:** área bajo la curva del perfil de concentraciones plasmáticas en función del tiempo.

**Cl/F:** depuración aparente.

**C<sub>máx</sub>:** concentración plasmática máxima del perfil de concentraciones plasmáticas en función del tiempo.

**DEP:** desnutrición energético proteínica.

**F:** biodisponibilidad relativa (área bajo la curva del fármaco en el grupo desnutrido/área bajo la curva del grupo testigo x 100).

**TMR:** tiempo medio de residencia.

**t<sub>1/2</sub>:** vida media de eliminación.

**V<sub>z</sub>/F:** volumen de distribución aparente.

**Resumen**

Se determinó la farmacocinética de la axetil cefuroxima en ratas desnutridas usando como modelos: 1) un grupo con dieta con restricción energética y de todos los nutrientes (grupo M), y 2) un grupo con dieta con proteína de baja eficiencia de conversión (grupo K). Los animales fueron alimentados durante un período de 21 días, después del cual se administró por vía oral una dosis de axetil cefuroxima equivalente a 2.2 mg de cefuroxima. A continuación se tomaron muestras de sangre a los tiempos 0, 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos; las muestras de plasma fueron analizadas usando un método analítico por HPLC. Asimismo se evaluaron algunos parámetros bioquímicos y se llevó a cabo un estudio de microscopía del intestino delgado. Después de un período de recuperación (21 días) de los grupos M y K, se llevó a cabo un segundo estudio farmacocinético.

En los animales desnutridos del grupo K los niveles de proteínas plasmáticas fueron bajos y la concentración de grasa en el hígado fue elevada. La biodisponibilidad relativa de la cefuroxima fue de 78.2% para el grupo M y de 64.4% para el grupo K. Ambos grupos desnutridos presentaron valores del área bajo la curva menores al del grupo testigo, lo que significa que la cantidad absorbida del antibiótico fue menor en los grupos M y K. En el segundo estudio farmacocinético se encontró que los parámetros farmacocinéticos del grupo M fueron similares a los del testigo, mientras que el grupo K a pesar de haber recibido una dieta de buena calidad mostró una biodisponibilidad relativa del antibiótico de 54.3%.

Este estudio permite concluir que la farmacocinética de la cefuroxima fue afectada por la desnutrición, sugiriendo que el proceso de absorción del antibiótico por medio de un transportador fue modificado en los grupos desnutridos, especialmente en el grupo alimentado con proteína de baja eficiencia de conversión.

**Abstract**

Pharmacokinetics of axetil cefuroxime in malnourished rats was determined using: 1) a diet with an energy and nutrient restriction (group M) and 2) a diet with a low efficiency conversion protein (group K). The rats were fed with the corresponding diet for 21 days, after which a single oral dose of cefuroxime axetil (equivalent to a 2.2 mg dose of cefuroxime) was administered and blood samples were taken at 0, 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes; samples were assayed using an HPLC assay. Biochemical parameters were measured and a microscopy study of the small intestine was carried out. After a 21 day period of recovery of the malnourished groups a second pharmacokinetic study was performed using the same sample times as those in the first study. In malnourished animals of group K the levels of plasma proteins were low and the concentrations of fat in the liver were high. The relative bioavailability of cefuroxime was 78.2% for group M and 64.4% for group K. Groups M and K presented lower values of area under the curve; this means that the amount of antibiotic absorbed was lower than that of the control group. In the second pharmacokinetic study although the animals received a good quality diet, it was observed that the area under the curve of group K was lower; the relative bioavailability was 54.3%, while group M had pharmacokinetic values similar to those of the control group.

It is concluded that the pharmacokinetics of cefuroxime was affected by malnutrition, suggesting that the absorption process via the transporter was modified in the malnourished groups, especially in the group fed with low quality protein.

**Introducción**

La desnutrición energético proteínica (DEP) en niños continúa siendo un problema de salud pública de algunos países en vías de desarrollo, principalmente en los estratos socioeconómicos bajos. La DEP severa se manifiesta bajo dos formas clínicas: el marasmo y el kwashiorkor; aunque hasta la fecha se desconocen los factores que pueden generar uno u otro tipo de desnutrición, se ha propuesto a la dieta como uno de los factores que podrían estar involucrados.

Los niños con DEP grave sufren diversos tipos de infecciones debido a que se producen alteraciones en la función inmunológica. Esto hace necesario el uso de antibióticos para el tratamiento del niño desnutrido; sin embargo, este estado patológico podría modificar la disposición de los fármacos en el organismo, por lo que es necesario evaluar los cambios farmacocinéticos generados por la desnutrición. La mayor parte de los estudios que se han realizado para evaluar el efecto de la DEP sobre la farmacocinética han empleado modelos animales en los que la desnutrición se produce por el suministro de cantidades restringidas de alimento o por el uso de alimentos con bajo contenido de proteína. Sin embargo, convendría contar con modelos animales de desnutrición empleando patrones de alimentación similares a los asociados a la desnutrición infantil grave.

En el presente trabajo se proponen dos modelos de desnutrición similares al marasmo y al kwashiorkor. Con estos modelos se propone evaluar la farmacocinética de la axetil cefuroxima, un antibiótico de uso frecuente en niños con el fin de valorar si existen modificaciones generadas por la desnutrición y al mismo tiempo evaluar si existen diferencias entre los dos modelos de desnutrición propuestos.

## **1. Antecedentes**

### **1.1 Desnutrición energético proteínica**

La desnutrición energético proteínica (DEP) es un estado patológico que surge como consecuencia de la incorporación deficiente de los nutrimentos a las células del organismo. Este estado patológico se desarrolla más fácilmente en los períodos de mayor requerimiento energético y nutrimental como la niñez, el embarazo y la lactancia, aunque la desnutrición en el medio social pobre de los países en vías de desarrollo es de tipo crónico y afecta principalmente a los niños menores de cinco años. La DEP es más frecuente en los lactantes y en los niños pequeños cuyo crecimiento incrementa los requerimientos nutrimentales; además, los niños no pueden obtener la comida por sus propios medios y, al vivir bajo condiciones poco higiénicas, pueden enfermar de diarrea y otras infecciones que pueden alterar el estado de nutrición. Los lactantes que son destetados prematuramente o que son alimentados al seno materno por períodos de tiempo prolongados sin la ingestión de alimentos complementarios pueden sufrir desnutrición debido a la falta o insuficiencia de proteína y energía (1-3).

#### **1.1.2 Clasificación de la DEP de acuerdo a las causas que la producen**

De acuerdo a las causas que la producen, la deficiencia de nutrimentos puede ser de tipo primario o de tipo secundario. La desnutrición primaria se debe a la ingestión insuficiente de alimentos (y por ende de nutrimentos), mientras que la desnutrición de tipo secundario surge como consecuencia de alguna enfermedad que altere los procesos de ingestión, digestión, absorción, utilización metabólica o excreción de los nutrimentos (como infecciones, anorexia nervosa, cáncer o SIDA, entre otras). Las formas más frecuentes de

desnutrición surgen de la combinación de un aporte de nutrimentos que no satisface las demandas con un mayor gasto energético y nutrimental (que puede ser consecuencia de las infecciones) (1,2).

La etiología de la DEP de tipo primario es sumamente compleja, pues se asocia con estratos socioeconómicos bajos, en los que es frecuente la falta de educación de los padres, lo que se relaciona con problemas en la obtención de los alimentos por el bajo poder adquisitivo y con malas prácticas higiénicas. Además, la ignorancia de los padres puede llevar a malas prácticas de alimentación, debido a conceptos erróneos acerca del uso de ciertos alimentos, a una alimentación inadecuada durante la enfermedad y a la distribución inapropiada de los alimentos dentro de la familia (3). Es común que en las zonas rurales las familias sean numerosas, de tal forma que un niño pequeño ve modificados sus patrones de alimentación con la llegada de un nuevo integrante a la familia. El abandono de la alimentación al seno materno conduce al uso de atoles elaborados con cereales para la alimentación de los niños. Estos atoles tienen un contenido bajo de lípidos y de proteína (la cual puede ser de baja eficiencia de conversión, es decir con deficiencia de uno o más aminoácidos indispensables); el aporte de hidratos de carbono suele ser adecuado o elevado, mientras que la fibra dietética se encuentra en cantidades importantes. Esto último resulta ser un problema, pues para cubrir los requerimientos energéticos y nutrimentales es necesaria la presencia de alimentos con suficiente densidad energética en la dieta del niño. La fibra dietética produce un efecto de saciedad por lo que el niño es incapaz de ingerir la cantidad de alimento necesaria para cubrir los requerimientos, y de esta manera la ingestión de proteína y de energía se vuelve insuficiente. Por otro lado, la ablactación (introducción de

alimentos diferentes a la leche materna) temprana o tardía (antes del segundo mes de vida o después del sexto) conduce a la alimentación del niño con cantidades insuficientes de alimentos que potencialmente podrían ser adecuados. Esto sucede, por ejemplo, cuando las fórmulas lácteas se diluyen más de lo debido, o cuando el niño es alimentado con cantidades insuficientes de leche materna. Este patrón de alimentación genera deficiencias energéticas y de todos los nutrimentos por lo que puede dar lugar a la desnutrición (1,3).

La DEP se desarrolla en períodos de semanas o meses, lo cual permite que se produzcan ajustes metabólicos y de comportamiento que resultan en disminución en las demandas nutrimentales y un equilibrio metabólico compatible con un menor nivel de disponibilidad de nutrimentos. Si el aporte de nutrimentos se vuelve persistentemente bajo, el individuo no se adapta más y muere (3).

### **1.1.3 Clasificación de la DEP de acuerdo a la gravedad**

La DEP también puede clasificarse de acuerdo con la intensidad de la deficiencia, y para ello se utilizan tres grados: leve, si la deficiencia es incipiente y sin riesgo de secuelas importantes; moderada, si el daño no es suficiente para comprometer la vida en forma inminente pero el riesgo de secuelas permanentes es alto; y grave, si la deficiencia pone en peligro la vida. Convencionalmente se asocian estos grados con ciertos intervalos de deficiencia de peso (2). En la actualidad, la clasificación de Gómez (4), uno de los pioneros de los estudios sobre desnutrición, sigue siendo sumamente útil para evaluar la gravedad de la desnutrición. En esta clasificación se denomina de primer grado (leve) a toda pérdida de peso que no pase del 25% del peso que el paciente debería tener para su edad; se llama desnutrición de segundo grado (moderada) cuando la pérdida de peso fluctúa entre el 25 y

el 40%, y finalmente se llama desnutrición de tercer grado (grave) a la pérdida de peso del organismo más allá del 40%.

#### **1.1.3.1 Clasificación de la DEP grave**

La desnutrición grave tiene dos manifestaciones clínicas características conocidas como marasmo y kwashiorkor. Aunque en ambos tipos de desnutrición existen deficiencias de energía y proteína (desnutrición energético proteínica), sólo se conocen algunas causas que pueden generar uno u otro tipo de desnutrición. Se han propuesto varios factores que podrían estar asociados con la aparición del marasmo o del kwashiorkor; uno de ellos es la dieta: mientras que el marasmo está relacionado con un consumo insuficiente de energía y de nutrimentos (que puede presentarse cuando se ingieren cantidades insuficientes de leche materna o de fórmulas lácteas), el kwashiorkor se asocia con una deficiencia proteínica. La deficiencia de proteína puede deberse tanto a la ingestión de cantidades insuficientes de ella, como a la ingestión de proteínas de baja eficiencia de conversión, lo cual las hace poco eficientes para generar proteína corporal. Las dietas asociadas al kwashiorkor son aquellas en las que predominan los cereales, pues éstos se caracterizan por tener un bajo contenido de proteína, la cual tiene como aminoácido limitante a la lisina, aunque el triptofano también está en baja proporción.

#### **1.1.4 Modificaciones metabólicas en la DEP**

Desde el punto de vista fisiopatológico, la desnutrición es un estado de adaptación para sobrevivir a dos agresiones sinérgicas (la carencia de nutrimentos y las frecuentes infecciones). El organismo modifica sus patrones biológicos de normalidad y crea nuevas condiciones homeostáticas, que en realidad son condiciones fisiopatológicas que

representan el costo de la sobrevivencia. A continuación se mencionan algunas de las modificaciones metabólicas que sufre el organismo desnutrido.

- **Metabolismo energético.** La disminución en el consumo de energía es seguida por una disminución en el gasto energético (por disminución de la actividad física y disminución de la masa metabólicamente activa, por ejemplo). Cuando la reducción del gasto energético no puede compensar la ingestión insuficiente, la grasa corporal se moviliza, con una disminución en la adiposidad y el peso.
- **Metabolismo de proteínas.** La poca disponibilidad de proteínas de la dieta reduce la síntesis de proteínas del organismo. La pérdida gradual e inevitable de proteínas corporales como resultado del déficit de proteína a largo plazo proviene del músculo esquelético. La vida media de algunas proteínas aumenta. La velocidad de síntesis de la albúmina disminuye inicialmente, y después de un período de latencia de pocos días, la velocidad de degradación disminuye y se incrementa su vida media. El paso de la albúmina extravascular hacia el espacio intravascular ayuda a mantener concentraciones adecuadas de albúmina en la circulación a pesar de la síntesis reducida. Cuando la reducción de la proteína se vuelve muy severa, los mecanismos de adaptación fallan, y la concentración de proteínas plasmáticas, especialmente de albúmina, disminuye. La reducción de la presión oncótica intravascular y el flujo de agua hacia el espacio extravascular contribuyen al desarrollo del edema en el kwashiorkor (5).
- **Aparato digestivo.** La mucosa intestinal responde en forma muy sensible a los cambios de la ingestión de alimentos: se atrofia cuando el suministro de alimentos

es escaso (6). En la DEP, el aparato digestivo se modifica tanto morfológica como funcionalmente; se presenta un retardo en el proceso de maduración de las células epiteliales del intestino, lo que con frecuencia genera alteraciones anatómicas como el acortamiento y a veces aplanamiento de las vellosidades de la mucosa intestinal. La atrofia de las células vellositarias afecta especialmente a los bordes en cepillo donde se encuentran diversas enzimas (disacaridasas, aminopeptidasas, fosfatasa alcalina). Se ha descrito que estos cambios se producen en mayor grado en el kwashiorkor que en el marasmo. Con respecto a la lactasa (una de las disacaridasas), la deficiencia de esta enzima resulta especialmente importante, pues es la encargada de la hidrólisis de la lactosa (principal hidrato de carbono en la leche); cuando la lactosa no se digiere, sigue su paso a través del intestino y es fermentada por la flora bacteriana generándose ácido láctico, el cual es capaz de irritar al tracto digestivo produciendo dolor abdominal y diarrea. Por esta razón, es necesario evaluar si un niño desnutrido presenta intolerancia a la lactosa con el fin de saber si la leche incluirse o no en la dieta. Además de las alteraciones antes mencionadas, se sabe que los niños desnutridos sufren retardo en el vaciamiento gástrico, pero a la vez se presenta un aumento en la velocidad del tránsito intestinal. Asimismo se ha encontrado disminución en la secreción de las enzimas digestivas en el estómago, disminución en la producción de ácido clorhídrico y en la secreción pancreática y biliar, alteraciones que también disminuyen las funciones de absorción. Aunado a esto, el tracto digestivo se sobrecoloniza con diferentes tipos de bacterias y parásitos (1). En la deficiencia severa de proteína ocurren alteraciones en la absorción

intestinal de lípidos y disacáridos, así como disminución en la velocidad de absorción de glucosa (3).

- **Compartimiento acuoso.** En la desnutrición se presenta un incremento significativo del agua corporal. La dilución constituye uno de los signos universales de la desnutrición, aunque sólo los niños con kwashiorkor exhiban edema (1). El metabolismo energético se halla en íntima relación con la economía del agua y de las sales disueltas en ella. Ello explica que en la DEP grave (principalmente en el kwashiorkor) a medida que el mal avanza, el agua total del cuerpo aumente a expensas de tejidos metabólicamente activos (como grasa, músculo, vísceras y hueso) conforme son consumidos o se reduce su formación. Por lo anterior, uno de los signos universales que caracteriza a todas las formas clínicas de la DEP grave es el exceso de agua en los tejidos, tanto la que se encuentra en el exterior como la que se halla en el interior de las células. Como consecuencia se diluyen los componentes orgánicos e inorgánicos, lo que a su vez da lugar a complejos ajustes metabólicos para mantener las funciones vitales del organismo (7).
- **Cambios endocrinos.** Las hormonas son importantes en los procesos metabólicos de adaptación, ya que contribuyen al mantenimiento de la homeostasis energética a través del aumento en la glucólisis y la lipólisis, la mayor movilización de aminoácidos, y la preservación de las proteínas viscerales a través del aumento de la degradación de las proteínas musculares, además de la disminución en el almacén de glucógeno, lípidos y proteínas, y la reducción del metabolismo energético (3). Debido a la necesidad de mantener la homeostasis de energía, aumentan las

concentraciones plasmáticas de cortisol y de hormona adrenocorticotrófica, lo que promueve la gluconeogénesis y la movilización de ácidos grasos. La corteza suprarrenal es la glándula responsable de gran parte de los procesos de adaptación del organismo, tanto para responder a las agresiones que se generan dentro de él como a las que provienen del medio externo. Su respuesta, reflejada en un aumento de la secreción de cortisol, suele ser adecuada en la mayor parte de los pacientes con desnutrición avanzada de tipo kwashiorkor. En cambio, sólo la mitad de los niños con marasmo responde de esta manera. Precisamente son los niños con marasmo los más susceptibles a episodios graves de hipoglucemia, quizás por su imposibilidad de responder de manera adecuada a las agresiones. Si bien se considera al marasmo como la forma más adecuada de adaptarse a la desnutrición grave, no parece serlo ante las infecciones. Este mecanismo de adaptación al estrés ocurre a costa de una depresión de la capacidad de los mecanismos de inmunidad, en particular de la inmunidad mediada por células. En efecto, en la DEP grave se presenta un síndrome de inmunodeficiencia adquirida, que a diferencia del de origen viral, es potencialmente reversible. Las hormonas córticosuprarrenales regulan el recambio energético. En la DEP a menudo es deficiente la asimilación o utilización de la glucosa por los tejidos. La tasa de asimilación de la glucosa aumenta en forma gradual a medida que ocurre la recuperación nutricia, pero cualquier episodio infeccioso intercurrente (como sarampión o un episodio de diarrea aguda) deteriora de nueva cuenta la utilización de glucosa por los tejidos. El factor que influye de modo predominante en el metabolismo (no sólo de los hidratos de carbono sino

también de los lípidos y los aminoácidos) es la tasa de secreción de la insulina. Habitualmente, a medida que empeora la condición nutricia se reduce la concentración de insulina en el plasma sanguíneo (7). En tanto, la necesidad de disminuir el gasto energético ante la falta de nutrimentos y el agotamiento de las reservas, lleva a la disminución de la hormona tiroidea triyodotironina, por lo cual la DEP se acompaña de cierto grado de hipotiroidismo (1).

- Hígado. Desde la descripción de Williams (1935) se aceptó que el hígado graso es una característica importante del kwashiorkor. Mediante biopsias hepáticas se ha documentado que existe disminución en el contenido de glucógeno e infiltración grasa en los hepatocitos. Esta última se ha observado en niños con kwashiorkor, no así en los casos de marasmo; es posible que los niños marasmáticos no tengan hígado graso porque sus depósitos de grasa están vacíos. El contenido de proteína total del hígado está reducido en niños con kwashiorkor, aunque en menor grado que la reducción observada en los niños con marasmo. Es probable que esto obedezca a la disminución en la síntesis proteínica debida al insuficiente aporte de aminoácidos indispensables (1,6).
- Sistema inmunológico. La letalidad de las infecciones es mayor en los desnutridos. El aparato inmunocompetente de los niños desnutridos se encuentra seriamente afectado, ya que se modifican las barreras anatómicas de defensa primaria (piel y mucosas), lo que permite que ciertos microorganismos patógenos penetren en el huésped y lo sobrecolonizen. Asimismo, la inmunidad mediada por células se encuentra seriamente trastornada, pues pueden presentarse alteraciones asociadas no

sólo con deficiencia energética y proteínica, sino también con deficiencia específica de algunos nutrimentos, como la vitamina A (que podría afectar la inmunidad mediada por células), las de vitaminas C y E (que podrían modificar la immunoestimulación) y la del ácido fólico (que podría trastornar la síntesis de nucleótidos o la de ácidos grasos n-3, necesarios para la regulación de la respuesta inflamatoria). Esta situación también se ha asociado con la deficiencia de hierro y zinc, que tienen efecto sobre la fagocitosis (1). Los mayores defectos encontrados en la DEP severa parecen involucrar a los linfocitos T y al sistema complementario. La fagocitosis, la quimiotaxis y la función intracelular también se encuentran alteradas, además de que al parecer existen defectos en la producción de los anticuerpos. Las consecuencias de estas alteraciones en la DEP severa son una mayor predisposición a infecciones. Los defectos en las funciones inmunes desaparecen con la rehabilitación nutricia, excepto tal vez los debidos a desnutrición intrauterina (3).

#### **1.1.5 DEP grave: marasmo y kwashiorkor**

Los pacientes cuya DEP se desarrolla lentamente (como sucede frecuentemente en el marasmo) están mejor adaptados al estado de nutrición actual y mantienen un equilibrio metabólico menos frágil que aquellos con el desarrollo agudo de la DEP, como el kwashiorkor. En la Tabla No. 1 se describen brevemente las características de ambos tipos de desnutrición severa.

**Tabla No. 1** Características de los tipos de desnutrición grave

	Marasmo	Kwashiorkor
Inicio	Vida intrauterina a primer año de edad	A partir del segundo año de edad
Se asocia con	Destete temprano Uso inapropiado de fórmulas lácteas Ablactación antes del cuarto mes	Destete tardío Ablactación después del sexto mes
Evolución	Crónica	Aguda
Enfermedades	Frecuentes, principalmente gastrointestinales y respiratorias	Menos frecuentes. Aparece después de un episodio agudo de enfermedad
Apariencia	Emaciado	Edematoso
Conducta	Irritable, llora mucho	Apático, triste
Tejido muscular	Muy disminuido	Disminuido
Tejido graso	Muy disminuido	Presente, escaso
Hígado	Tamaño normal	Aumentado (esteatosis)
Edema	Ausente	Presente
Piel	Seca, plegadiza, sin dermatosis	Lesiones húmedas, con dermatosis
Complicaciones	Casi siempre presencia de infecciones y alteraciones electrolíticas y ácido básicas	Casi siempre presencia de infecciones y alteraciones electrolíticas y ácido básicas
Hemoglobina	Baja	Baja
Proteínas plasmáticas	Casi normales	Bajas
Recuperación	Prolongada (meses)	Breve (semanas)

Además de las modificaciones generadas por la desnutrición, existen ciertas características bioquímicas e histopatológicas de la DEP severa (3):

- Las concentraciones plasmáticas de proteínas totales y especialmente de albúmina están marcadamente reducidas en la DEP edematosa (kwashiorkor), y son normales o moderadamente bajas en el marasmo.
- La hemoglobina y el hematocrito están generalmente bajos, en mayor proporción en el kwashiorkor que en el marasmo.
- La proporción de aminoácidos dispensables con respecto a los aminoácidos indispensables en el plasma es elevada en el kwashiorkor y normal en el marasmo.

- Las concentraciones de ácidos grasos libres en el suero están elevadas, principalmente en el kwashiorkor.
- Las concentraciones de glucosa son normales o bajas después de un ayuno de 6 ó más horas.

#### **1.1.5.1 Marasmo**

El marasmo se diagnostica cuando se pierden la grasa subcutánea y el músculo debido a la movilización endógena de la energía disponible (8). En el marasmo hay una atrofia generalizada del músculo esquelético y la reducción muscular generalizada así como la ausencia de grasa subcutánea dan a los pacientes con DEP severa no edematosa una apariencia de “piel pegada a los huesos”. Los pacientes con marasmo tienen frecuentemente 60% o menos del peso esperado para la edad. El cabello es delgado y seco al igual que la piel. Los pacientes son apáticos pero generalmente tienen una apariencia ansiosa (3).

#### **1.1.5.2 Kwashiorkor**

Cuando hay falta severa de alimentos, los ajustes endocrinos movilizan a los ácidos grasos del tejido adiposo y a los aminoácidos del tejido muscular; la concentración de proteínas plasmáticas permanece normal, y la gluconeogénesis hepática aumenta. Un aumento en la ingestión de hidratos de carbono cuando la ingestión de proteína es muy baja puede producir el rompimiento de dichos ajustes (3):

- La ingestión de hidratos de carbono induce la liberación de insulina y la reducción en la producción de epinefrina y cortisol.

- Disminuye la lipólisis, lo que reduce los efectos inhibitorios de los ácidos grasos libres en la acción periférica de la insulina, y por lo tanto, la acción de la insulina aumenta.
- La degradación de las proteínas musculares se reduce y los aminoácidos libres disminuyen; la disminución en la movilización de aminoácidos musculares hacia otros órganos resulta en menor síntesis de proteínas viscerales.
- La disminución en la síntesis de proteínas plasmáticas en el hígado, particularmente de albúmina, reduce la presión oncótica intravascular. El agua plasmática disminuye y se acumula en los tejidos extravasculares, la presión tisular aumenta, y la función cardíaca disminuye. Esto contribuye a la aparición del edema.
- El aumento en la síntesis hepática de ácidos grasos a partir del exceso de hidratos de carbono, la alteración de la lipólisis y la reducción en la producción de apo- $\beta$ -lipoproteínas para el transporte de lípidos da lugar a la infiltración de grasa en el hígado y hepatomegalia.

Las infecciones en los niños desnutridos también pueden precipitar la aparición del kwashiorkor. La explicación a este hecho no ha sido satisfactoria, pero los siguientes mecanismos podrían estar involucrados (3):

- Las infecciones podrían dirigir a los aminoácidos hacia la producción de globulinas y proteínas de fase aguda en lugar de proteínas como la albúmina o las transportadoras.

- El aumento en las proteínas de fase aguda que son inhibidoras de las proteinasas como la  $\alpha_1$ -antitripsina y  $\alpha_1$ -antiquimotripsina, podría alterar la degradación de proteínas musculares.
- La alteración en la producción y el uso de cuerpos cetónicos para obtener energía durante las infecciones podría dar lugar al uso de más aminoácidos para la gluconeogénesis.
- El catabolismo proteínico y las pérdidas de nitrógeno aumentan por infecciones virales y febriles; las pérdidas de proteína en infecciones severas pueden representar 2% de proteínas musculares por día.
- La estimulación de los leucocitos por organismos infecciosos produce grandes cantidades de superóxido y de peróxido de hidrógeno, que se liberan al medio y contribuyen a la producción de kwashiorkor, de acuerdo a la teoría de los radicales libres.

La patogénesis del edema en la DEP severa ha provocado mucha discusión debido al papel que juega en el diagnóstico del kwashiorkor. El edema en el kwashiorkor ha sido asociado de manera clásica a la hipolabuminemia. Sin embargo, algunos estudios han sugerido que la hipoalbuminemia puede ser necesaria pero no suficiente para producir el edema. Otros factores que podrían estar involucrados son: deficiencia de potasio, que promueve la retención de agua y sodio, o la excesiva administración de agua y sodio. Muy posiblemente la aparición del edema en la DEP es multifactorial y difiere dependiendo de múltiples deficiencias nutrimentales, edad del paciente, y otros factores concomitantes (3). El edema en el kwashiorkor se presenta generalmente en los pies, piernas, y puede extenderse al

peritoneo, las extremidades superiores y la cara en casos severos. La grasa subcutánea se preserva, y puede haber emaciación de los músculos. El déficit en el peso corporal (considerando el edema) generalmente no es tan severo como en el marasmo. La hepatomegalia suele estar presente, y es causada por la infiltración severa de grasa en el hígado.

### **1.1.6 Desnutrición e infección**

Debido a las modificaciones sufridas por los niños desnutridos en cuanto a la inmunocompetencia y a las malas condiciones de higiene en las que viven, existe una relación estrecha entre la desnutrición y las infecciones. Los estudios epidemiológicos muestran que la generación de la desnutrición infantil además de asociarse con un balance negativo de energía y nutrimentos, también se debe a un complejo círculo vicioso de infecciones virales, bacterianas y parasitosis, desequilibrio nutrimental, incremento en el gasto energético, disminución de la resistencia inmunológica, mal manejo de las infecciones, vómito y anorexia, lo cual frecuentemente conduce a un estado de desnutrición que, a su vez, favorece la presencia de episodios infecciosos más frecuentes y de mayor duración y gravedad en medios ambientes insalubres (9). En diversos estudios se ha demostrado que la desnutrición disminuye la capacidad de defensa del organismo, por lo que un niño desnutrido es propenso a sufrir diversos tipos de infecciones, las cuales suelen ser más graves que en un niño con un estado de nutrición bueno. A su vez, las infecciones empeoran el estado de nutrición, pues por un lado producen anorexia, que es un síntoma clásico de la infección en niños. El consumo de energía puede reducirse en alrededor de 20%. Además, la infección puede incrementar los requerimientos energéticos, pues la fiebre

produce un aumento en el gasto energético basal; en sujetos bien nutridos el gasto energético aumenta en 10 a 15% por cada grado centígrado que aumente la temperatura corporal. Finalmente, una infección también puede aumentar las pérdidas de varios nutrimentos. Desde hace tiempo se sabe que la infección produce un balance negativo de nitrógeno, efecto debido al aumento de la degradación de las proteínas, que probablemente afecta sobre todo al músculo. Además, también pueden aumentar las pérdidas de nutrimentos cuando hay presencia de vómito o diarrea; ésta última se asocia con la pérdida de nutrimentos endógenos como los aminoácidos, además de que se relaciona con alteraciones en la absorción de nutrimentos como la vitamina A, el hierro y el zinc (6). Todas estas modificaciones empeoran el estado de nutrición, que a su vez deja al organismo más propenso para sufrir infecciones que pueden agravarse fácilmente y empeorar aún más el estado de nutrición del individuo; este ciclo de retroalimentación entre la desnutrición y la infección es conocido como el ciclo infección-desnutrición-infección.

De esta forma, los pacientes desnutridos son particularmente susceptibles a las infecciones, las cuales son frecuentemente la causa inmediata de muerte en DEP severa. Paradójicamente, las manifestaciones clínicas pueden ser ligeras, y los signos clásicos de fiebre, taquicardia y leucocitosis pueden estar ausentes (3).

Cuando un niño con desnutrición grave es admitido en un hospital, es necesario iniciar con el tratamiento de las alteraciones hidroelectrolíticas (que son comunes por las diarreas) y de las infecciones. De éstas últimas las más frecuentes son las infecciones respiratorias y las de los tractos digestivo y urinario, por lo que se hace necesario el uso de antibióticos. La Organización Mundial de la Salud ha recomendado la administración parenteral de

ampicilina y gentamicina como tratamiento para las infecciones asociadas con la desnutrición; la elección de estos antibióticos responde a razones económicas, pues son antibióticos de bajo costo y gran disponibilidad en países en vías de desarrollo (10). Desafortunadamente, se ha encontrado que muchos de los microorganismos causantes de las infecciones en los niños desnutridos son resistentes a estos antibióticos, por lo que en algunas ocasiones se requiere de otro tipo de fármacos para lograr la recuperación del niño (11). Los médicos debe ser cuidadosos con respecto al metabolismo de los fármacos, ya que este puede estar alterado, y los mecanismos de detoxificación pueden estar comprometidos en la DEP severa como resultado de una absorción más lenta, permeabilidad intestinal anormal, reducción en la fracción del fármaco unido a proteínas, cambios en el volumen de distribución, conjugación u oxidación en el hígado disminuidas, y depuración renal disminuida. Por ejemplo, en niños desnutridos la vida media del cloranfenicol, la sulfadiazina y la gentamicina se incrementan, y la depuración aumenta (3, 12).

Además, es necesario considerar que la desnutrición puede modificar cualquiera de las etapas del proceso farmacocinético, por lo que es necesario evaluar el efecto que la desnutrición puede tener en dicho proceso.

### **1.2 Proceso farmacocinético**

El proceso farmacocinético está conformado por las siguientes etapas: absorción, distribución, metabolismo y excreción. Cualquiera de estos procesos puede modificar las concentraciones del fármaco en el organismo, por lo que son capaces de modificar la respuesta farmacológica. Por lo anterior, es importante considerar el papel que pueden jugar

la dieta y el estado de nutrición en la acción de los fármacos, ya que pueden modificarla en diferentes grados.

### **1.2.1 Biodisponibilidad**

El término biodisponibilidad se usa para indicar la proporción de fármaco administrado que alcanza la circulación sistémica después de la administración por vía oral. El estado de nutrición puede modificar la biodisponibilidad de un fármaco, la cual depende directamente del grado de absorción y distribución, e indirectamente del metabolismo y la excreción del mismo (13).

### **1.2.2 Absorción**

La absorción se define como el paso del fármaco desde el sitio de administración hacia el plasma, por lo que es importante para todas las rutas de administración excepto para la intravenosa. Para fármacos que son administrados por vía oral, la absorción puede ser un factor determinante para la biodisponibilidad, pues puede alterar la entrada del fármaco al organismo. La absorción generalmente se lleva a cabo en el intestino delgado, ya que la disposición de éste lo hace apto para este proceso, pues el área superficial disponible para la absorción es muy alta gracias a las microvellosidades. Existen diversos tipos de transporte que permiten la entrada de los agentes xenobióticos al organismo: la difusión pasiva es una forma de transporte a través del cual los solutos pueden atravesar la bicapa lipídica de las membranas sin la necesidad de energía; para que se lleve a cabo este proceso es necesario que exista un gradiente de concentración del soluto. Otro tipo de transporte involucra la participación de proteínas transportadoras o acarreadoras que pueden unirse a una o más moléculas o iones y al cambiar de conformación, estas proteínas pueden liberar los solutos

hacia el otro lado de la membrana. Este sistema puede operar de forma pasiva (sin la necesidad de energía), y se conoce como difusión facilitada, o puede estar acoplado a un gradiente electroquímico de  $\text{Na}^+$  y requerir energía por lo que puede ir en contra de un gradiente de concentración; en este caso el transporte es conocido como transporte activo (14). En la desnutrición grave, principalmente en el kwashiorkor, la mucosa intestinal se atrofia, pues las microvellosidades disminuyen en número y también se acortan, por lo que se reduce la superficie disponible para la absorción. Sin embargo, también puede aumentar la permeabilidad, lo que facilita el paso de diversas sustancias hacia el organismo; esto podría ser perjudicial, pues haría posible que sustancias potencialmente tóxicas para el individuo entraran más fácilmente al organismo; por ejemplo, Brewster et. al encontraron permeabilidad anormal en niños con kwashiorkor (15). Finalmente, al existir deficiencia de proteínas en la dieta, se presenta la disminución de algunas proteínas transportadoras o acarreadoras, lo que a su vez podría alterar la absorción de solutos que requieren de este mecanismo de transporte.

### **1.2.3 Distribución**

Una vez absorbido, un fármaco tiene que ser transportado en el organismo para alcanzar el sitio de acción; este proceso se conoce como distribución. Con respecto a este proceso farmacocinético, es necesario mencionar que para que un compuesto sea farmacológicamente activo, debe encontrarse en su forma libre; sin embargo, hay fármacos que se unen de forma reversible a proteínas plasmáticas, principalmente a albúmina, y de esta manera pueden ser transportados en el organismo. La cantidad de fármaco unido a las proteínas depende de tres factores: la concentración de fármaco libre, su afinidad con los

sitios de unión y la concentración de la proteína. Se ha encontrado que la desnutrición puede disminuir la cantidad de albúmina, lo que puede resultar en un aumento en la cantidad de fármaco libre (13, 14).

#### **1.2.4 Biotransformación**

Para un gran número de fármacos, su eficiencia, permanencia en el organismo y la duración de sus efectos depende de su biotransformación. Los factores genéticos y ambientales contribuyen a un gran número de variaciones inter e intraindividuales en este proceso. La actividad de las enzimas encargadas del metabolismo de los fármacos puede influir en la intensidad y duración de la acción de los fármacos, por lo que factores ambientales como la dieta y el estado de nutrición deben ser considerados en la farmacoterapia. A este respecto se han estudiado de manera extensa las modificaciones en la actividad del citocromo P450 en el hígado, encontrándose que ésta disminuye a medida que se reduce el contenido de proteína en la dieta, de forma que disminuye la biotransformación de fármacos que son metabolizados por este sistema. Al disminuir el metabolismo de primer paso es posible aumentar la cantidad de fármaco activo en el organismo (13, 16-20).

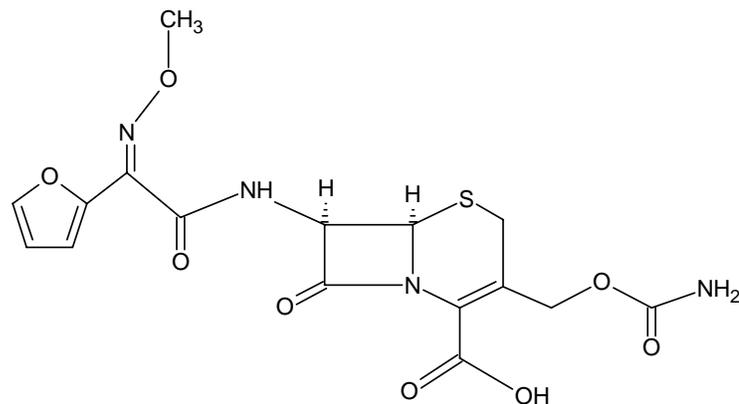
#### **1.2.5 Excreción**

La depuración de los fármacos se lleva a cabo principalmente a través del hígado y los riñones. La excreción de los metabolitos y del fármaco inalterado en la orina constituye la principal ruta de eliminación. La dieta puede afectar la excreción de los fármacos por alteración de la depuración por el órgano de excreción o por alteración del volumen de distribución. La depuración a su vez depende de la cantidad de fármaco liberado al órgano de excreción y el grado en el que es extraído de la sangre para ser excretado. De esta

manera, al aumentar la cantidad de fármaco libre (cuando disminuye la albúmina, por ejemplo) aumentará la velocidad de su excreción (13).

### 1.3 Cefuroxima

Entre los antibióticos empleados de manera frecuente en niños para el tratamiento de las infecciones de origen bacteriano se encuentra la cefuroxima. La cefuroxima es una cefalosporina de segunda generación, que puede ser administrada por vía parenteral como cefuroxima de sodio; la estructura química de la molécula de la cefuroxima se presenta en la Figura No. 1.



**Figura No. 1** Estructura química de la cefuroxima.

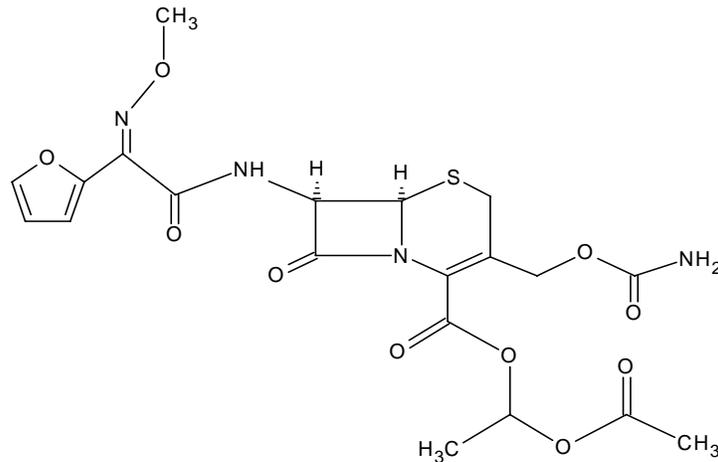
Fórmula molecular:  $C_{16}H_{16}N_4O_8S$

Peso molecular: 424.4

#### 1.3.1 Axetil cefuroxima

La cefuroxima no se absorbe cuando se administra por vía oral; sin embargo, cuando el sodio es sustituido por el éster 1-acetiloxietil en la molécula de cefuroxima, se incrementa la solubilidad en lípidos y aumenta la absorción gastrointestinal (21). El profármaco

acetiloxietil cefuroxima (conocido como axetil cefuroxima) se desesterifica en la sangre o en el hígado, de tal forma que sólo la cefuroxima circula de manera sistémica. La estructura química de la axetil cefuroxima se presenta en la Figura No. 2



**Figura No. 2.** Estructura química de la axetil cefuroxima

Las esterases presentes en la mucosa intestinal pueden hidrolizar a la axetil cefuroxima a la forma no absorbible (cefuroxima), lo que se piensa puede ser una posible causa de la biodisponibilidad incompleta del fármaco, pues sólo de 37 a 52% de la dosis oral alcanza la circulación sistémica como cefuroxima (22).

### 1.3.2 Acción farmacológica

La axetil cefuroxima tiene un espectro antibacterial contra muchos organismos gram positivos y gram negativos. La estabilidad de este antibiótico frente a la beta lactamasa lo hace útil en el tratamiento de muchas infecciones producidas por colonias de organismos productores de  $\beta$  lactamasa como *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis* y *Staphylococcus aureus*. Una ventaja de la cefuroxima sobre otras cefalosporinas de segunda

generación es que es efectiva en el tratamiento de *Neisseria gonorrhoea* y *H. influenzae*. Se caracteriza por ser la única cefalosporina de segunda generación que penetra adecuadamente en el fluido cerebrospinal. Este fármaco actúa inhibiendo la síntesis de la pared bacteriana, lo que resulta en la formación de una pared celular defectuosa que es osmóticamente inestable. Este medicamento es indicado en el tratamiento de gonorrea, infecciones del tracto respiratorio, infecciones del tracto urinario, infecciones pediátricas, profilaxis preoperatorias, meningitis, infecciones de la piel y septicemia (21).

### **1.3.3 Farmacocinética**

Aproximadamente de 33 a 50% de la cefuroxima en la circulación se une a proteínas, y se distribuye a través de la mayor parte de los tejidos y fluidos incluyendo la vesícula biliar, hígado, riñón, huesos, útero, ovarios, bilis y los fluidos peritoneal, pleural y sinovial. La vida media de la cefuroxima es de 1 a 2 horas. En un trabajo reciente se demostró que el proceso de absorción del profármaco (axetil cefuroxima) se produce a lo largo del intestino delgado, es saturable y puede ser descrito por una cinética de Michaelis-Menten. Es posible que la absorción sea mediada por un transportador, al que pueden ser atribuirse las variaciones en la biodisponibilidad incompleta de la forma oral del profármaco (23-25). Mylotte y Weislo realizaron un estudio comunitario en el que demostraron que la axetil cefuroxima es útil para el tratamiento de neumonía en niños considerando el tiempo requerido para el tratamiento, así como el costo del mismo (26). De esta forma, la axetil cefuroxima podría ser usada para el tratamiento de infecciones asociadas con la desnutrición en niños. Sin embargo, se requiere de estudios que evalúen si existen

modificaciones en la farmacocinética de éste antibiótico para asegurar el efecto terapéutico y al mismo tiempo evitar efectos tóxicos.

## **2. Hipótesis**

Si la desnutrición energético proteínica produce modificaciones en el organismo y en el metabolismo, entonces la farmacocinética y biodisponibilidad de la axetil cefuroxima será diferente en ratas recién destetadas con un buen estado de nutrición y ratas recién destetadas con desnutrición energético proteínica causada por un bajo consumo de nutrimentos y energía (tipo marasmo) o por consumo de proteínas de baja eficiencia de conversión (tipo kwashiorkor). Asimismo, si las modificaciones producidas por la desnutrición son distintas dependiendo de las deficiencias energéticas y nutrimentales, entonces habrá diferencia en la farmacocinética y biodisponibilidad de la axetil cefuroxima entre los dos modelos de desnutrición.

### **3. Objetivo general**

Evaluar si la desnutrición causada por bajo consumo de energía y nutrientes (tipo marasmo) y por consumo de proteínas de baja eficiencia de conversión y alto consumo de hidratos de carbono (tipo kwashiorkor) afectan la biodisponibilidad y farmacocinética de la cefuroxima administrada por vía oral.

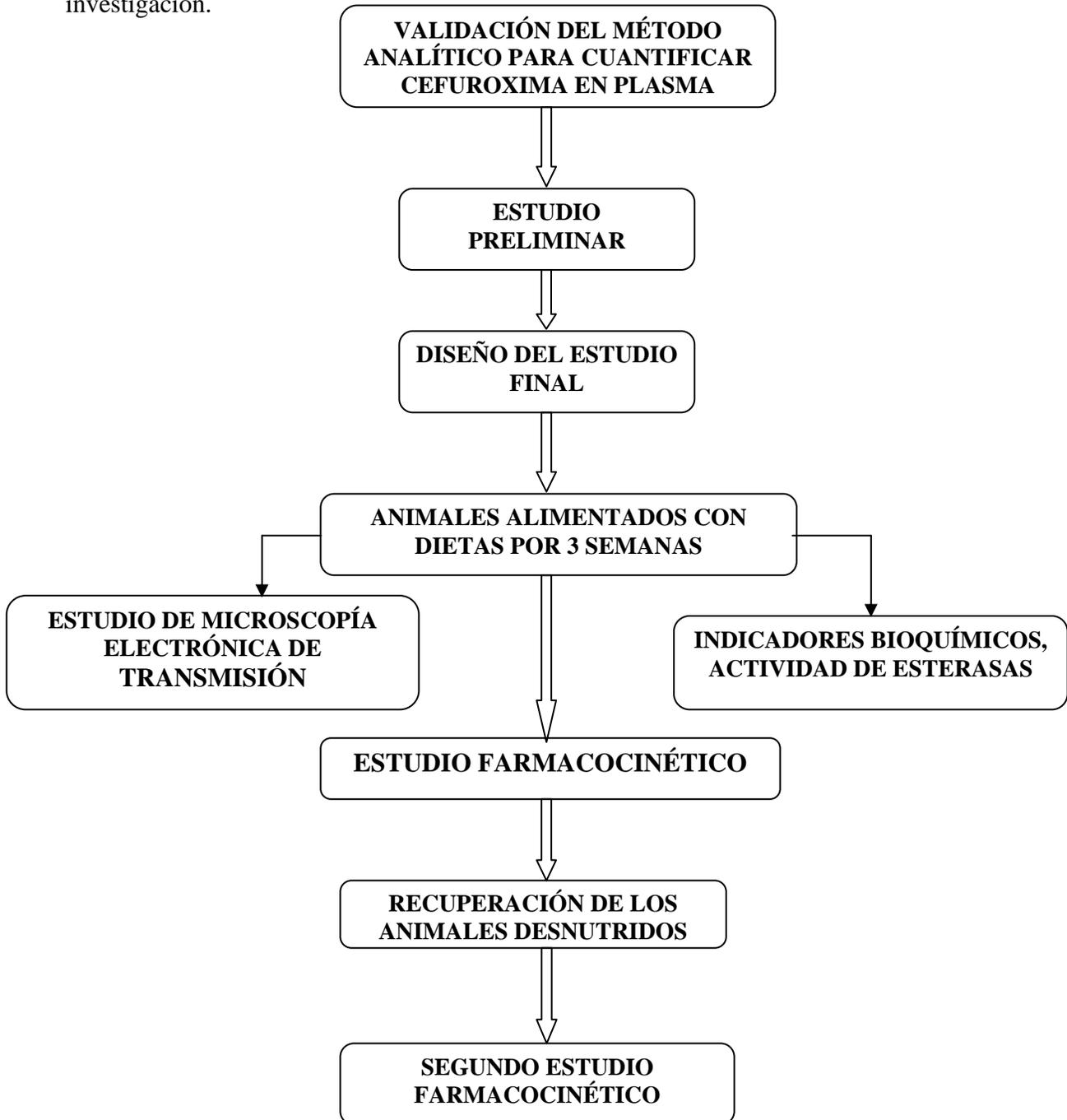
#### **3.1 Objetivos particulares**

1. Desarrollar un modelo de ratas recién destetadas con desnutrición tipo marasmo, empleando una dieta con deficiencia energética y de todos los nutrientes, aunque con una proteína de conversión eficiente.
2. Desarrollar un modelo de ratas recién destetadas con desnutrición tipo kwashiorkor empleando una dieta con suficiente aporte energético, normal consumo de hidratos de carbono y empleando como fuente de proteína una mezcla de baja eficiencia de conversión.
3. Cuantificar el contenido de proteínas plasmáticas totales así como de grasa en hígado como indicadores bioquímicos para caracterizar los modelos desarrollados.
4. Evaluar las modificaciones en la mucosa intestinal de los grupos desnutridos por medio de un estudio de microscopía electrónica de transmisión del intestino delgado.
5. Medir la actividad específica de las esterasas en el intestino delgado.

6. Establecer la farmacocinética y biodisponibilidad de la axetil cefuroxima en ratas normales y desnutridas.
7. Establecer la farmacocinética y biodisponibilidad de la axetil cefuroxima después de un período de recuperación de los grupos desnutridos.

**4. Parte experimental**

En la Figura No. 3 se muestra el diagrama general de la parte experimental del proyecto de investigación.



**Figura No. 3.** Diagrama general del proyecto de investigación

## **4.1 Método analítico para la cuantificación de cefuroxima en plasma de rata**

### **4.1.1 Condiciones cromatográficas**

La primera parte del estudio consistió en el desarrollo del método analítico para la separación de la cefuroxima por medio de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

Las condiciones cromatográficas que se establecieron fueron las siguientes:

- Sistema cromatográfico Agilent 1100, equipado con bomba cuaternaria, inyector automático, detector de arreglo de diodos, degasificador y el programa ChemStation (Agilent Technologies Inc., CA, USA).
- Columna Symmetry C<sub>18</sub> (5 µm, 4.6 x 150 mm) (Waters Corporation, MA, USA)
- Precolumna Symmetry C<sub>18</sub> (Waters Corporation, MA, USA)
- Fase móvil: buffer de fosfatos 0.05 M, pH 3:acetonitrilo (87:13)
- Longitud de onda del detector: 280 nm
- Volumen de inyección: 50 µL
- Flujo 1.5 mL/min
- Tiempo de corrida: 14 minutos

Preparación del buffer de fosfatos 0.05 M, pH3. Se pesaron 6.9g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>•H<sub>2</sub>O y se disolvieron en agua MilliQ y se llevó al aforo en un matraz volumétrico de 1L.

Tanto el metanol como el buffer de fosfatos se filtraron con membranas de nylon de 0.45 µm y se degasificaron con vacío durante 15 minutos.

#### **4.1.2 Extracción de la cefuroxima a partir del plasma de rata**

Se empleó un método de extracción en fase sólida para la extracción de la cefuroxima.

Material y equipo

- Balanza analítica (Sartorius, modelo A 210 P)
- Cartuchos de extracción en fase sólida Oasis<sup>®</sup> HLB 1cc (30 mg) (Waters Corporation, MA, USA)
- Unidades de filtración Millex<sup>®</sup>-GN con membrana de nylon 0.20  $\mu$ m (13 mm)

Reactivos

- Cefuroxima de sodio y axetil cefuroxima (Laboratorios Kendrick, México)
- Acetonitrilo grado HPLC, J.T. Baker
- Metanol grado HPLC, J.T. Baker
- Metanol 5% en agua (v/v)
- Agua bidestilada y desionizada
- Buffer de fosfatos 0.05 M, pH 3

##### **4.1.2.1 Preparación de la solución patrón de cefuroxima**

Se pesaron con exactitud 10 mg de cefuroxima, los cuales fueron transferidos cuantitativamente a un matraz volumétrico de 100 mL; se disolvieron con el buffer de fosfatos 0.05 M y se llevó al aforo con el mismo buffer para obtener una concentración de 100  $\mu$ g/mL (solución de trabajo).

##### **4.1.2.2 Curva de calibración**

A partir de la solución de trabajo de cefuroxima de 100  $\mu$ g/mL se realizaron diluciones para obtener los estándares correspondientes de la curva de calibración de la siguiente manera:

en tubos aforados de 1 mL se adicionaron 2.5, 10, 20, 40, 60, 80 y 100  $\mu\text{L}$  de la solución patrón de cefuroxima y se aforó con plasma para obtener concentraciones de 0.25, 1, 2, 4, 6, 8 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de cefuroxima en plasma.

#### **4.1.2.3 Proceso de extracción**

Los tubos con las distintas concentraciones de cefuroxima se agitaron durante 30 segundos en vórtex, se tomó una alícuota de 0.5 mL de cada solución y se transfirió a cartuchos de extracción en fase sólida Oasis<sup>®</sup>. El procedimiento de extracción en fase sólida fue el siguiente: primero se llevó a cabo el acondicionamiento de los cartuchos, para lo cual se hizo pasar 1 mL de metanol; posteriormente los cartuchos fueron equilibrados haciendo pasar 1 mL de agua. A continuación se eluyeron 0.5 mL de plasma, y posteriormente el cartucho fue lavado con 1 mL de metanol al 5% (v/v) en agua. Finalmente la cefuroxima fue eluida con 1 mL de metanol. La solución obtenida se recibió en un tubo de ensayo para ser evaporada a sequedad en baño maría a 50°C con ayuda de vacío. El residuo fue reconstituido con 0.5 mL de buffer de fosfatos 0.05 M y se inyectaron 50  $\mu\text{L}$  en el sistema cromatográfico, registrándose el área de cada pico.

#### **4.1.3 Validación del método analítico de acuerdo a la NOM-177 (27)**

Los parámetros evaluados en el proceso de validación fueron los siguientes:

##### **4.1.3.1 Especificidad**

La especificidad del método se estableció evaluando la no interferencia de la matriz biológica (plasma de rata) en la cuantificación de la cefuroxima. La prueba de especificidad se llevó a cabo analizando el plasma de 3 ratas diferentes con el método propuesto, y se probó si se presentaban interferencias en la región cromatográfica de la cefuroxima.

#### **4.1.3.2 Intervalo**

Se estableció en función de las concentraciones esperadas de cefuroxima en el plasma de rata en el estudio farmacocinético, de acuerdo con estudios informados en la literatura (23).

El intervalo seleccionado fue de 0.25 a 10  $\mu\text{g/mL}$ .

#### **4.1.3.3 Linealidad**

El método de los mínimos cuadrados fue seleccionado como modelo para describir la relación matemática entre la concentración y la respuesta, tomando a la concentración de cefuroxima en plasma como la variable “X” (variable independiente) y la respuesta (área del pico) como variable “Y” (variable dependiente). Para evaluar la linealidad se generaron tres curvas de calibración en días diferentes y se calculó el coeficiente de determinación de las rectas obtenidas; para considerar como adecuada la linealidad, el coeficiente de correlación no debería ser menor a 0.98.

#### **4.1.3.4 Recuperación absoluta**

Se llevó a cabo una prueba de eficiencia de la extracción, para lo cual se prepararon por triplicado tres concentraciones de cefuroxima en plasma diferentes a las de la curva de calibración (aunque incluidas en esta): 0.5, 5 y 9  $\mu\text{g/mL}$  (concentraciones baja, media y alta, respectivamente). La respuesta obtenida con estas concentraciones de cefuroxima en plasma fue comparada con la respuesta de cefuroxima en solución en las mismas concentraciones (0.5, 5 y 9  $\mu\text{g/mL}$ ). Para considerarse la recuperación como aceptable, el porcentaje de la razón no tendría que ser necesariamente del 100%, pero debería ser reproducible en cada nivel de concentración dentro del intervalo. La relación de la respuesta en el plasma con respecto a la obtenida en solución fue expresada en porcentaje.

#### **4.1.3.5 Precisión**

Se evaluaron la repetibilidad y la reproducibilidad.

##### **4.1.3.5.1 Repetibilidad**

Se prepararon y analizaron en un mismo día por quintuplicado tres concentraciones de cefuroxima en el plasma: 0.5, 5 y 9  $\mu\text{g/mL}$ . Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta de cada una de las concentraciones. Para considerarse como aceptable, el coeficiente de variación no debería ser mayor a 15%.

##### **4.1.3.5.2 Reproducibilidad**

Se prepararon y analizaron por triplicado durante tres días, tres concentraciones 0.5, 5 y 9  $\mu\text{g/mL}$  de cefuroxima en plasma de rata. Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de la respuesta de cada concentración. Para considerar la reproducibilidad como adecuada, el coeficiente de variación no debería ser mayor a 15%.

#### **4.1.3.6 Exactitud**

Para considerarse como adecuada, el valor promedio de las mediciones de cada nivel de concentración 0.5, 5 y 9  $\mu\text{g/mL}$  de los datos de repetibilidad y reproducibilidad deberían estar dentro del  $\pm 15\%$  del valor nominal de la concentración.

#### **4.1.3.7 Límite de cuantificación**

Se analizó por quintuplicado la concentración más baja del intervalo de la curva de calibración. Se consideró válido como límite de cuantificación a la concentración más baja si el valor promedio caía dentro del  $\pm 20\%$  del valor nominal con un coeficiente de variación no mayor al 20%.

#### **4.1.3.8 Estabilidad**

Se establecieron las condiciones de temperatura y tiempo, en las que el compuesto permanece estable en la matriz biológica, al evaluar la respuesta de la concentración del compuesto por analizar en la matriz biológica en muestras preparadas al menos por duplicado a tres niveles de concentración dentro del intervalo, considerándose adecuada la estabilidad bajo los criterios de exactitud y repetibilidad antes descritos. Se evaluaron las siguientes condiciones:

##### **4.1.3.8.1 Condiciones de almacenamiento**

Se prepararon las concentraciones 0.5, 5 y 9  $\mu\text{g/mL}$  de cefuroxima en plasma (para cada concentración se prepararon 10 muestras para contar con duplicados por cada semana). Se evaluó la estabilidad de la cefuroxima en el plasma de rata bajo condiciones de congelación a  $-50^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ , por un período de cuatro semanas, que se consideró equivalente al que transcurriría desde la obtención de las muestras hasta su análisis. Para lo anterior, se llevó a cabo la extracción y análisis del fármaco de las muestras a las semanas 0, 1, 2, 3 y 4 después de haber sido congeladas.

##### **4.1.3.8.2 Ciclos de congelación-descongelación**

Se evaluó la estabilidad de la cefuroxima al congelar y descongelar a temperatura ambiente muestras de concentración baja, media y alta en plasma de rata. Para esto se prepararon las concentraciones de 0.5, 5 y 9  $\mu\text{g/mL}$  de cefuroxima en plasma por sextuplicado y se evaluaron ciclos de congelación-descongelación a las 24 horas (un ciclo de congelación-descongelación) y a las 48 horas (dos ciclos de congelación-descongelación), cada uno por triplicado. Para lo anterior, todas las muestras fueron descongeladas a temperatura ambiente

a las 24 horas de haber sido congeladas. Tres muestras de cada concentración fueron sometidas a los procesos de extracción y análisis (1 ciclo de congelación-descongelación). Las muestras restantes se congelaron nuevamente. Estas muestras se descongelaron de nuevo a temperatura ambiente después de 24 horas y se extrajeron y analizaron (2 ciclos de congelación-descongelación). La respuesta promedio de cada concentración a las 24 y 48 horas fue comparada contra la obtenida de las mismas concentraciones de cefuroxima en plasma recién preparadas.

#### **4.2 Primer estudio preliminar**

Se realizó un estudio preliminar con el fin de evaluar la dieta propuesta para generar desnutrición tipo kwashiorkor, establecer las condiciones para el estudio, así como para evaluar si el método analítico podría ser aplicado adecuadamente en los estudios de farmacocinética.

Reactivos y equipo:

- Solución de citrato de sodio al 3.8%
- Tubos de centrífuga de plástico con tapón de rosca de 15 mL
- Centrífuga (IEC International Clinical Centrifuge)
- Ultracongelador Revco a  $-50^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$
- Sondas curvas de acero inoxidable con punta de bola para administración por vía oral para rata (calibre 16G)
- Jeringas estériles de 5 mL
- Capilares heparinizados

El primer estudio preliminar se realizó en dos grupos de animales: un grupo testigo (grupo T) y un grupo para evaluar la dieta propuesta para generar desnutrición tipo kwashiorkor (grupo K). Se trabajó con ratas macho de la cepa Sprague Dawley recién destetadas de 21 días con un peso de  $40g \pm 10g$ . Se formaron dos grupos de 10 animales cada uno: el primer grupo correspondió al grupo T, el cual fue alimentado con la dieta 1; el segundo grupo correspondió al grupo K el cual fue alimentado con la dieta 2. La composición de las dietas se presenta en la Tabla No. 2. Los animales de los dos grupos recibieron el alimento a libre demanda durante un período de 28 días.

El peso corporal se consideró como índice de desnutrición (severa cuando el peso corporal es menor al 60% con respecto a un animal alimentado con una dieta suficiente en energía y en todos los nutrimentos), y para seleccionar al modelo como adecuado se evaluó tanto el peso corporal como el comportamiento de los animales (evaluándose la actividad física de los animales y el color y apariencia del pelo).

Para desarrollar el modelo de desnutrición similar a kwashiorkor en el grupo K, se consideraron las dietas que se han asociado a la aparición de este síndrome clínico, el cual se ha relacionado con el consumo de dietas caracterizadas por tener un contenido adecuado o alto de hidratos de carbono pero con proteína de baja eficiencia de conversión; este tipo de dietas son generalmente producto del uso de atoles elaborados con cereales para la alimentación de los niños pequeños. Las dietas fueron isoenergéticas (mismo contenido energético), pero el contenido de hidratos de carbono y proteína fue diferente; asimismo, se emplearon dos mezclas de proteína distintas: en la dieta 1 la fuente de proteína fue una mezcla de caseína y leche en polvo en proporción 50:50 (con respecto a la proteína),

mientras que para la dieta 2 se usó una mezcla de gelatina y harina de maíz en proporción 60:40 (con respecto a la proteína). Para esta última dieta se eligió harina de maíz debido que es una proteína de baja eficiencia de conversión, pues posee un bajo contenido de lisina y triptofano; esta dieta también tuvo un menor contenido de proteína con respecto a la dieta 1 para simular a los atoles usados para la alimentación de los niños pequeños. Debido al bajo contenido de proteína en la harina de maíz, se usó gelatina con el fin de aumentar la proporción este componente; la gelatina también tiene un bajo contenido de triptofano, por lo que la mezcla de harina de maíz y gelatina resultaría en una proteína de baja eficiencia de conversión. En esta dieta el contenido de hidratos de carbono fue mayor al de la dieta 1, similar a la composición de las dietas basadas en atoles.

**Tabla No. 2.** Composición de las dietas empleadas en el primer estudio preliminar

Componente (g/100 g de dieta)	Dieta 1 <sup>1</sup>	Dieta 2 <sup>2</sup>
Proteína	15	10
Hidratos de carbono	59	64
Lípidos	14	14
Mezcla de minerales <sup>3</sup>	4	4
Mezcla de vitaminas <sup>4</sup>	2	2
Fibra	6	6
Energía (kcal/100 g)	422	422

<sup>1</sup> Proteína mezcla de leche en polvo:caseína en proporción 50:50

<sup>2</sup> Proteína mezcla de gelatina:harina de maíz en proporción 60:40

<sup>3</sup> Roger-Harper mineral mix, ICN Pharmaceutical 904654

<sup>4</sup> ICN Pharmaceutical 902842

Se registró de manera periódica el peso corporal de los animales, así como la cantidad de alimento ingerido por cada grupo, para lo cual se colocaron charolas de papel debajo de cada jaula con el fin de recuperar el alimento desperdiciado por los animales y sumarlo a la cantidad de alimento remanente en el comedero.

Al término de los 28 días se llevó a cabo el primer estudio farmacocinético. Los animales fueron puestos en ayuno durante 12 horas previas al estudio. La acetil cefuroxima fue administrada por vía oral, para lo cual se preparó una solución del profármaco en solución salina isotónica con 20% de propilenglicol, tomándose como base la administración de una dosis de 10 mg/kg de peso corporal y empleando una dosificación de 1D (en donde 1D = 0.01mL por gramo de peso corporal a ser administrado). Al término de las 12 horas de ayuno los animales se pesaron para calcular el volumen a administrar de la solución de acetil cefuroxima, empleando una sonda de acero inoxidable para administración por vía oral. Posteriormente se obtuvieron las muestras de sangre a partir del seno venoso ocular empleando para ello los capilares heparinizados. La toma de muestras de sangre se realizó en los tiempos: 0 (antes de la administración), 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300, 360 y 420 minutos después de la administración. La sangre se colectó en tubos de centrífuga con citrato de sodio (0.1 mL por cada mL de sangre) y se centrifugó a 3000 rpm por 15 minutos para la obtención del plasma. El plasma se transfirió a tubos eppendorff limpios y etiquetados. Las muestras se congelaron a  $-50^{\circ}\text{C}$  hasta su análisis.

### 4.3 Segundo estudio preliminar

La dieta propuesta para producir desnutrición similar a kwashiorkor generó un grado de desnutrición muy severo. Para evitar lo anterior, se hicieron algunas modificaciones a la dieta 2 (tabla No. 2) y además se probó un modelo de desnutrición similar al marasmo. Para el grupo con desnutrición similar a marasmo se consideró el empleo de una dieta con una cantidad adecuada de energía y de todos los nutrimentos aportada a los animales en cantidad insuficiente, asociándose de esta manera a deficiencia tanto de energía como de todos los nutrimentos. Para este modelo se trabajó con un grupo de animales (grupo M) que fue alimentado con restricción en la cantidad de alimento proporcionado a los animales.

La composición porcentual de las dietas se muestra en la Tabla No. 3.

**Tabla No. 3.** Composición de las dietas empleadas en el segundo estudio preliminar

Componente (g/100g dieta)	Dieta 1 <sup>1</sup>	Dieta 2 <sup>2</sup>
Proteína	15	15
Hidratos de carbono	59	59
Lípidos	14	14
Mezcla de minerales <sup>3</sup>	4	4
Mezcla de vitaminas <sup>4</sup>	2	2
Fibra	6	6
Energía (kcal/100g)	422	422

<sup>1</sup> Proteína mezcla de leche en polvo:gelatina en proporción 50:50

<sup>2</sup> Proteína mezcla de gelatina:harina de maíz en proporción 75:25

<sup>3</sup> Roger-Harper mineral mix, ICN Pharmaceutical 904654

<sup>4</sup> ICN Pharmaceutical 902842

Para el segundo estudio preliminar se formaron 3 grupos con 10 animales cada uno: el grupo T (grupo testigo) fue alimentado con la dieta 1 (suficiente en energía y nutrientes), la cual fue proporcionada *ad libitum*. El grupo M también fue alimentado con la dieta 1 pero se restringió la cantidad de alimento ingerido por los animales en un 50% con respecto al alimento consumido por el grupo T. Para conocer la cantidad de alimento a dar al grupo M, se midió la cantidad de alimento consumido por gramo de peso corporal por el grupo T en el primer estudio preliminar, se midió el peso corporal promedio del grupo M y de acuerdo a este se estableció la cantidad de alimento a ser proporcionada. Finalmente el grupo K fue alimentado con la dieta 2, proporcionándosele el alimento a libre demanda

La alimentación con las dietas correspondientes se mantuvo durante 21 días, registrando de manera periódica (de lunes a viernes) el peso corporal de los animales, así como la cantidad de alimento ingerida por cada grupo.

Por otro lado, y debido a que en el primer estudio preliminar las concentraciones de cefuroxima en plasma obtenidas después de administrar una dosis de 10 mg/kg de axetil cefuroxima no pudieron ser cuantificadas pues se encontraban por debajo del límite de cuantificación del método analítico, se llevó a cabo un estudio farmacocinético en el que se duplicó la dosis administrada a los animales (20 mg/kg de peso corporal) para poder caracterizar de manera adecuada el perfil farmacocinético.

Para lo anterior se preparó una solución del profármaco en solución salina isotónica con 20% de propilenglicol, tomándose como base la administración de una dosis de 20 mg/kg de peso corporal y empleando una dosificación de 1D (en donde 1D = 0.01mL por gramo de peso corporal a ser administrado). Se administró el profármaco por vía oral, y

posteriormente se obtuvieron las muestras de sangre a partir del seno venoso ocular a los tiempos 0, 5, 10, 15, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos. Con respecto a estos tiempos de muestreo, se añadieron los tiempos de 5 y 10 minutos y se eliminó el tiempo 420 minutos con respecto a los tiempos considerados en el primer estudio preliminar. La sangre se centrifugó para la obtención del plasma, y a continuación se llevó a cabo el procedimiento para la separación y cuantificación de la cefuroxima por HPLC. El aumento en la dosis administrada de la axetil cefuroxima permitió obtener concentraciones plasmáticas del fármaco que pudieron ser cuantificadas por el método analítico validado, por lo que las condiciones establecidas en el segundo estudio piloto fueron las elegidas para llevar a cabo el estudio farmacocinético.

#### **4.4 Estudio final**

Considerando que los modelos de desnutrición evaluados en el segundo estudio preliminar generaron una desnutrición muy severa en los animales, se modificaron las dietas proporcionadas a los grupos M y K. En el grupo M se aumentó la cantidad de alimento proporcionado; en este estudio se proporcionó el 70% de la cantidad de alimento ingerido por el grupo T (restricción del 30%), mientras que la composición de la fuente de proteína del alimento proporcionado al grupo K se cambió a una mezcla harina de maíz:gelatina:leche en polvo en proporción 47:43:10. La composición de las dietas se muestra en la Tabla No. 4 y en la Tabla No. 5 se presentan los ingredientes empleados en la elaboración de las dietas empleadas para el estudio final.

**Tabla No. 4.** Composición de las dietas empleadas en el estudio

Componente (g/100g dieta)	DIETA 1 <sup>1</sup>	DIETA 2 <sup>2</sup>
Proteína	15	13
Hidratos de carbono	59	59
Lípidos	14	14
Mezcla de minerales <sup>3</sup>	4	4
Mezcla de vitaminas <sup>4</sup>	2	2
Fibra	6	8
Energía (kcal/100g)	422	414

<sup>1</sup> Proteína mezcla leche en polvo:caseína en proporción 50:50

<sup>2</sup> Proteína mezcla harina de maíz:gelatina:leche en polvo en proporción 47:43:10

<sup>3</sup> Roger-Harper mineral mix, ICN Pharmaceutical 904654

<sup>4</sup> ICN Pharmaceutical 902842

**Tabla No. 5.** Ingredientes empleados para la elaboración de las dietas.

Ingrediente (g/kg de dieta)	Dieta 1	Dieta 2
Caseína en polvo <sup>1</sup>	84.3	-
Leche en polvo <sup>2</sup>	285.2	49.7
Harina de maíz <sup>3</sup>	-	641.8
Grenetina <sup>4</sup>	-	56.7
Sacarosa	159.6	35.8
Dextrosa	181.4	39.8
Dextrina de maíz <sup>5</sup>	137.8	30.9
Manteca vegetal <sup>6</sup>	36.4	57.7
Aceite de maíz <sup>7</sup>	27.3	42.8
Celulosa	45.9	-
Mezcla de vitaminas <sup>8</sup>	20.0	20.0
Mezcla de minerales <sup>9</sup>	22.1	24.8

<sup>1</sup>89.19% proteína cruda

<sup>2</sup>Nido®, 26.3% proteína cruda

<sup>3</sup>Maseca®, 9.3% proteína cruda

<sup>4</sup>Knox®, 94% proteína cruda

<sup>5</sup>Maizena®

<sup>6</sup>Inca®

<sup>7</sup>Mazola

<sup>8</sup>ICN Pharmaceutical 904654, Cleveland

<sup>9</sup>Roger-Harper mineral mix, ICN Pharmaceutical 902842, Cleveland

#### **4.4.1 Modelos de desnutrición**

##### **4.4.1.1 Animales**

Se trabajó con ratas macho recién destetadas de la cepa Sprague-Dawley (Harlan, México) con un peso de  $40 \pm 10$ g. Los animales se distribuyeron de manera aleatoria en tres grupos de 46 animales cada uno: grupo testigo (T) el cual fue alimentado a libre demanda con una dieta suficiente tanto en energía como en todos los nutrimentos, grupo con deficiencia en energía y en todos los nutrimentos (M) y grupo con proteína de baja eficiencia de conversión (K). Los grupos T y M fueron alimentados con la dieta 1; el grupo M fue alimentado con una restricción del 30% en la cantidad de acuerdo a lo ingerido por los animales del grupo T, mientras que el grupo K fue alimentado con la dieta elaborada con una fuente de proteína de baja eficiencia de conversión (dieta 2). Los animales se mantuvieron en un estante con jaulas individuales bajo condiciones controladas (temperatura 19-22°C, humedad relativa 31-61% y con ciclos de horas luz/oscuridad 12h/12h).

Los animales de los grupos T y K se alimentaron a libre demanda, y los tres grupos recibieron agua *ad libitum*. Para calcular la cantidad de dieta proporcionada al grupo M se consideraron los resultados obtenidos en los estudios preliminares.

Al término de las tres semanas los animales fueron puestos en ayuno durante 12 horas al término de la cuales se hicieron diversos estudios: se efectuaron los estudios farmacocinéticos, y se tomaron muestras de sangre, hígado e intestino delgado para realizar las evaluaciones bioquímicas para la caracterización de los modelos de desnutrición.

#### **4.4.1.2 Caracterización de los modelos de desnutrición**

Al término de los 21 días de alimentación, 10 animales de cada grupo fueron sacrificados con el fin de obtener muestras de sangre, hígado e intestino delgado para evaluar diferentes indicadores bioquímicos y así poder caracterizar los modelos de desnutrición. Los animales fueron anestesiados en una cámara de CO<sub>2</sub> y se realizó una incisión en la vena yugular para obtener la sangre. La sangre se recibió en un tubo de centrifuga cónico de 15 mL con solución de citrato de sodio como anticoagulante. La sangre obtenida se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos para separar el plasma. Con una pipeta pasteur se tomó el plasma el cual fue almacenado en tubos eppendorf de 2 mL a  $-50^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

##### **4.4.1.2.1 Contenido total de proteínas plasmáticas por el método de Biuret**

Se cuantificó el contenido de proteínas plasmáticas totales con las modificaciones al método de Biuret informadas por Guerci (28).

Material y equipo:

- Centrifuga (IEC International clinical centrifuge)
- Espectrofotómetro con celda de 1cm (modelo 340, Sequoia-Turner)
- Balanza analítica (Sartorius)
- Agitador tipo vórtex (Mistral-mixer, Lab-line)
- Micropipeta automática de 200-1000  $\mu\text{L}$
- Matraces volumétricos de 5, 10 y 1000 mL
- Pipetas graduadas de 2, 5 y 10 mL
- Probeta de 100 mL
- Vaso de precipitados de 10 mL

- Tubos de ensaye 16 x 150 mm

Reactivos:

- Albúmina de suero bovino (Sigma A.4503)
- Sulfato de cobre R.A. (J.T. Baker)
- Tartrato de sodio y potasio R.A. (Sigma)
- Cloruro de sodio R.A. (J.T. Baker)
- Yoduro de potasio R.A. (J.T. Baker)
- Hidróxido de sodio R.A. (Reproquifin)
- Ácido clorhídrico R.A. (Reactivos químicos Meyer)
- Fenolftaleína al 0.1%

Preparación de las soluciones

- Solución patrón de albúmina (7 mg/mL). Se pesaron 0.07 g de albúmina bovina y se colocaron en un matraz volumétrico de 10 mL, se agregaron 5 mL de agua destilada hasta disolver y finalmente se llevó al aforo.
- Reactivo de Biuret. Se pesaron 1.5 g de sulfato de cobre y 6.0 g de tartrato de sodio y potasio los cuales se disolvieron en 500 mL de agua destilada. Posteriormente se agregaron bajo agitación constante 300 mL de hidróxido de sodio 2.5 N previamente valorado. A continuación se agregó 1 g de yoduro de potasio agitando hasta disolverlo y se aforó a 1 L en un matraz aforado. El reactivo fue almacenado en un frasco ámbar.

- Solución salina al 0.85 %. Se pesaron 8.5 g de cloruro de sodio y se colocaron en un matraz aforado de 1000 mL. Se agregaron 500 mL de agua destilada hasta disolver y se llevó al aforo.

Preparación de la curva patrón de albúmina. La curva patrón de albúmina se preparó como se muestra en la Tabla No. 6.

**Tabla No. 6.** Preparación de la curva patrón de albúmina

Tubo	Solución patrón (mL)	Solución salina al 0.85% (mL)
1	0	2.0
2	0.3	1.7
3	0.5	1.5
4	0.8	1.2
5	1.0	1.0
6	1.3	0.7
7	1.5	0.5
8	2.0	0.0

Una vez preparados los tubos de la curva patrón, se agregó a cada uno 8 mL del reactivo de biuret, agitando en vórtex durante 30 segundos. Posteriormente se dejaron reposar a temperatura ambiente durante 30 minutos. Finalmente registró la absorbancia obtenida en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm.

Preparación de las muestras. Se tomaron 0.25 mL de plasma, se colocaron en un tubo de ensayo y se llevaron a un volumen de 5 mL con solución salina al 0.85%. De la solución anterior se tomaron 2 mL, se colocaron en otro tubo y se agregaron 8 mL del reactivo de

biuret; finalmente se agitó durante 30 segundos en el vórtex. Los tubos se dejaron reposar 30 minutos a temperatura ambiente. Las muestras se leyeron en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 540 nm y la absorbancia obtenida se interpoló en la curva patrón para obtener la concentración de proteína presente, empleando el factor de dilución para informar en mg de proteínas/mL de plasma.

#### **4.4.1.2.2 Cuantificación del contenido de grasa en hígado por el método de Folch (29).**

Se obtuvo el hígado de cada uno de los animales sacrificados, el cual fue lavado con solución salina isotónica fría y se llevó a cabo la determinación del contenido de grasa como se describe a continuación.

Material y equipo:

- Balanza analítica (Sartorius)
- Estufa de vacío (Lab-line Instruments, Inc.)
- Centrífuga (IEC International clinical centrifuge)
- Parrilla eléctrica de calentamiento con agitación (Ceran Shott)
- Vórtex (Mistral-mixer, Lab-line)
- Homogeneizador de vidrio con pistilo, con capacidad de 40 mL (PYREX)
- Tubos para centrifuga resistentes a disolventes orgánicos
- Vasos de precipitados de 600 mL
- Matraz aforado de 1000 mL
- Pipetas graduadas de 2 y 10 mL
- Probeta de 500 mL
- Viales de vidrio de 32 mL

- Papel de filtración (Whatman no. 4)

Reactivos:

- Cloroformo Q.P.
- Metanol Q.P.
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  (R.A., Merck)
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (R.A., Merck)
- Sulfato de sodio (R.A., Merck)
- Ácido clorhídrico

Preparación de las soluciones

- Reactivo de Folch. Se preparó una mezcla de cloroformo y metanol en proporción 3:1.
- Buffer de fosfatos 0.02 M. Se pesaron 0.16 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  y 2.76 g de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ ; se disolvieron con agua destilada, se colocaron en un matraz aforado de 1L y se llevó al aforo.

Preparación del homogeneizado de hígado. El hígado se pesó y se mezcló con el buffer de fosfatos 0.02 M en una proporción 1:4 (p/v). Posteriormente se ajustó el pH a 6 con ácido clorhídrico diluido y se llevó a cabo la homogeneización en frío (empleando un baño de hielo) usando un homogeneizador de vidrio manual. El procedimiento se llevó a cabo de la siguiente manera: se homogeneizó durante 1 minuto y transcurrido el tiempo se dejó reposar durante 1 minuto; este procedimiento se realizó 5 veces. El homogeneizado obtenido se almacenó en tubos de centrifuga y se mantuvo a  $-70\text{ }^\circ\text{C} \pm 3\text{ }^\circ\text{C}$  hasta su uso.

Extracción de lípidos. Se tomaron 2 mL del homogeneizado (por triplicado) y se mezclaron con 10 mL del reactivo de Folch en un tubo para centrífuga. Se agitó en el vórtex durante 1 minuto y se centrifugó a 2000 rpm durante 10 minutos. Posteriormente se tomó la fase orgánica con ayuda de una pipeta pasteur, se colocó en otro tubo de centrífuga y el disolvente fue evaporado a baño maría a una temperatura de 60°C. Una vez finalizada la evaporación se agregaron al tubo 7 mL de agua destilada, se agitó en vórtex durante 1 minuto y se centrifugó durante 10 minutos. Se tomó la fase no polar y se filtró recolectando el filtrado en un vial puesto previamente a peso constante. El vial fue colocado en una estufa de vacío a  $60 \pm 3$  °C para la eliminación del disolvente hasta obtener peso constante. Finalmente se registró el peso del vial con los lípidos extraídos y por diferencia de peso se determinó el contenido de lípidos en el hígado; el contenido de lípidos se expresó de dos formas: por gramo de hígado y por mg de proteína en hígado. Para éste último se midió el contenido de proteína en el homogeneizado de hígado como se describe más adelante.

#### **4.4.1.2.3 Determinación de la actividad enzimática de las esterasas del intestino delgado (22).**

La medición de la actividad de las esterasas en el intestino delgado se hizo de acuerdo al método reportado por Mosher et.al con algunas modificaciones.

Material:

- Baño de agua con agitación (VWR Brand Inmersión Circulators, modelo 1112)
- Equipo de disección
- Portaobjetos de vidrio
- Tubos de centrífuga de 15 mL

- Homogeneizador con pistilo de vidrio con capacidad de 40 mL (PIREX)
- Tubos eppendorf de 2 mL
- Cajas petri
- Vasos de precipitados de 100 mL
- Tubos de ensayo de 13 x 100 mm

#### Reactivos

- Solución de cloruro de sodio 0.15 M. Se pesaron 8.7835 g de cloruro de sodio (99.8 % de pureza) y se aforó a 1000 mL con agua destilada.

Procedimiento. Después de anestesiar a los animales se abrió el abdomen y se removieron los primeros 30 cm del intestino tomándolo desde la válvula ileocecal hasta el píloro. El intestino fue lavado con solución salina isotónica (0.15 M) fría con ayuda de una jeringa, y se abrió longitudinalmente. A continuación se procedió a raspar la mucosa con un portaobjetos, colocándola en un tubo de centrifuga previamente pesado. El raspado continuó hasta obtener toda la mucosa, desechando únicamente el epitelio intestinal. Se registró el peso final del tubo de centrifuga para obtener por diferencia el peso de la mucosa. La mucosa intestinal fue diluida con solución de cloruro de sodio 0.15 M fría en una proporción 1:4 (p/v). Posteriormente se llevó a cabo la homogeneización de forma manual en frío (empleando un baño de hielo) usando un homogeneizador de vidrio de la siguiente manera: se homogeneizó durante 1 minuto y transcurrido el tiempo se dejó reposar durante 1 minuto; este procedimiento se realizó 5 veces. El homogeneizado obtenido se almacenó en tubos eppendorf y se mantuvo a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

Los tubos de ensayo se suspendieron en un baño de agua con recirculación a  $37 \pm 3^\circ\text{C}$ . A cada tubo se le colocaron 2.75 mL de una solución  $5\mu\text{g/mL}$  de axetil cefuroxima, y se dejó que se equilibraran con la temperatura del baño. A continuación se inició la agitación y se añadieron 0.25 mL de la preparación de esterasas a cada tubo. Se tomaron alícuotas de 0.2 mL al tiempo 0 y cada 30 minutos durante dos horas. Cada alícuota se colocó en tubos con 0.1 mL de ácido tricloroacético al 10% y 0.1 mL de acetonitrilo con el fin de precipitar a las proteínas. A continuación se decantó el sobrenadante y las muestras fueron analizadas por HPLC.

#### **4.4.1.2.4 Cuantificación de proteína en hígado y mucosa intestinal por el método de Lowry.**

La cuantificación del contenido de proteína en los homogeneizados de hígado de mucosa intestinal se llevó a cabo de acuerdo al método de Lowry con modificaciones informado por Hartree (30).

Material y equipo:

- Balanza analítica (Sartorius, modelo A 210 P)
- Espectrofotómetro con celda de 1 cm (Sequoia Turner, modelo 340)
- Vórtex (Mistral-mixer, Lab-line)
- Homogeneizador de vidrio con pistilo (PYREX modelo no. 7727-40)
- Pipetas automáticas: 50-200 y 200-1000  $\mu\text{L}$
- Cronómetro
- Matraces aforados de 10, 100 y 1000 mL
- Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 mL

- Tubos de ensaye de 13 x 100 mm y 15 x 150 mm
- Vasos de precipitados de 10, 50 y 100 mL
- Probeta de 100 mL

#### Reactivos

- Solución de cloruro de sodio 0.15 M. Se pesaron 8.7835 g de cloruro de sodio (99.8% de pureza) y se aforó a 1 L con agua destilada.
- Solución estándar de albúmina sérica bovina 1 mg/mL. Se pesaron 10.43 mg de albúmina sérica bovina (Sigma A.4503) y se aforó a un volumen de 10 mL con agua destilada. Se almacenó a  $-70^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ .
- Solución de hidróxido de sodio (0.8 mol/L). Se pesaron 32 g de hidróxido de sodio y se aforó a 1000 mL con agua destilada.
- Reactivo A. Se disolvieron 0.2 g de tartrato disódico dihidratado y 10 g de carbonato de sodio en 69 mL de NaOH 0.8 M en un matraz aforado de 100 mL, y se llevó al volumen con agua destilada.
- Reactivo B. Se disolvieron 2 g de tartrato disódico dihidratado y 1 g de sulfato de cobre pentahidratado en 12.5 mL de NaOH 0.8 M, se llevó a un volumen de 100 mL con agua destilada en un matraz aforado; este reactivo se almacenó protegido de la luz.
- Reactivo mezcla. Se mezclaron 25 volúmenes de la solución de NaOH 0.8 M con 18 volúmenes del reactivo A y 2 volúmenes del reactivo B. Este reactivo se preparó justo antes de su uso.

Preparación de la curva patrón de albúmina. La solución de albúmina de suero bovino (1 mg/mL) se diluyó en una proporción 1:10 en un matraz aforado para obtener una solución con una concentración de 100 µg/mL. De esta solución se tomaron alícuotas de 0, 0.4, 0.8, 1.6, 2.4 y 3.2 mL y se llevaron a un volumen final de 4 mL con agua destilada para obtener concentraciones de 0, 10, 20, 40, 60 y 80 µg/mL, respectivamente. De cada una de estas soluciones (incluyendo también a la solución de 100 µg/mL) se tomaron 1.2 mL y se colocaron en un tubo de ensayo. Se adicionaron 0.9 mL de reactivo mezcla y se agitó en vórtex durante 10 segundos. A continuación se añadieron 0.6 mL de reactivo C, se agitó y finalmente se añadieron otros 0.6 mL del mismo reactivo agitando durante 10 segundos más. Los tubos se mantuvieron durante 45 minutos a temperatura ambiente protegidos de la luz. Al término de este tiempo se midió la absorbancia a una longitud de onda de 750 nm y se trazó una gráfica de absorbancia en función de la concentración de albúmina (expresada como µg de proteína/mL).

Cuantificación de proteína en mucosa intestinal y en hígado. En un tubo de ensayo se colocaron 1.2 mL del homogeneizado de la mucosa del intestino delgado de rata previamente diluido (con el fin de que la concentración de proteína en la muestra estuviera en un intervalo entre 10 y 100 µg/mL el homogeneizado se diluyó 1:400 v/v con solución salina isotónica) o de hígado; se adicionaron 0.9 mL del reactivo mezcla y se agitó en vórtex por 10 segundos. A continuación se adicionaron 0.6 mL de reactivo C, se agitó por 10 segundos y nuevamente se adicionaron 0.6 mL de este reactivo. Se agitaron los tubos en el vórtex y se incubó durante 45 minutos protegiendo de la luz a temperatura ambiente. Al mismo tiempo se preparó un blanco de reactivos utilizando solución salina en lugar del

homogeneizado y siguiendo el procedimiento antes descrito. Finalmente se midió la absorbancia tanto del blanco como de las muestras a una longitud de onda de 750 nm. La concentración de proteína en las muestras de mucosa intestinal se obtuvo interpolando la absorbancia de la muestra en la curva patrón de albúmina y multiplicando por el factor de dilución; finalmente se reportó el contenido de proteína en mg de proteína/mL de homogeneizado.

#### **4.4.1.2.5 Realización del estudio de microscopía de transmisión del intestino delgado.**

Se obtuvo el intestino delgado de un animal de cada grupo, y se hicieron cortes de 1mm x 1 mm de la fracción proximal del mismo. Inmediatamente los cortes se colocaron en una solución de glutaraldehído al 4%. Las muestras fueron tratadas y observadas en el Instituto de Fisiología Celular de la UNAM.

#### **4.4.2 Estudios farmacocinéticos**

Se llevaron a cabo dos estudios farmacocinéticos: el primero en la fase de desnutrición de los grupos M y K, el segundo se llevó a cabo después de un período de recuperación de los animales desnutridos.

##### **4.4.2.1 Estudio 1**

Después del período de tres semanas durante el cual fueron alimentados los animales con los respectivos regímenes, se llevó a cabo el primer estudio farmacocinético. Los animales fueron puestos en ayuno durante 12 horas previas a la farmacocinética, permitiéndose la ingestión de agua *ad libitum*. Se preparó una solución de concentración 2 mg/mL de axetil cefuroxima en solución salina con 20% de propilenglicol. Cada animal recibió 1.3 mL de dicha solución (equivalente a 2.2 mg de cefuroxima) por vía oral, y se tomaron muestras de

sangre (1 mL de sangre por animal). Las muestras de sangre se tomaron vía seno venoso ocular empleando capilares heparinizados a los siguientes tiempos: 0 (antes de la administración), 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 y 360 minutos después de la administración del fármaco, usándose tres animales por cada tiempo de muestreo. La sangre fue colectada en un tubo de centrífuga con solución de citrato de sodio (0.1 mL de citrato por mL de sangre), y se centrifugó a 3000g por 15 minutos para la separación del plasma. El plasma obtenido fue colectado con ayuda de una pipeta pasteur y se almacenó en tubos eppendorff a una temperatura de  $-50^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  hasta su uso.

#### **4.4.2.2 Estudio 2**

Después de realizar el primer estudio farmacocinético, los animales de los tres grupos fueron alimentados con la dieta suficiente en energía y en todos los nutrimentos (dieta 1, Tabla No. 4); tanto el alimento como el agua fueron proporcionados *ad libitum*. Lo anterior se realizó con el fin de determinar si un período de recuperación de los animales desnutridos podría tener influencia en la farmacocinética de la axetil cefuroxima. El período de recuperación se mantuvo por 3 semanas, al término de las cuales se llevó a cabo el segundo estudio farmacocinético, usando las mismas condiciones que fueron empleadas en el estudio I.

#### **4.4.2.3 Modelaje farmacocinético**

Las muestras de plasma fueron tratadas y analizadas por el método de HPLC validado para conocer la concentración de cefuroxima. Los datos fueron analizados usando el programa WinNonLin 4.0 (Pharsight, Mountain View, CA, USA) para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos, usando un modelo no compartimental. Los parámetros evaluados fueron

los siguientes: concentración plasmática máxima ( $C_{m\acute{a}x}$ ), tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima ( $T_{m\acute{a}x}$ ), área bajo la curva del perfil plasmático de concentración en función del tiempo hasta el último punto ( $AUC_{0-t}$ ), volumen de distribución aparente ( $V_z/F$ ), depuración aparente ( $Cl/F$ ), vida media de eliminación ( $t_{1/2}$ ), tiempo medio de residencia (TMR).

#### **4.4.4 Análisis estadístico**

Los datos se presentan como promedio  $\pm$  desviación estándar (DE). Con el fin de comparar los parámetros evaluados entre los tres grupos, se realizó un estudio de análisis de varianza de una vía. Para establecer la significancia de la diferencia entre los grupos se usó el análisis de intervalos múltiples de Duncan. Se consideró como diferencia significativa  $p < 0.05$ .

## **5. Resultados y discusión**

### **5.1 Validación del método analítico para la cuantificación de cefuroxima en plasma de rata.**

El método desarrollado fue validado con el fin de contar con un método confiable y demostrar que la capacidad del método satisface los requisitos para la aplicación analítica, es decir para los estudios de farmacocinética.

Para la extracción de la cefuroxima a partir del plasma de rata se inició con un método de precipitación de proteínas empleando ácido tricloroacético como agente precipitante, informado por Al-Said y cols. (31). Sin embargo, además de presentarse interferencias en el tiempo de retención de la cefuroxima, el porcentaje de recuperación se consideró como bajo (50%) por lo que se decidió emplear una técnica diferente para la extracción del antibiótico.

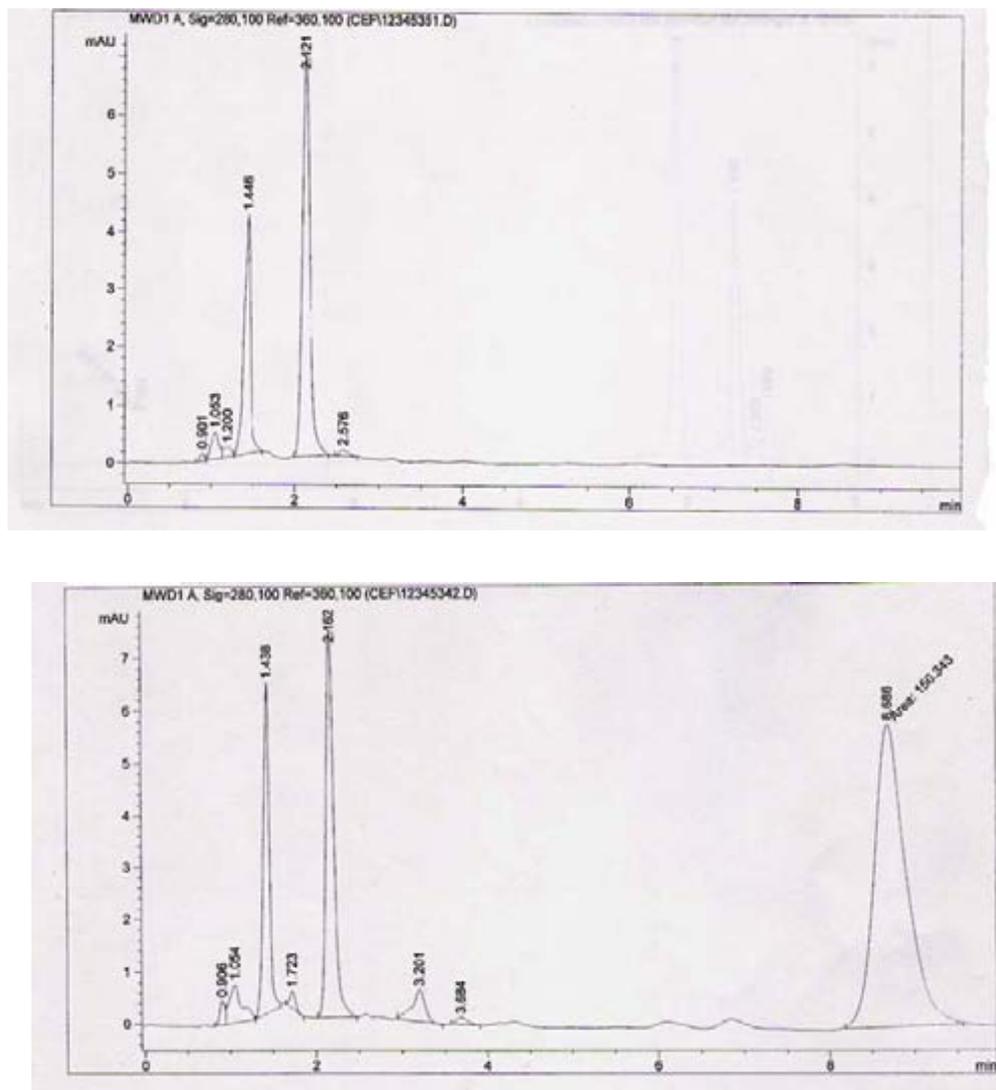
Para lo anterior, se evaluó un método de extracción en fase sólida, el cual permitió eliminar gran parte de las proteínas y otros compuestos provenientes del plasma. De esta forma, con la extracción en fase sólida se eliminaron las interferencias que impedían la cuantificación del antibiótico. Además, con este método se logró incrementar la proporción de recuperación del fármaco.

Los resultados de la validación fueron los siguientes:

#### **5.1.1 Especificidad**

Se demostró que el método es específico para este antibiótico, puesto que la matriz biológica (plasma de rata) no interfirió en la detección y cuantificación del pico

correspondiente a la cefuroxima. En la Figura No. 4 se muestra un blanco de plasma y una muestra de plasma adicionada con cefuroxima.



**Figura No. 4.** Cromatogramas representativos de (A) blanco de plasma, (B) plasma adicionado con cefuroxima.

### **5.1.2 Intervalo**

Se estableció un intervalo de 0.25 a 10 µg/mL en función de las concentraciones esperadas de la cefuroxima de acuerdo con la literatura revisada (24). Este intervalo estuvo constituido por 6 concentraciones: 0.25, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0, 8.0 y 10 µg/mL.

### **5.1.3 Linealidad**

El método analítico demostró ser lineal en el intervalo de 0.25 a 10 µg/mL. Usando el método de los mínimos cuadrados, se encontró una relación lineal cuando el área de pico de la cefuroxima se graficó en función de la concentración de la misma. El coeficiente de correlación obtenido fue  $r^2 = 0.9995$ , por lo que la linealidad del método se consideró aceptable. La ecuación encontrada para esta relación fue  $Y = 32.9869X - 3.2455$  para la cefuroxima en plasma.

### **5.1.4 Recuperación absoluta**

Se encontró una recuperación de 85.9% para la concentración de 0.5 µg/mL, de 87.8% para la concentración de 5 µg/mL y de 91.0% para la concentración de 9 µg/mL. Se consideró que la recuperación absoluta fue aceptable ya que fue reproducible en los niveles de concentración evaluados.

### **5.1.5 Precisión**

#### **5.1.5.1 Repetibilidad**

Se estableció como criterio de aceptación que el coeficiente de variación del análisis de los quintuplicados de cada concentración evaluada no fuera mayor al 15 %. Los coeficientes de variación para las concentraciones de 0.5, 5 y 9 µg/mL fueron menores al 15%, con lo cual

la repetibilidad del método se consideró satisfactoria. En la Tabla No.7 se presentan los resultados de la repetibilidad del método analítico.

**Tabla No. 7.** Repetibilidad del método analítico

Concentración teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )	C.V. (%)
0.5	$0.48 \pm 0.04$	1.61
5	$5.00 \pm 0.58$	0.36
9	$8.91 \pm 0.80$	0.32

### 5.1.5.2 Reproducibilidad

Para las concentraciones baja, media y alta del intervalo (0.5, 5 y 9  $\mu\text{g/mL}$ ) se cumplió con el criterio de aceptación pues el coeficiente de variación fue menor al 15%. En la Tabla No. 8 se muestran los resultados de la reproducibilidad del método.

**Tabla No. 8.** Reproducibilidad del método analítico

Concentración teórica ( $\mu\text{g/mL}$ )	Concentración experimental ( $\mu\text{g/mL}$ )	C.V. (%)
0.5	$0.45 \pm 0.03$	10.21
5	$4.86 \pm 0.56$	11.95
9	$8.79 \pm 0.03$	9.07

Como era de esperarse, los coeficientes de variación obtenidos en la prueba de repetibilidad fueron menores a los encontrados en el ensayo de reproducibilidad, pues en este último se llevaron a cabo análisis en tres días diferentes, por lo que además de haber variación en la preparación de las muestras también hay variación en la preparación de la fase móvil.

### 5.1.6 Exactitud

Se evaluó el promedio de la concentración de los datos obtenidos en las pruebas de repetibilidad y reproducibilidad, y se calculó el porcentaje de desviación con respecto al valor nominal de cada concentración (0.5, 5 y 9 µg/mL). En la Tabla No. 9 se muestran estos resultados, en donde puede observarse que la desviación de todos los datos analizados es menor al 15% por lo que se consideró al método como exacto.

**Tabla No. 9.** Exactitud del método analítico

	0.5 µg/mL	5 µg/mL	9 µg/mL
Repetibilidad	0.48 ± 0.04	5.00 ± 0.58	8.91 ± 0.80
% desviación	4.0	-	1.0
Reproducibilidad	0.45 ± 0.03	4.86 ± 0.56	8.79 ± 0.03
% desviación	10.0	2.8	2.3

### 5.1.7 Límite de cuantificación

Se analizó por quintuplicado la concentración más baja del intervalo, es decir, 0.25 µg/mL, encontrándose que el valor promedio fue de 0.23 µg/mL ± 0.02 (8% de desviación con respecto la concentración de 0.25 µg/mL) con un coeficiente de variación de 9.3%, por lo que estuvo dentro del ± 20% del valor nominal

### 5.1.8 Estabilidad

La Tabla No. 10 muestra los resultados de las pruebas de estabilidad durante el almacenamiento, y en la Tabla No. 11 se presenta la estabilidad bajo ciclos de congelación-descongelación para la cefuroxima en el plasma de rata.

**Tabla No. 10.** Estabilidad de la cefuroxima durante el almacenamiento

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Semana 0	Semana 1	Semana 2	Semana 3	Semana 4
		(% de recuperación)			
0.5	87.2	87.3	87.6	86.9	86.0
5	91.5	93.0	92.7	91.0	89.7
9	93.2	91.9	93.7	91.2	91.0

**Tabla No. 11.** Estabilidad de la cefuroxima durante los ciclos de congelación-descongelación

Concentración ( $\mu\text{g/mL}$ )	Inicial	1 Ciclo	2 Ciclos
		(% de recuperación)	
0.5	86.9	87.3	87.0
5	92.3	91.8	92.1
9	92.4	92.7	91.8

Con base en los resultados obtenidos, se demostró que el método analítico para cuantificar cefuroxima en plasma de rata es lineal en el intervalo de concentraciones de 0.25 a 10  $\mu\text{g/mL}$ . Es un método exacto, preciso y el antibiótico es estable en la matriz bajo las condiciones de experimentación. Por lo anterior, se consideró que el método es adecuado para realizar los estudios de farmacocinética.

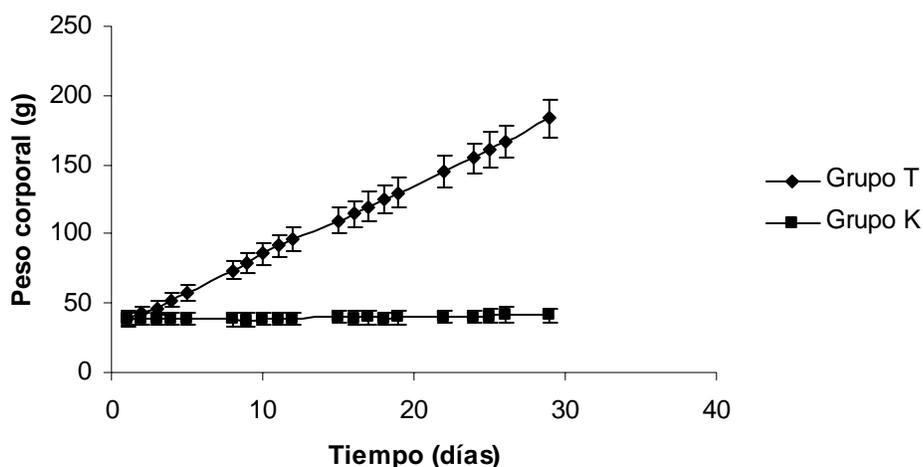
## 5.2 Primer estudio preliminar

Los objetivos del primer estudio preliminar fueron los siguientes: establecer las condiciones para el estudio farmacocinético (administración del fármaco, toma de muestras de sangre, tiempos de muestreo) así como para evaluar la dieta propuesta para producir desnutrición similar a kwashiorkor.

La dieta proporcionada al grupo testigo (dieta 1, Tabla No. 2) fue suficiente en energía y nutrientes. Al grupo K se le proporcionó una dieta elaborada con una mezcla de maíz y gelatina, considerada como una proteína de baja eficiencia de conversión, es decir, con una

baja eficiencia de conversión a proteína corporal. El contenido de proteína de esta dieta fue inferior al de la dieta 1 (10% y 15% para las dietas 2 y 1, respectivamente); el contenido de proteína de la harina de maíz es de 9%, por lo que para obtener una dieta con 10% de este componente se utilizó gelatina, pues es un alimento con alto contenido de proteína (lo que permitiría incrementar el porcentaje de este componente en la dieta), además de que al igual que la proteína del maíz, es deficiente en triptofano, por lo que el bajo contenido de este aminoácido se mantendría en la mezcla final.

Con respecto al tiempo durante el cual serían alimentados los animales, se seleccionó un período de 28 días (4 semanas), de forma similar a diversos informes encontrados en la literatura (32-36). En la Figura No. 5 se muestra el incremento en peso de los animales de los grupos T y K en función del tiempo, y en la Tabla No. 12 se muestran el peso corporal inicial y final promedio de los grupos durante el período de 28 días.



**Figura No. 5.** Primer estudio preliminar. Incremento en peso corporal durante un período de 28 días. Grupo T: testigo, alimentado con dieta suficiente en energía y nutrientes; grupo K: alimentado con dieta con proteína de baja eficiencia de conversión, n = 10.

**Tabla No. 12.** Primer estudio preliminar. Peso corporal de los grupos T y K al inicio y al final de un período de 28 días<sup>1,2</sup>

	Grupo T	Grupo K
Peso corporal inicial (g)	38.95 ± 5.26	38.98 ± 3.92
Peso corporal final (g)	183.36 ± 13.55	41.30 ± 4.98 <sup>a</sup>
Ganancia en peso (g)	144.41 ± 11.26	2.32 ± 2.19 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> El superíndice denota diferencia significativa con respecto al grupo testigo con  $P < 0.05$ ,  $n = 10$ .

<sup>2</sup> C.V. menor a 10% en todas las determinaciones.

Los resultados de la tabla 12 muestran que hubo una diferencia significativa en el peso corporal final de los animales: el peso promedio del grupo K correspondió al 22.5% del peso corporal del grupo testigo. La diferencia en peso de los dos grupos evaluados permitió confirmar la desnutrición en los animales del grupo K.

En la Tabla No. 13 se muestra la cantidad de alimento consumido por los grupos evaluados.

**Tabla No. 13.** Primer estudio preliminar. Consumo de alimento, energía y proteína durante un período de 28 días<sup>1,2</sup>

	Grupo T	Grupo K
Alimento consumido (g alimento)	348.93 ± 26.89	119.06 ± 8.76 <sup>a</sup>
Proteína ingerida (g proteína)	52.34 ± 4.03	11.92 ± 0.88 <sup>a</sup>
Energía ingerida (kcal)	1472.48 ± 113.46	502.43 ± 36.95 <sup>a</sup>
Proteína ingerida/kg <sup>0.73</sup> /día	6.45 ± 0.21	4.38 ± 0.35 <sup>a</sup>
Energía ingerida/kg <sup>0.73</sup> /día	181.34 ± 5.77	184.67 ± 14.78

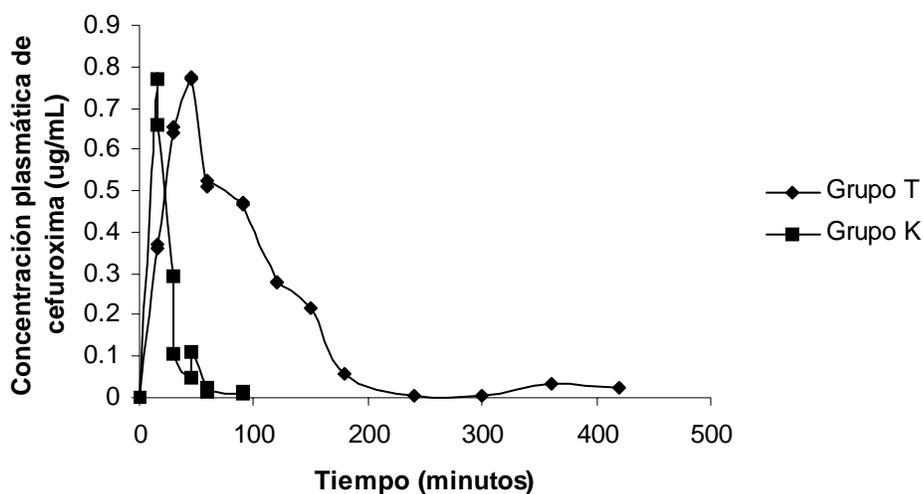
<sup>1</sup> El superíndice indica diferencia significativa con respecto al grupo testigo con  $P < 0.05$ ,  $n = 10$ .

<sup>2</sup> C.V. menor a 10% en todas las determinaciones.

Se encontró una diferencia significativa en la cantidad total de alimento consumido por cada uno de los grupos; el grupo K consumió una cantidad correspondiente al 34.4% del

alimento consumido por el grupo testigo. Tomando en consideración esta cantidad de alimento, el consumo total de proteína y energía total fue significativamente menor en el grupo K. De forma análoga a lo informado por Heard et al.(32), se calculó el consumo de energía expresado por  $\text{kg}^{0.73}$  (lo cual correspondería a la masa metabólicamente activa), encontrándose que no hay diferencia significativa del grupo K con respecto al grupo T. Sin embargo, al calcular el consumo de proteína por  $\text{kg}^{0.73}$  se observa una diferencia significativa entre ambos grupos, siendo el grupo K el que tuvo un consumo menor. Los resultados anteriores permiten demostrar que la deficiencia de proteína en el grupo K predominó sobre la deficiencia de energía de forma similar a lo propuesto para el kwashiorkor en niños. Debe recordarse que en este grupo la mezcla de proteína es de baja eficiencia de conversión, por lo que la deficiencia en la proteína se debe tanto a la cantidad consumida como a la calidad de la misma.

Al finalizar el período de alimentación de los animales, se llevó a cabo un estudio farmacocinético después de la administración de una dosis de 10 mg/kg de peso corporal de axetil cefuroxima. Al evaluar las concentraciones de cefuroxima en el plasma en función del tiempo, se observó que en la fase de eliminación las concentraciones fueron inferiores al límite de cuantificación del método (0.25  $\mu\text{g/mL}$ ), por lo que no fue posible caracterizar adecuadamente el perfil farmacocinético del antibiótico. El perfil de concentraciones plasmáticas de cefuroxima en función del tiempo se muestra en la Figura No. 6.



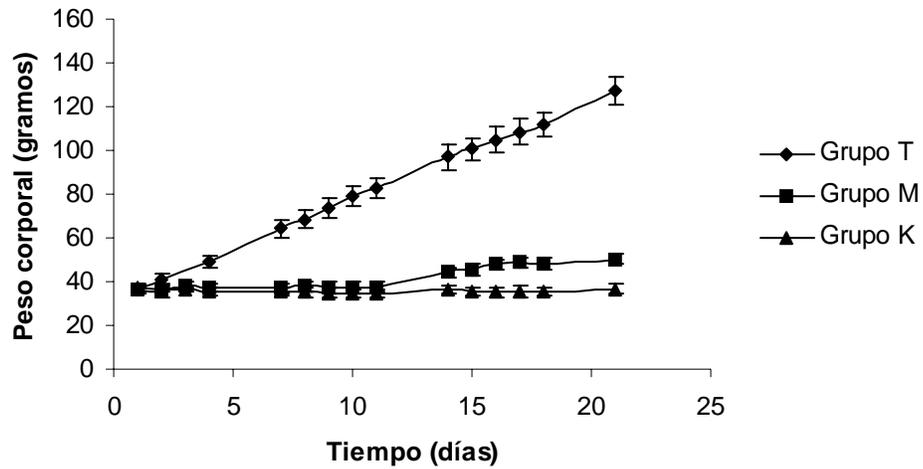
**Figura No. 6.** Primer estudio preliminar. Perfil de concentración plasmática de cefuroxima en función del tiempo. Grupo T: testigo, alimentado con dieta suficiente en energía y nutrientes; grupo K: alimentado con dieta con proteína de baja eficiencia de conversión.

Este primer estudio preliminar permitió hacer las siguientes observaciones: la dieta empleada para el grupo K generó una desnutrición muy severa en los animales, pues el peso corporal fue muy bajo con respecto al del grupo testigo, además de que se observó un comportamiento indeseable en los animales, ya que después de un tiempo corto los animales se mostraron más excitables con respecto al grupo testigo durante la manipulación, y se observaron cambios en la coloración del pelo así como piloerección en el grupo desnutrido. Por lo anterior, se decidió modificar la composición de la mezcla de proteína en la dieta empleada para la alimentación del grupo K. En lo que respecta al estudio farmacocinético, se decidió administrar una dosis más alta con el fin de poder caracterizar de manera adecuada el perfil farmacocinético.

### **5.3 Segundo estudio preliminar**

Con los resultados anteriores se diseñó un segundo estudio preliminar, en el cual se trabajó con tres grupos de animales: grupo T, grupo M (con desnutrición causada por deficiencia energética y de todos los nutrimentos) y grupo K (con desnutrición causada por el consumo de proteína de baja eficiencia de conversión).

Para diseñar el régimen de alimentación para el grupo M se consideraron los resultados obtenidos en el primer estudio preliminar, pues se calculó la cantidad de alimento por gramo de peso corporal que fue consumida por el grupo T. De esta forma, al grupo M le fue proporcionado el 50% de la cantidad de alimento ingerido por el grupo T con el fin de obtener deficiencia en energía así como en todos los nutrimentos. Por otro lado, la dieta diseñada para el grupo K fue preparada con una mezcla de proteína gelatina:harina de maíz en una proporción 75:25 (con respecto a la proteína); lo anterior permitió obtener una concentración de 15% de proteína, de tal forma que fuera posible tener una dieta isoproteínica con respecto a la dieta del grupo testigo; cabe mencionar que la dieta también fue isoenergética con respecto a la del grupo T (422 kcal/100 g de dieta). El período de alimentación en este estudio fue de 21 días. En la Figura No. 7 se muestra el crecimiento de los animales durante este período. Se observaron diferencias en las curvas de crecimiento de los tres grupos, pues la velocidad de crecimiento (evaluada por la pendiente de las gráficas) fue mayor en el grupo T, seguida por el grupo M y finalmente por el grupo K.



**Figura No. 7.** Segundo estudio preliminar. Incremento en peso corporal durante un período de 21 días. Grupo T: testigo, alimentado con dieta suficiente en energía y nutrientes; grupo M: alimentado con restricción energética y de todos los nutrientes; grupo K: alimentado con dieta con proteína de baja eficiencia de conversión.

En la Tabla No. 14 se presentan los resultados del peso corporal de los tres grupos al inicio y al final de este segundo estudio preliminar.

**Tabla No. 14.** Segundo estudio preliminar. Peso corporal inicial y final de los grupos T, M y K<sup>1,2</sup>

	Grupo T	Grupo M	Grupo K
Peso corporal inicial (g)	36.6 ± 2.24	36.39 ± 2.13	36.82 ± 1.48
Peso corporal final (g)	127.42 ± 6.23	50.28 ± 2.50 <sup>b</sup>	36.40 ± 2.30 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Los superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo; letras diferentes indican diferencia significativa entre los grupos M y K con  $P < 0.05$ ,  $n = 10$

<sup>2</sup> C.V. menor a 10% en todas las determinaciones.

Los dos grupos desnutridos mostraron diferencias significativas en el peso corporal con respecto al grupo T después del período de 21 días; a su vez, el grupo M tuvo un peso corporal final significativamente mayor al del grupo K. A pesar de que la fuente de proteína del grupo K tuvo una composición diferente a la del primer estudio preliminar, se sigue observando una amplia diferencia en el peso con respecto al del grupo T, ya que el peso promedio correspondió al 28.6% del peso corporal de este último. Aunque el contenido de proteína de la dieta fue el mismo que el de la dieta del grupo testigo, la deficiencia de triptofano sigue predominando en la dieta del grupo K, por lo que su eficiencia de conversión sigue siendo baja. Por su parte, el grupo M también mostró una diferencia evidente en el peso corporal, pues correspondió al 39.5% del peso promedio del grupo T.

En la Tabla No. 15 se muestra el consumo de alimento en los tres grupos.

**Tabla No. 15.** Segundo estudio preliminar. Consumo de alimento, proteína y energía durante un período de 21 días<sup>1,2</sup>

	Grupo T	Grupo M	Grupo K
Alimento consumido (g alimento)	202.33 ± 8.84	71.56 ± 2.94 <sup>a</sup>	67.32 ± 4.66 <sup>a</sup>
Proteína ingerida (g)	30.35 ± 1.33	10.73 ± 0.44 <sup>a</sup>	10.10 ± 0.70 <sup>a</sup>
Energía ingerida (kcal)	853.83 ± 37.29	301.98 ± 12.41 <sup>a</sup>	284.09 ± 19.65 <sup>a</sup>
Proteína ingerida/kg <sup>0.73</sup> /día (g/kg <sup>0.73</sup> /día)	6.50 ± 0.16	4.54 ± 0.15 <sup>a</sup>	5.41 ± 0.39 <sup>b</sup>
Energía ingerida/kg <sup>0.73</sup> /día (kcal/kg <sup>0.73</sup> /día)	182.99 ± 4.57	127.65 ± 4.27 <sup>a</sup>	152.15 ± 10.88 <sup>b</sup>

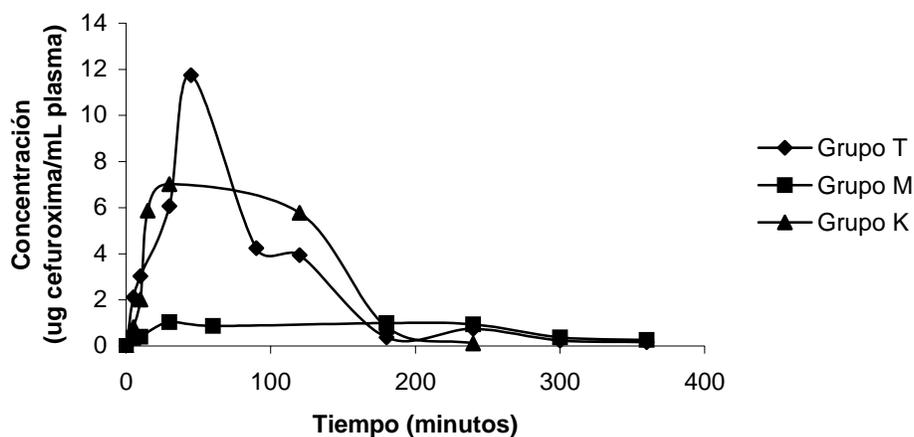
<sup>1</sup> Los superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo; letras diferentes indican diferencia significativa entre los grupos M y K con  $P < 0.05$ ,  $n = 10$

<sup>2</sup> C.V. menor a 10% en todas las determinaciones

Se encontraron diferencias significativas en el consumo de alimento de los grupos desnutridos con respecto al grupo testigo; sin embargo, entre los grupos M y K no hubo diferencia significativa. El consumo de proteína y energía total presentó el mismo comportamiento, pues los grupos M y K mostraron un consumo significativamente menor con respecto al grupo T; por su parte, los grupos desnutridos no mostraron diferencias significativas entre sí. Al evaluar el consumo energético y de proteína en términos de la masa metabólicamente activa ( $\text{kcal/kg}^{0.73}/\text{día}$ ), se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos: el consumo más bajo fue el presentado por el grupo M, seguido por el grupo K; a su vez, estos grupos mostraron un consumo significativamente menor con respecto al testigo. Cabe mencionar que a pesar de que el consumo de alimento fue similar entre los grupos desnutridos, y a pesar de que las dietas fueron isoenergéticas, al expresar el consumo energético de acuerdo a la masa metabólicamente activa, se encuentran diferencias entre estos grupos. Aunque el consumo de energía y de proteína fue mayor en el grupo K con respecto al grupo M (éste último grupo consumió el 84% de proteína y energía con respecto al grupo K), el peso corporal del grupo M fue mayor. Lo anterior demuestra que la proteína consumida por el grupo M fue convertida en proteína corporal de manera más eficiente que la proteína consumida por el grupo K.

Al finalizar el período de alimentación de los animales se llevó a cabo el estudio farmacocinético, para lo cual se administraron 20 mg de axetil cefuroxima por kg de peso corporal. En la Figura No. 8 se muestran los perfiles obtenidos. Al duplicar la dosis administrada a los animales fue posible cuantificar las concentraciones plasmáticas de cefuroxima en las muestras y trazar las gráficas de la farmacocinética en los tres grupos

evaluados. Los cambios realizados en el diseño de los tiempos de muestreo fueron satisfactorios, pues se observa de mejor manera la fase de absorción del fármaco, y asimismo es posible caracterizar la fase de eliminación del antibiótico.



**Figura No. 8.** Segundo estudio preliminar. Perfil de concentración plasmática de cefuroxima en función del tiempo. Grupo T: testigo, alimentado con dieta suficiente en energía y nutrientes; grupo M: grupo con restricción energética y de todos los nutrientes; grupo K: alimentado con dieta con proteína de baja eficiencia de conversión.

A pesar de haber obtenido los perfiles farmacocinéticos, no se calcularon los parámetros farmacocinéticos dado que las curvas no fueron del todo adecuadas debido al reducido número de animales con los que se trabajó. Este segundo estudio preliminar permitió establecer las condiciones para llevar a cabo la farmacocinética de la acetil cefuroxima, pues se eligió la dosis a administrar a los animales y se establecieron los tiempos para la toma de muestras.

En cuanto a los modelos de desnutrición, se consideró que los animales de los dos grupos desnutridos presentaron un grave estado de desnutrición. Por lo anterior se reformularon las dietas de ambos grupos: al grupo M se le restringió la cantidad de alimento en un 30% con respecto al consumo del grupo testigo (a diferencia de la restricción al 50% del segundo estudio preliminar). En cuanto a la dieta del grupo K, se cambió la composición de la fuente de proteína. Tomando en consideración que las mezclas empleadas en los dos estudios preliminares resultaron de muy baja eficiencia de conversión (razón por la cual el incremento en el peso corporal fue muy bajo), se decidió introducir leche en polvo en un porcentaje bajo para incrementar la calidad de la mezcla de proteína, lo que permitiría producir la desnutrición en los animales, aunque en una forma menos grave que la provocada por las dietas probadas anteriormente. Además, también se redujo el período de alimentación de los animales a 21 días, ya que la desnutrición se generó rápidamente y de esta manera se podría evitar que los animales se desnutrieran de manera muy severa y también se evitaría tener que mantenerlos en estado de desnutrición durante un tiempo prolongado.

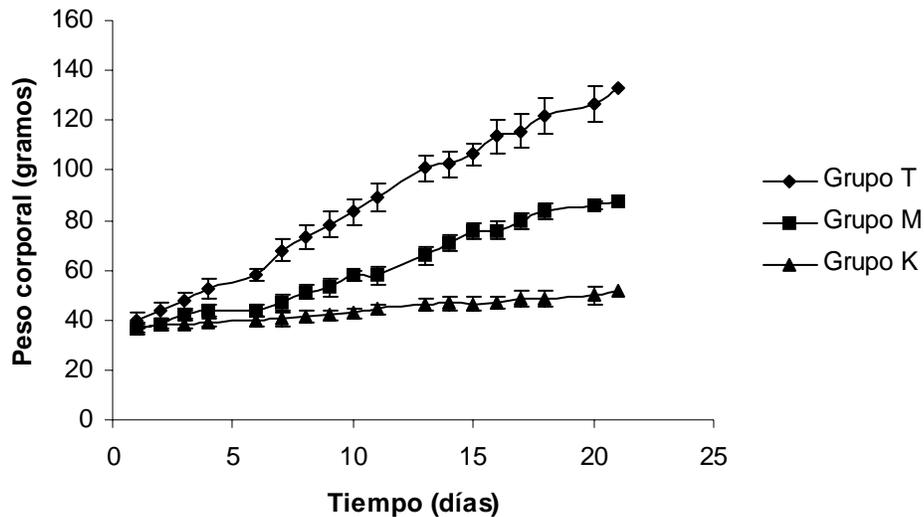
### **5.4 Estudio final**

El estudio final se llevó a cabo en dos fases: la primera correspondió a la fase de desnutrición de los grupos M y K. Se hizo la evaluación de los modelos de desnutrición y se llevó a cabo el primer estudio farmacocinético. En la segunda fase del estudio, se cambió el régimen de alimentación de los grupos M y K con el fin de buscar su recuperación, y así llevar a cabo un segundo estudio de farmacocinética.

### 5.4.1 Evaluación de los modelos de desnutrición

#### 5.4.1.1 Peso corporal

En la Figura No. 9 se muestra el incremento en peso corporal de los animales de cada grupo.



**Figura No. 9.** Incremento en el peso corporal. Grupo T: testigo, alimentado con dieta suficiente en energía y nutrientes; grupo M: con restricción energética y de nutrientes; grupo K: alimentado con dieta con proteína de baja eficiencia de conversión.

Con las modificaciones en las dietas de los grupos M y K se observó un incremento de peso corporal mayor al observado en los dos estudios preliminares. Además, se encontraron diferencias en el aspecto físico de los animales, pues en este estudio ya no hubo presencia de piloerección ni cambios en la coloración del pelo, y el comportamiento de los animales de los grupos desnutridos también se modificó, pues se redujo notablemente la hiperactividad, especialmente en los animales del grupo K.

En la fase de desnutrición de este estudio se encontraron diferencias significativas en el peso promedio de los grupos desnutridos con respecto al grupo T; también se observó diferencia significativa entre los grupos M y K. En la Tabla No. 16 se muestra el peso corporal, así como la ganancia en peso de los tres grupos al final del período de tres semanas de la fase de desnutrición.

**Tabla No. 16.** Peso corporal y ganancia en peso al final de la fase de desnutrición<sup>1,2</sup>

Grupo	Peso corporal (g)	Ganancia en peso (g/21 días)
Grupo T	133.3 ± 7.0	82.81 ± 6.3
Grupo M	85.9 ± 2.9 <sup>b</sup>	47.37 ± 1.5
Grupo K	51.9 ± 3.9 <sup>a</sup>	10.21 ± 2.1

<sup>1</sup> Los valores representan el promedio ± DE, n = 46

<sup>2</sup> Los superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo; letras diferentes indican diferencia significativa entre los grupos M y K con  $P < 0.05$ , n = 10

#### 5.4.1.2 Consumo de alimento

En la Tabla No. 17 se muestra el consumo de alimento en la fase de desnutrición. Se encontraron diferencias significativas en la cantidad de alimento consumido por los grupos desnutridos con respecto al testigo. Además, se observó que el grupo K consumió una cantidad total de alimento significativamente menor al ser comparado con el grupo M a pesar de que los animales fueron alimentados a libre demanda. De esta manera, los animales del grupo K tuvieron no sólo una deficiencia de proteína (pues ésta fue de baja eficiencia de conversión), sino que además consumieron una menor cantidad de energía con respecto al grupo T, por lo que tuvieron una desnutrición energético proteínica al igual que el grupo M. El bajo consumo de alimento observado en el grupo K es similar a lo

observado por otros autores, y al parecer es consecuencia de un déficit de aminoácidos indispensables en la dieta (37-41). Peng et al. (42) evaluaron el consumo de dietas que diferían en cantidad y composición proteínica: investigaron el efecto de una dieta libre de proteína y otra con un bajo contenido de algunos aminoácidos indispensables, encontrando que los animales eligieron casi de manera exclusiva la dieta libre de proteína. Los autores sugirieron que esta selección podría haber sido el resultado de alteraciones en el patrón de aminoácidos en el plasma y el cerebro; este patrón solo sufre cambios al haber deficiencia de aminoácidos indispensables en la dieta. En el presente estudio, el grupo K, consumió una dieta con bajo contenido de lisina y triptofano; es posible que el bajo consumo de alimento se haya debido al desequilibrio de estos aminoácidos indispensables. Por lo anterior, el bajo incremento en el peso corporal de los animales del grupo K fue el resultado tanto de la baja cantidad de alimento consumido así como de la proteína de baja eficiencia de conversión.

**Tabla No. 17.** Consumo de alimento, energía y proteína durante la fase de desnutrición<sup>1,2</sup>

	Grupo T	Grupo M	Grupo K
Alimento consumido (g alimento)	214.78 ± 11.12	118.48 ± 2.59 <sup>b</sup>	97.26 ± 8.83 <sup>a</sup>
Proteína ingerida (g)	32.22 ± 3.23	17.77 ± 0.39 <sup>b</sup>	12.64 ± 1.15 <sup>a</sup>
Energía ingerida (kcal)	906.36 ± 46.92	499.97 ± 10.91 <sup>b</sup>	402.67 ± 36.54 <sup>a</sup>
Proteína ingerida/kg <sup>0.73</sup> /día (g/kg <sup>0.73</sup> /día)	6.69 ± 0.25	5.33 ± 0.11 <sup>a</sup>	5.48 ± 0.44 <sup>a</sup>
Energía ingerida/kg <sup>0.73</sup> /día (kcal/kg <sup>0.73</sup> /día)	188.17 ± 6.95	149.97 ± 3.10 <sup>a</sup>	174.58 ± 13.94

1 Los superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo; letras diferentes indican diferencia significativa entre los grupos M y K con  $P < 0.05$ ,  $n = 10$

2 C.V. menor a 10% en todas las determinaciones.

En la Tabla No. 17 también se muestra el consumo proteína y energía con respecto a la masa metabólicamente activa. Aunque se siguen encontrando las diferencias de los grupos M y K con respecto al testigo, el consumo de proteína entre los grupos desnutridos no presenta diferencias. Los resultados obtenidos en cuanto al consumo de energía son particularmente interesantes, pues no se encontró diferencia significativa entre los grupos T y K, pero sí se observó un consumo energético significativamente menor en el grupo M. Los resultados del consumo de energía y proteína demuestran que, en el caso del grupo M la deficiencia predominante fue la energética, mientras que en el grupo K se presentó una deficiencia predominantemente proteínica, pues a pesar de que la cantidad consumida fue similar a la del grupo M, la proteína ingerida por el grupo K es deficiente en algunos aminoácidos indispensables lo que la hace de mala calidad. Lo anterior puede ser comparable con las observaciones que se han realizado en el marasmo y en el kwashiorkor en niños; como ha sido mencionado con anterioridad, el marasmo se ha relacionado con una deficiencia energética y de todos los nutrimentos, mientras que el kwashiorkor se asocia con el consumo de bajas cantidades de proteína o con el consumo de proteínas de baja eficiencia de conversión. Adicionalmente, en el caso del kwashiorkor, el consumo de energía puede ser normal, pues hay un consumo alto de hidratos de carbono. De forma análoga a lo antes mencionado, la dieta con la que fue alimentado el grupo K tuvo una cantidad importante de hidratos de carbono provenientes de la harina de maíz.

Los modelos de desnutrición en animales de laboratorio informados en la literatura se basan principalmente en dietas con bajo contenido de proteína o se siguen regímenes en los que se restringe la cantidad de alimento proporcionado a los animales; frecuentemente la proteína

empleada para la elaboración del alimento es la caseína, que es una proteína aprovechada de manera eficiente por los animales (32-39, 43). Sin embargo, existen pocos estudios acerca de los efectos producidos por el consumo de proteínas de baja eficiencia de conversión. En el modelo usado en este estudio para simular la desnutrición tipo kwashiorkor se trabajó con una dieta que trató de imitar las dietas de los niños en comunidades rurales.

Una de las características del kwashiorkor, que se usa muchas ocasiones para diferenciarlo del marasmo es la presencia del edema. En el grupo K no se observó la presencia de edema en ninguno de los animales; esta observación es similar a lo informado por Heard et.al quienes no encontraron edema en un grupo de animales desnutridos a pesar del bajo consumo de proteína (32). Un estudio en el que se logró generar el edema en animales de laboratorio fue realizado por Edozien (44), quien informó que ratas jóvenes alimentadas con una dieta con un 0.5 % de proteína (albúmina), desarrollaron las características clínicas del kwashiorkor, incluyendo el edema después de períodos de 2 a 4 meses de alimentación. Sin embargo, el período de tiempo durante el cual fueron alimentados los animales fue muy largo y la concentración de proteína en la dieta fue muy baja, lo que en la actualidad no se consideran condiciones adecuadas para el trabajo con animales de experimentación pues generan alteraciones importantes en el comportamiento.

#### **5.4.1.3 Indicadores bioquímicos: proteínas plasmáticas totales y grasa en hígado**

En la Tabla No. 18 se muestra el contenido de proteínas plasmáticas totales, así como el contenido de grasa en hígado. Estas determinaciones se realizaron con el fin de evaluar si

algunos cambios bioquímicos asociados al kwashiorkor (que permiten diferenciarlo del marasmo) estaban presentes en el grupo K.

**Tabla No. 18.** Indicadores bioquímicos<sup>1,2</sup>

	Proteínas plasmáticas totales (mg/mL)	Grasa en hígado (mg lípidos/g proteína)
Grupo T	25.4 ± 4.3	64.9 ± 10.9
Grupo M	22.3 ± 0.9	62.8 ± 7.3
Grupo K	19.1 ± 1.5 <sup>a</sup>	125.9 ± 7.9 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Los superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo con  $P < 0.05$

<sup>2</sup> Los valores representan el promedio ± DE, n = 10

Se encontró que el contenido de proteínas plasmáticas en el grupo K fue significativamente menor al del grupo T, mientras que el grupo M no mostró diferencia con respecto al testigo. Estas observaciones son similares a las hechas por Heard et. al (32), quienes encontraron que el consumo de una dieta con bajo contenido de proteína (aunque de alta eficiencia de conversión) produjo menor concentración de proteínas plasmáticas totales con respecto a un grupo testigo; a su vez, la concentración de estas proteínas fue menor a la encontrada en un grupo alimentado con una cantidad restringida de una dieta con contenido elevado de proteína; en este último grupo no se encontró una diferencia en las proteínas plasmáticas al ser comparado con un grupo testigo. En el presente trabajo los grupos M y K mostraron patrones similares a los encontrados en el kwashiorkor y en el marasmo: en niños con marasmo se ha informado que las proteínas plasmáticas se encuentran en una concentración similar a la observada en un niño con buen estado de nutrición, mientras que en el kwashiorkor hay una disminución significativa en esta variable. Lo anterior puede deberse

a menor velocidad de síntesis de proteínas plasmáticas debido a que en este grupo la deficiencia principal es la de proteína de conversión eficiente, que a su vez es producto de la deficiencia de algunos aminoácidos indispensables en la dieta (1, 3).

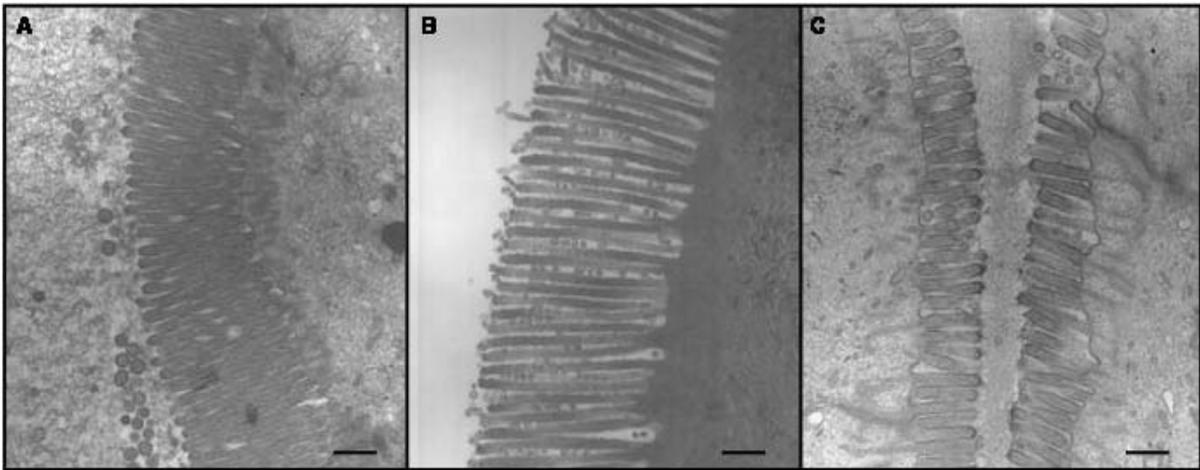
El grupo M mostró un contenido de grasa en el hígado similar al del grupo T, lo cual está de acuerdo con lo observado en niños con marasmo (1, 3). El grupo K mostró un contenido de lípidos en el hígado significativamente mayor al de los grupos T y M, comportamiento que es similar al de los niños con kwashiorkor (1, 3, 6). La tendencia de los resultados antes mencionados es parecida a la de los hallazgos de Heard et al.(32), quienes encontraron que un grupo de animales alimentados con una dieta con bajo contenido de proteína (4% caseína) presentaron concentraciones significativamente elevadas de grasa en el hígado con respecto a un grupo testigo alimentado con una dieta con un contenido adecuado de proteína (12% de caseína). Al igual que en el presente estudio, Heard et al. evaluaron el comportamiento de un grupo alimentado con la dieta empleada para el grupo testigo, restringiendo la cantidad de alimento proporcionado a los animales; de forma similar a lo encontrado en el presente estudio, ellos informaron que las concentraciones de grasa en hígado del grupo restringido fueron similares a las del grupo testigo. En estudios con niños desnutridos, algunos autores han propuesto que la deficiencia severa de proteína (como la observada en el kwashiorkor) puede producir una disminución importante en las proteínas encargadas del transporte de lípidos en el organismo, provocando así la acumulación de estos en el hígado. También es posible que haya aumento en la síntesis hepática de ácidos grasos a partir del exceso de hidratos de carbono en la dieta, una alteración en la oxidación de los ácidos grasos por parte de los hepatocitos o en todo el organismo como consecuencia

de la desnutrición,; todos estos factores podrían ser la causa de la acumulación de los lípidos en el hígado (45-47).

#### **5.4.1.4 Estudio de microscopía electrónica de transmisión del intestino delgado**

Las Figuras 10A, 10B y 10C muestran las imágenes de la fracción proximal del intestino delgado que se observaron en el estudio de microscopía electrónica de transmisión. Se encontró que en el grupo testigo las células de la mucosa mostraron un patrón uniforme, y las microvellosidades presentaron una apariencia normal. En el grupo K se observó acortamiento en las microvellosidades, además de que algunas de ellas se encontraban fragmentadas. Lo anterior es similar a las observaciones en humanos, en los que se ha visto que en el kwashiorkor se produce acortamiento de las vellosidades, así como una disminución en el número de las mismas (48). En el caso del grupo M se encontró que de forma aparente hubo una disminución en el número de vellosidades (aunque no se tomaron medidas morfométricas); sin embargo, los cambios fueron menos evidentes que los observados en el grupo K. El daño severo en la mucosa intestinal es más común en el kwashiorkor que en el marasmo, lo cual puede deberse a la lenta recuperación de la mucosa por la depleción de proteína encontrada en el kwashiorkor (49, 50). Este comportamiento se observó en el grupo K, el cual presentó un daño más severo en la mucosa intestinal. Los cambios producidos podrían generar una alteración en la capacidad de absorción, ya que el intestino es el principal sitio para que se lleve a cabo este proceso. Las diferencias encontradas entre los grupos M y K pueden estar relacionadas con la baja eficiencia de conversión de la proteína ingerida por el grupo K, aunque también podrían estar relacionadas con la severidad de la desnutrición. Zambonino et. al (51) encontraron que la

altura de las vellosidades puede usarse como indicador del estado de nutrición en ratas; de acuerdo con lo anterior, el grupo K podría haber presentado un estado de desnutrición más severo que el grupo M (lo cual concuerda a su vez con el peso corporal de estos grupos, pues el grupo K presentó un peso promedio significativamente menor al del grupo M).



**Figura No. 10.** Imágenes de microscopía electrónica de transmisión del segmento proximal del intestino delgado. 10A: grupo testigo, alimentado con suficiente energía y nutrientes; 10B: grupo M (restricción energética y de todos los nutrientes); 10C: grupo K (alimentado con proteína de baja eficiencia de conversión). La barra representa 500 nm.

Los cambios bioquímicos observados (disminución en la concentración de proteínas plasmáticas y el aumento en el contenido de grasa en hígado) en el grupo K fueron similares a las alteraciones que se han encontrado en el kwashiorkor. Por su parte, el grupo M no presentó los cambios antes mencionados; este comportamiento es parecido a lo observado en la desnutrición tipo marasmo, pues los cambios bioquímicos son menos

significativos que en el kwashiorkor. Lo anterior demuestra que los modelos desarrollados son similares a los síndromes clínicos del marasmo y el kwashiorkor.

#### 5.4.1.5 Actividad de las esterasas del intestino delgado

Otra variable bioquímica que se consideró importante para el presente estudio fue la medición de la actividad de las esterasas en el intestino delgado. La acetil cefuroxima tiene un grupo éster que aumenta la absorción del fármaco en el intestino delgado. Este enlace puede ser hidrolizado por las esterasas del intestino delgado dando lugar a la forma no absorbible del antibiótico (cefuroxima), reduciendo así su biodisponibilidad. Tal y como fue demostrado en el estudio de microscopía, la desnutrición puede producir daño en la mucosa intestinal, por lo que la actividad de las enzimas presentes en ella también puede verse afectada. En la Tabla No. 19 se muestran los resultados correspondientes al contenido de proteína del segmento proximal del intestino delgado, así como la actividad específica de las esterasas en esta fracción del intestino. Como puede observarse, la actividad específica de las esterasas no mostró diferencias significativas entre los tres grupos evaluados.

**Tabla No. 19.** Contenido de proteína y actividad específica de las esterasas en la fracción proximal del intestino delgado<sup>1,2</sup>

	Contenido de proteína (mg/g)	Actividad de la esterasas ( $\mu$ g/mg proteína/min)
Grupo T	86.55 $\pm$ 9.5	0.0026 $\pm$ 0.0005
Grupo M	70.11 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	0.0024 $\pm$ 0.0005
Grupo K	68.85 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>	0.0029 $\pm$ 0.0006

<sup>1</sup> El superíndice denota diferencia significativa con respecto al grupo T con  $P < 0.05$

<sup>2</sup> Los valores representan el promedio  $\pm$  DE, n = 10

Como se ha informado en otros trabajos, las enzimas presentes en el tracto gastrointestinal son muy sensibles a un gran número de factores ambientales, dentro de los cuales destaca la dieta. La desnutrición se ha asociado a alteraciones en la actividad de las enzimas del tracto gastrointestinal; sin embargo, el efecto no es el mismo para todas las enzimas, pues se ha encontrado que algunas de ellas (como las disacaridasas con excepción de la lactasa, por ejemplo) no ven modificada su actividad de manera significativa en la desnutrición. Al parecer esto se debe que la mucosa intestinal puede obtener energía de dos fuentes: puede obtener 45% de su energía a partir del propio lumen, y además el intestino delgado es uno de los primeros tejidos que están expuestos a los nutrimentos provenientes de la dieta. Los dos factores antes mencionados pueden proveer suficientes sustratos para ayudar a mantener la función local, haciendo que la actividad enzimática pueda conservarse (52, 53). A pesar de no encontrarse diferencias en la actividad específica de las disacaridasas, hay que destacar que el contenido de proteína en la fracción proximal del intestino delgado sí presentó diferencias, pues los grupos desnutridos tuvieron un contenido de proteína significativamente menor al del grupo T. Esto quiere decir que en términos absolutos, el contenido de proteína y por tanto la actividad de estas enzimas es menor en los grupos M y K.

## **5.4.2 Estudios farmacocinéticos**

### **5.4.2.1 Estudio 1**

Existen pocos estudios en niños desnutridos para evaluar el efecto de la desnutrición sobre la disposición de fármacos usados para el tratamiento de enfermedades asociadas con este estado patológico. A pesar de lo anterior, estos estudios son sumamente importantes, pues

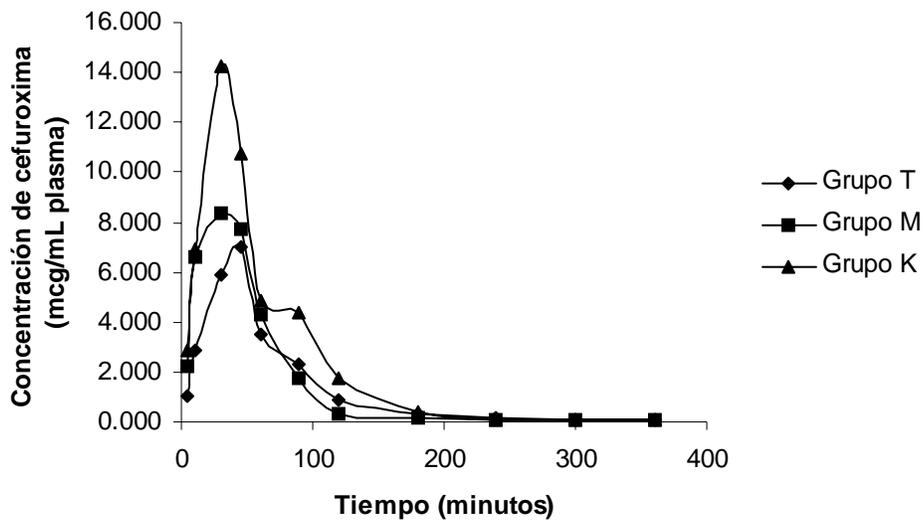
cada fármaco responde de manera diferente a la desnutrición. Por ejemplo, Lares-Asseff et al. estudiaron la farmacocinética del metronidazol en niños desnutridos, encontrando que vida media de eliminación fue significativamente más larga con respecto a un grupo de niños rehabilitados (previamente desnutridos), lo que se acompañó de la correspondiente disminución en la depuración del fármaco. Ellos propusieron que esto se debió a que el sistema enzimático del citocromo P450 encargado de biotransformar al fármaco, no funciona de forma óptima en los niños desnutridos (54, 55). Por otro lado, no se encontraron diferencias en otros parámetros farmacocinéticos como la absorción y el área bajo la curva. Debido a los efectos indeseables relacionados con la reducción en la biotransformación del metronidazol, los autores ilustraron con este trabajo la necesidad de realizar estudios farmacocinéticos para individualizar las dosis de los fármacos en condiciones especiales como la desnutrición. En otro estudio, Mehta et al. (56) encontraron que después de la administración por vía oral de acetaminofen se presentó una disminución significativa en la constante de velocidad de eliminación y un aumento en la vida media en niños desnutridos, al mismo tiempo que observaron un aumento significativo en el área bajo la curva de las concentraciones plasmáticas del fármaco en función del tiempo. Estos ejemplos muestran que el efecto de la desnutrición sobre la farmacocinética es diferente en cada fármaco, por lo que es necesario realizar estudios individualizados de fármacos que se pretendan usar en niños desnutridos. Sin embargo, existen muchos inconvenientes para realizar este tipo de estudios en niños, pues en general el tamaño de muestra es pequeño y en muchas ocasiones los padres se rehúsan a que sus hijos participen en los estudios. Por lo

anterior, los modelos de desnutrición en animales son sumamente útiles para comprender los cambios farmacocinéticos que podrían ocurrir durante la desnutrición.

Los estudios farmacocinéticos en modelos animales de desnutrición encontrados en la literatura (33-36) se han realizado en animales que han sido alimentados con dietas con un bajo contenido de caseína (5% en la dieta), proteína que es convertida de manera eficiente en proteína corporal por los animales. Por otro lado, en estos estudios se han evaluado fármacos que son biotransformados de manera extensa en el organismo, por lo que la mayor parte de las modificaciones observadas en los procesos farmacocinéticos se deben a una disminución en la actividad de los sistemas enzimáticos involucrados en el metabolismo de estos fármacos. Por ejemplo, después de una administración por vía intravenosa de la azosemida, la claritromicina y el oltipraz, se encontraron concentraciones plasmáticas y área bajo la curva significativamente mayores en grupos de animales desnutridos con respecto a los testigos. Todos estos fármacos son biotransformado por diversos miembros de la familia del citocromo P450, por lo que se ha llegado a la conclusión de que el aumento observado es consecuencia de una disminución en el metabolismo (34-36). Williams et al. (57) encontraron que después de administrar ketamina por vía intramuscular a animales desnutridos, se presentó un aumento en la velocidad de absorción del fármaco, así como una disminución en la depuración del mismo; los autores propusieron que la disminución en la depuración se debió a disminución en la actividad de las enzimas del citocromo P450 que metabolizan a la ketamina, y que el aumento en la velocidad de absorción se debió a la menor masa muscular en los animales.

Considerando que la axetil cefuroxima podría ser útil en el tratamiento de infecciones asociadas con la desnutrición, el presente trabajo tuvo como principal objetivo evaluar el efecto de la desnutrición en la farmacocinética de este antibiótico. A diferencia de los estudios mencionados anteriormente, este antibiótico no es biotransformado por ningún sistema enzimático, por lo que la modificación en los parámetros farmacocinéticos que pudiera encontrarse no podría atribuirse a modificaciones en el metabolismo del fármaco.

El perfil del primer estudio farmacocinético se presenta en la Figura No. 11, en la que se muestran las concentraciones plasmáticas de la cefuroxima en función del tiempo.



**Figura No. 11.** Estudio 1. Perfil farmacocinético de cefuroxima en plasma. Grupo T: testigo, alimentado con suficiente energía y nutrientes; grupo M: restricción energética y de todos los nutrientes; grupo K: alimentado con proteína de baja eficiencia de conversión.

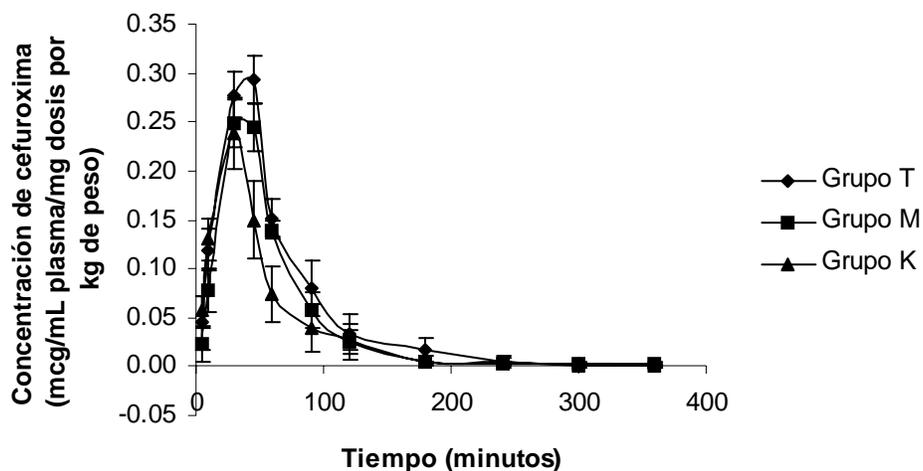
Las concentraciones plasmáticas encontradas en los grupos desnutridos fueron superiores a las presentadas por el grupo T, siendo el grupo K el que presentó las concentraciones más altas. Es probable que el comportamiento anterior se deba al hecho de que todos los animales recibieron la misma dosis de axetil cefuroxima, independientemente del peso corporal; sin embargo, el peso corporal promedio de los tres grupos evaluados mostró diferencias significativas, de tal forma que los grupos desnutridos recibieron dosis más altas del antibiótico. Con el fin de averiguar si las concentraciones más elevadas del fármaco se debieron a la dosis administrada, se evaluó el perfil farmacocinético utilizando las concentraciones plasmáticas de cefuroxima expresadas de acuerdo con la dosis administrada por kg de peso corporal.

En la Tabla No. 20 se presenta el promedio de las concentraciones plasmáticas y en la Figura No. 12 se muestra el perfil farmacocinético. El comportamiento observado en la Figura No. 12 es distinto al mostrado en la Figura No. 11, ya que los grupos desnutridos presentaron concentraciones plasmáticas menores a las observadas en el grupo testigo; el grupo K presentó las concentraciones plasmáticas más bajas, seguido por el grupo M. Con el fin de establecer si las diferencias encontradas fueron significativas, se calcularon los parámetros farmacocinéticos más importantes. Los parámetros farmacocinéticos se calcularon usando un modelo no compartimental, y los resultados se muestran en la Tabla No. 21.

**Tabla No. 20.** Estudio 1. Concentraciones plasmáticas de cefuroxima a diferentes tiempos<sup>1</sup>

Tiempo (minutos)	Grupo T ( $\mu\text{g/mL/mg/kg}$ )	Grupo M ( $\mu\text{g/mL/mg/kg}$ )	Grupo K ( $\mu\text{g/mL/mg/kg}$ )
5	$0.0669 \pm 0.0183$	$0.0640 \pm 0.0095$	$0.0495 \pm 0.0194$
10	$0.1207 \pm 0.0130$	$0.2288 \pm 0.0217$	$0.1049 \pm 0.0387$
30	$0.2564 \pm 0.0247$	$0.2559 \pm 0.0551$	$0.2058 \pm 0.0448$
45	$0.3078 \pm 0.0987$	$0.2918 \pm 0.0377$	$0.1692 \pm 0.0457$
60	$0.1643 \pm 0.0112$	$0.1441 \pm 0.0031$	$0.0994 \pm 0.0089$
90	$0.1035 \pm 0.0177$	$0.0620 \pm 0.0183$	$0.0696 \pm 0.0318$
120	$0.0245 \pm 0.0153$	$0.0186 \pm 0.0064$	$0.0361 \pm 0.0055$
180	$0.0252 \pm 0.0108$	$0.0020 \pm 0.0002$	$0.0094 \pm 0.0018$
240	$0.0089 \pm 0.0043$	$0.0056 \pm 0.0031$	$0.0018 \pm 0.0001$
300	$0.0022 \pm 0.0005$	$0.0038 \pm 0.0036$	$0.0011 \pm 0.0003$
360	$0.0035 \pm 0.0016$	$0.0046 \pm 0.0027$	$0.0010 \pm 0.0004$

<sup>1</sup> Los valores representan el promedio  $\pm$  DE



**Figura No. 12.** Estudio 1. Perfil farmacocinético de cefuroxima en plasma de acuerdo con la dosis administrada por kg de peso corporal. Grupo T: testigo, alimentado con suficiente energía y nutrientes; grupo M: restricción energética y de todos los nutrientes; grupo K: alimentado con proteína de baja eficiencia de conversión.

**Tabla No. 21.** Estudio 1. Parámetros farmacocinéticos de la cefuroxima<sup>1,2</sup>

	Grupo T	Grupo M	Grupo K
$C_{max}/D$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$0.32 \pm 0.03$	$0.27 \pm 0.04$	$0.24 \pm 0.04^a$
$ABC/D$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{kg}/\text{mL}/\text{mg}$ )	$23.9 \pm 1.2$	$18.7 \pm 1.5^b$	$15.4 \pm 0.7^a$
$V_z/F$ (L/kg)	$2.6 \pm 0.5$	$4.1 \pm 0.2^a$	$4.6 \pm 0.4^a$
$Cl/F$ (L/min/kg)	$0.043 \pm 0.003$	$0.054 \pm 0.004^a$	$0.065 \pm 0.003^b$
$t_{1/2}$ (min)	$37.6 \pm 8.5$	$37.0 \pm 3.5$	$36.9 \pm 1.9$
TMR (min)	$73.2 \pm 5.6$	$63.0 \pm 13.7$	$64.5 \pm 5.6$

<sup>1</sup> Los superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo; letras diferentes indican diferencia significativa entre los grupos M y K con  $P < 0.05$ ,  $n = 10$

<sup>2</sup> Los valores representan promedio  $\pm$  DE,  $n = 3$

$C_{max}/D$ : concentración plasmática máxima expresada de acuerdo a la dosis por peso corporal;  $ABC/D$ : área bajo la curva expresada de acuerdo a la dosis por peso corporal;  $V_z/F$ : volumen aparente de distribución;  $Cl/F$ : depuración aparente;  $t_{1/2}$ : tiempo de vida media de eliminación; TMR: tiempo medio de residencia

La concentración plasmática máxima fue significativamente menor en el grupo K, mientras que entre los grupos M y T no se presentaron diferencias. En el área bajo la curva sí se encontraron diferencias significativas entre los tres grupos: el grupo T presentó el valor más alto, seguido por el grupo M y finalmente por el grupo K. Al comparar los valores del área bajo la curva, la biodisponibilidad relativa (F) fue de 78.2% para el grupo M y de 64.4% para el grupo K. Los resultados anteriores indican que la fracción absorbida de axetil cefuroxima fue menor en los grupos M y K, siendo la de éste último grupo la más baja. Se ha informado que la axetil cefuroxima puede ser absorbida por medio de un transportador dependiente del pH (PepT1), además de que también puede atravesar la mucosa intestinal por medio de difusión pasiva (23). El estudio de microscopía mostró que el grupo K sufrió un daño más severo en el intestino delgado, lo que pudo haber afectado el proceso de absorción del profármaco. El daño en la mucosa intestinal puede aumentar la permeabilidad, lo que puede incrementar el paso de ciertos solutos. En el caso de la axetil

cefuroxima, aunque puede absorberse por medio de difusión pasiva, se ha demostrado que proceso más importante para su absorción es por medio del transportador, por lo que es posible que un aumento en la permeabilidad no modifique de manera significativa el paso por difusión pasiva. Por su parte, la actividad específica de las esterasas (que podría modificar la fracción de fármaco disponible para la absorción) no fue alterada en los animales desnutridos por lo que esta variable tampoco influiría en el proceso de absorción de la cefuroxima. Sin embargo, es probable que la disminución en el tamaño y el número de microvellosidades de los animales desnutridos hayan provocado una disminución en la superficie disponible para la absorción, lo que a su vez reduciría la capacidad de absorción del fármaco. Es posible que el transportador también esté afectado, lo que reduciría de manera importante la absorción de la axetil cefuroxima. El grupo M también mostró un ABC/D significativamente menor con respecto al grupo testigo, aunque la diferencia fue menor que la presentada por el grupo K, que fue el que mostró una menor biodisponibilidad relativa del antibiótico.

La vida media de eliminación de la cefuroxima no mostró diferencias significativas entre ninguno de los tres grupos, lo que sugiere que no existen modificaciones en la fase de eliminación del antibiótico. El mismo comportamiento se observa en el tiempo medio de residencia, el cual no mostró diferencias entre los tres grupos. La eliminación de un fármaco puede deberse a procesos de biotransformación o bien a la eliminación renal (principalmente). Muchos de los sistemas enzimáticos responsables de la biotransformación de los fármacos se ven afectados por la desnutrición; sin embargo, estos efectos no alteran la eliminación de la cefuroxima puesto que ésta no sufre ningún tipo de biotransformación.

En cuanto a la eliminación renal de los fármacos, ésta depende de la cantidad de fármaco libre que exista en el organismo. Cabe recordar que un número importante de fármacos se unen de manera reversible a proteínas plasmáticas como la albúmina; esta fracción unida a proteínas no está disponible para la eliminación puesto que, como se mencionó anteriormente, solo el fármaco libre puede ser excretado por la vía urinaria. La concentración de proteínas plasmáticas fue menor en los grupos desnutridos M y K al ser comparada con la concentración encontrada en el grupo testigo. Sin embargo, la cefuroxima no se une extensamente a la albúmina, por lo que la fracción de fármaco libre no se altera de manera importante por efecto del cambio en las concentraciones plasmáticas de la albúmina y por lo tanto, no se afecta el proceso de eliminación del antibiótico.

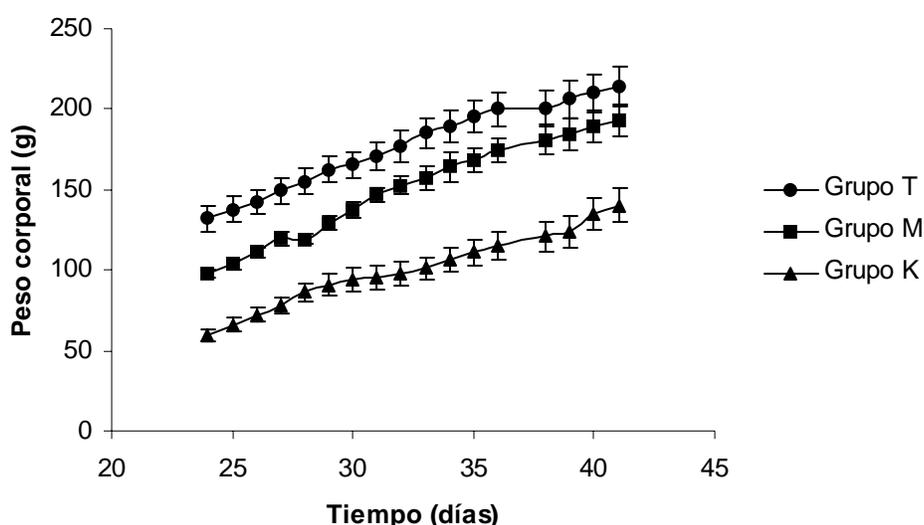
Con respecto al volumen de distribución (V/F) y a la depuración (Cl/F), se encontró que los grupos desnutridos mostraron valores significativamente superiores a los encontrados en el grupo T. Sin embargo, ambos parámetros están expresados en función de la fracción absorbida, por lo que es probable que las diferencias encontradas se deban a la menor cantidad de fármaco absorbido por estos grupos al ser comparados con el grupo testigo.

Al término del primer estudio farmacocinético se evaluó el efecto de un período de recuperación de 3 semanas en los animales desnutridos. Para esto, los grupos M y K recibieron la dieta 1 (Tabla No. 4) a libre demanda.

## 5.4.2.2 Estudio 2

### 5.4.2.2.1 Peso corporal.

En la Figura No. 13 que se muestra a continuación, se presenta el crecimiento de los grupos T, M y K durante esta segunda fase del estudio. Se registró el peso corporal con el fin de evaluar la recuperación de los grupos M y K.

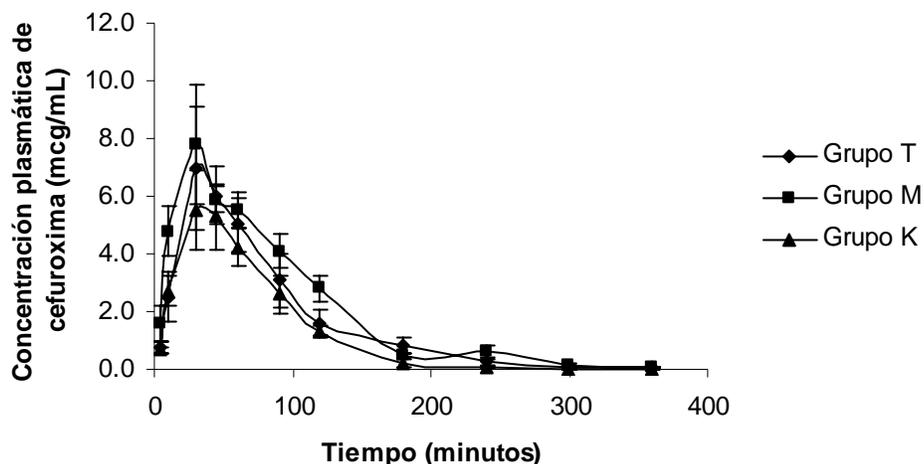


**Figura No. 13.** Incremento en peso corporal durante la fase de recuperación de los grupos desnutridos. Grupo T: testigo, alimentado con suficiente energía y nutrientes; grupo M: restricción energética y de todos los nutrientes; grupo K: alimentado con proteína de baja eficiencia de conversión.

En la tercera semana de recuperación, la pendiente de las gráficas de crecimiento se volvió muy parecida entre los tres grupos, por lo que se consideró que en esta etapa la velocidad de crecimiento fue similar entre los tres grupos. Por lo anterior, el segundo estudio farmacocinético se llevó a cabo al término de las tres semanas del período de recuperación.

#### 5.4.2.2.2 Estudio farmacocinético

En la Figura No. 14 se muestran las concentraciones plasmáticas de cefuroxima en función del tiempo después del período de recuperación de los grupos M y K.



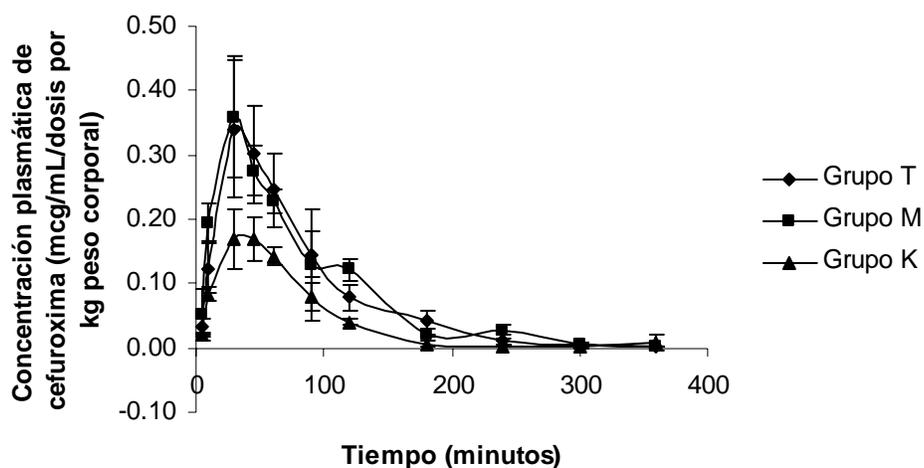
**Figura No. 14.** Estudio 2. Perfil farmacocinético de cefuroxima en plasma después del período de recuperación de los grupos desnutridos. Grupo T: testigo, alimentado con suficiente energía y nutrientes; grupo M: restricción energética y de todos los nutrientes; grupo K: alimentado con proteína de baja eficiencia de conversión.

La gráfica anterior muestra que el grupo M tiene un perfil farmacocinético similar al del grupo T, mientras que el grupo K sigue mostrando diferencias con el grupo testigo. En la Tabla No. 22 se muestran las concentraciones plasmáticas observadas, y en la Figura No. 15 se muestra el perfil correspondiente a las concentraciones de cefuroxima expresadas de acuerdo con la dosis administrada por kg de peso corporal.

**Tabla No. 22.** Estudio 2. Concentraciones plasmáticas de cefuroxima después del período de recuperación de los grupos desnutridos<sup>1</sup>

Tiempo (minutos)	Grupo T ( $\mu\text{g/mL/mg/kg}$ )	Grupo M ( $\mu\text{g/mL/mg/kg}$ )	Grupo K ( $\mu\text{g/mL/mg/kg}$ )
5	$0.0307 \pm 0.0094$	$0.0514 \pm 0.0402$	$0.0203 \pm 0.0022$
10	$0.1200 \pm 0.0391$	$0.1952 \pm 0.0292$	$0.0834 \pm 0.0100$
30	$0.3563 \pm 0.0174$	$0.3586 \pm 0.0944$	$0.1690 \pm 0.0461$
45	$0.2558 \pm 0.0571$	$0.2755 \pm 0.0396$	$0.1685 \pm 0.0333$
60	$0.2220 \pm 0.0346$	$0.2273 \pm 0.0190$	$0.1424 \pm 0.0129$
90	$0.1401 \pm 0.0189$	$0.1286 \pm 0.0871$	$0.0799 \pm 0.0213$
120	$0.0858 \pm 0.0101$	$0.1215 \pm 0.0172$	$0.0403 \pm 0.0047$
180	$0.0499 \pm 0.0105$	$0.0193 \pm 0.0005$	$0.0061 \pm 0.0047$
240	$0.0064 \pm 0.0047$	$0.0258 \pm 0.0109$	$0.0030 \pm 0.0015$
300	$0.0047 \pm 0.0049$	$0.0040 \pm 0.0038$	$0.0022 \pm 0.0027$
360	$0.0026 \pm 0.0009$	$0.0020 \pm 0.0003$	$0.0076 \pm 0.0126$

<sup>1</sup> Los valores representan el promedio  $\pm$  DE



**Figura No. 15.** Estudio 2. Perfil farmacocinético de cefuroxima en plasma de acuerdo con la dosis administrada por kg de peso corporal después del período de recuperación de los grupos desnutridos. Grupo T: testigo, alimentado con suficiente energía y nutrientes; grupo M: restricción energética y de todos los nutrientes; grupo K: alimentado con proteína de baja eficiencia de conversión.

El peso corporal del grupo K mostró diferencias significativas con los grupos T y M después de la recuperación, por lo que la dosis recibida fue superior a la de estos dos últimos grupos. En la Figura No. 15 se observa que las gráficas correspondientes a los grupos M y T son similares tanto en la fase de absorción como en la fase de eliminación del antibiótico. Sin embargo, en el grupo K se observa el mismo comportamiento encontrado en el primer estudio farmacocinético (realizado en la fase de desnutrición de los animales), pues las concentraciones plasmáticas son inferiores a las del grupo testigo.

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos con un modelo no compartimental se muestran en la Tabla No. 23.

**Tabla No. 23.** Estudio 2. Parámetros farmacocinéticos de la cefuroxima después del período de recuperación de los grupos desnutridos<sup>1,2</sup>

	Grupo T	Grupo M	Grupo K
$C_{\max}/D$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$0.35 \pm 0.01$	$0.38 \pm 0.06$	$0.20 \pm 0.02^a$
ABC/D ( $\mu\text{g}\cdot\text{min}\cdot\text{kg}/\text{mL}/\text{mg}$ )	$26.9 \pm 2.1$	$30.4 \pm 1.5$	$14.6 \pm 1.0^a$
Vz/F (L/kg)	$1.9 \pm 0.3$	$1.9 \pm 0.4$	$3.1 \pm 0.3^a$
Cl/F (L/min/kg)	$0.036 \pm 0.004$	$0.033 \pm 0.005$	$0.069 \pm 0.005^a$
$t_{1/2}$ (min)	$32.8 \pm 3.8$	$37.5 \pm 5.7$	$31.6 \pm 4.1$
TMR (min)	$84.1 \pm 3.1$	$79.1 \pm 5.3$	$83.9 \pm 22.9$

<sup>1</sup> Los superíndices indican diferencia significativa con respecto al grupo testigo con  $P < 0.05$ ,  $n = 10$

<sup>2</sup> Los valores representan promedio  $\pm$  DE,  $n = 3$

$C_{\max}/D$ : concentración plasmática máxima expresada de acuerdo a la dosis por peso corporal; ABC/D: área bajo la curva expresada de acuerdo a la dosis por peso corporal; Vz/F: volumen aparente de distribución; Cl/F: depuración aparente;  $t_{1/2}$ : tiempo de vida media de eliminación; TMR: tiempo medio de residencia

Los parámetros farmacocinéticos obtenidos en el período de recuperación muestran que el grupo M presentó un comportamiento similar al del grupo testigo, pues no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados. A diferencia de este comportamiento, el grupo K presentó un perfil farmacocinético similar al encontrado en el primer estudio, pues se encontraron valores significativamente menores en  $C_{m\acute{a}x}$  y en ABC/D con respecto a los otros dos grupos. La biodisponibilidad relativa, F, para el grupo K fue de 54%. La depuración y el volumen de distribución también mostraron diferencias con respecto a los grupos T y M, pero, de forma análoga a lo discutido para el primer estudio farmacocinético, es posible que ambos parámetros estén modificados por la fracción absorbida del fármaco; de esta manera, no es posible afirmar que la depuración y el volumen de distribución se hayan modificado en el grupo K. Finalmente, y de forma similar a los resultados obtenidos en el primer estudio farmacocinético, no se encontraron diferencias significativas en la vida media y en el tiempo medio de residencia. Esto significa que la absorción de la axetil cefuroxima fue menor en el grupo K, mientras que la fase de eliminación del antibiótico no se modificó, pues no mostró diferencias con el grupo testigo.

Los resultados anteriores muestran que en el grupo M se restableció la capacidad de absorción de la axetil cefuroxima, pues el proceso farmacocinético resultó similar al del grupo testigo. Esto estaría de acuerdo con la recuperación observada en el peso corporal del grupo M, pues al final de la segunda fase del estudio, los grupos M y T no mostraron diferencias significativas. A diferencia de lo anterior, en el caso del grupo K no se observó recuperación en la absorción, pues el proceso farmacocinético fue similar al encontrado en

la fase de desnutrición. Esto también puede relacionarse con el peso corporal de este grupo, pues los animales del grupo K no mostraron recuperación después de tres semanas, pues el peso corporal fue significativamente menor con respecto al grupo T.

Este estudio demuestra que la axetil cefuroxima ve modificada su absorción en la desnutrición; sin embargo, los efectos fueron distintos dependiendo de las deficiencias nutricias que están presentes. A diferencia de otros fármacos estudiados, la cefuroxima no sufre procesos de biotransformación, por lo que los cambios observados en la farmacocinética no dependen del metabolismo, sino únicamente de la absorción, ya que tampoco se encontraron cambios en el proceso de eliminación del antibiótico. Este estudio también demuestra que es necesario contar con modelos de desnutrición que permitan evaluar el efecto de cada tipo de desnutrición en la cinética de los fármacos empleados en los individuos afectados por esta enfermedad. Finalmente, se demuestra que cada fármaco sufre modificaciones distintas en la farmacocinética por efecto de la desnutrición, por lo que los modelos desarrollados permitirían la evaluación de los diversos fármacos empleados en la desnutrición.

## 6. Conclusiones

Se obtuvieron dos modelos de desnutrición energético proteínica en ratas con características similares a las observadas en el marasmo y el kwashiorkor.

Se encontró una reducción en la concentración de proteínas plasmáticas y aumento en el contenido de grasa en el hígado en el grupo K, cambios bioquímicos característicos del kwashiorkor.

Se observaron alteraciones morfológicas en el intestino delgado de los grupos desnutridos, principalmente en el grupo K.

Los grupos desnutridos M y K presentaron diferencias en el perfil farmacocinético de la cefuroxima. Se encontró menor absorción del fármaco con respecto al grupo testigo.

No se encontraron diferencias en la fase de eliminación de la cefuroxima de los grupos desnutridos con respecto al testigo.

Después de un período de recuperación de tres semanas se observó que el grupo M mostró un perfil farmacocinético similar al del grupo testigo. Sin embargo, el grupo K siguió mostrando las diferencias encontradas en los animales desnutridos, pues se observó una menor absorción del fármaco con respecto al grupo testigo, aunque no se encontraron diferencias en el proceso de eliminación de la cefuroxima.

El modelo de desnutrición del grupo K presentó una desnutrición más severa por lo que no fue posible su recuperación plena después de un período de tres semanas.

### **Perspectivas**

Los resultados del presente estudio demuestran la necesidad de estudiar a fondo el efecto que la desnutrición energético proteínica puede producir sobre el proceso farmacocinético. Las características particulares de cada fármaco hacen necesaria la evaluación individual de aquellos fármacos que se pretendan emplear en individuos desnutridos. Los modelos desarrollados en este proyecto permitirán llevar a cabo estudios de diversos fármacos y así evaluar si son necesarias modificaciones en las dosis a administrar en la desnutrición.

Al mismo tiempo se deben estudiar más extensamente los modelos de desnutrición aquí desarrollados para confirmar cambios en los sistemas enzimáticos encargados de procesos de biotransformación y otros factores importantes para el proceso farmacocinético.

**Bibliografía**

1. Toussaint, G., García, J. (2000). Desnutrición energético-proteínica. En Casanueva, E., Kaufer-Horwitz, M., Pérez-Lizaur, A. & Arroyo, P. (Eds), *Nutriología Médica*, (2a ed.) (pp. 211-238). México, D.F.: Editorial Médica Panamericana.
2. Ávila Curiel Abelardo, Shamah Levy Teresa. Diagnóstico de la magnitud de la desnutrición infantil en México. En: México ante los desafíos de desarrollo del milenio, Zúñiga Herrera Elena, coordinadora. Consejo Nacional de Población, México, páginas 99-125, 2005.
3. Torún, B., Chew, F. (1994). Protein-energy malnutrition. In Shils, M.E., Olson J.A., Shike M., (Eds), *Modern Nutrition in Health and Disease, Vol. 2.* (pp. 950-976), Philadelphia: Lea and Febiger.
4. Gómez, F.(1946). Desnutrición. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México*, 3:543-551.
5. Gómez, F. (2003). Desnutrición. *Salud Pública de México*, 45(suplemento 4):S576-S582.
6. Waterlow, J.C. (1996). *Malnutrición proteico-energética*. Washington, D.C: Organización Panamericana de la Salud, Publicación Científica No. 555.
7. Frenk, S. (1989). Adaptación metabólica en la desnutrición. *Cuadernos de nutrición*, 12(5):17-32.
8. Müller, O., Krawinkel, M (2005). Malnutrition and health in developing countries. *Canadian Medical Association Journal*, 173(3):279-286.

9. Chandra, R.K. (1983). Nutrition, immunity, and infection: present knowledge and future directions. *The Lancet*, 26(1):688-691.
10. Management of the child with a serious infection or severe malnutrition. Geneva: World Health Organization, 2000.
11. Scott, J. A., Mwarumba, S., Ngetsa, C., Njenga, S., Lowe, B. S., Slack, M. P., Berkley, J. A., Mwangi, I., Maitland, K., English, M., Marsh, K (2005). Progressive increase in antimicrobial resistance among invasive isolates of *Haemophilus influenzae* obtained from children admitted to a hospital in Kilifi, Kenya, from 1994 to 2002. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 49(7):3021-3024.
12. Krishnaswamy K (1989). Drug metabolism and pharmacokinetics in malnourished children. *Clinical Pharmacokinetics.*, 17,Suppl 1:66-88.
13. Utermohlen, V. (2000). Diet, Nutrition, and Drug Interactions. In Ziegler, E. & Filer, L. (Eds.), *Present Knowledge in Nutrition* (8<sup>th</sup> ed.) (pp. 1619-1639). Washington, D.C.: ILSI Press.
14. Rang, H.P., Dale, M.M., Ritter, J.M. & Moore, P.K. (2003) *Pharmacology* (5<sup>th</sup> ed.). London, UK: Churchill Livingstone.
15. Brewster, D.R., Manary, M.J., Menzies, I.S., O'Loughlin, E.V. & Henry, R.L. (1997). Intestinal permeability in kwashiorkor. *Archives of Disease in Childhood*, 76:236-241.
16. Walter-Sack, I. Y. & Klotz, U. (1996). Influence of diet and nutritional status on drug metabolism. *Clinical Pharmacokinetics*, 31(1):47-64.

17. Campbell, T.C. (1977). Nutrition and drug metabolizing enzymes. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 22:699-706.
18. Netter K. (1994). The role of nutrients in detoxification mechanisms. In Kotsonis, N., Mackey, M. & Hjelle, J. (Eds.), *Nutritional Toxicology* (pp. ). New York: Raven Press.
19. Hashmi, R.S., Siddiqui, A.M., Kachole, M.S. & Pawar, S.S. (1986). Alterations in hepatic microsomal mixed-function oxidase system during different levels of food restriction in adult male and female rats. *Journal of Nutrition*, 116:682-688.
20. Kyung, M., Gyoon, Y., Gull, M. & Geon, S. (1999). Supression of rat hepatic cytochrome P450s by protein-calorie malnutrition: complete or partial restoration by cysteine or methionine supplementation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 372(1):150-158.
21. Harding, S.M., Williams, P.E.O. & Ayrton, J. (1984). Pharmacology of cefuroxime as the 1-acetoxyethyl ester in volunteers. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 25:78-82.
22. Mosher, G.L, McBee, J. & Shaw, D.B. (1992). Esterase activity toward the diastereomers of cefuroxime axetil in the rat and dog. *Pharmaceutical Research*, 9(5):687-689.
23. Ruiz-Balaguer, N., Nacher, A., Casabo, V.G. & Merino Sanjuán, M. (2002). Intestinal transport of cefuroxime axetil in rats: absorption and hydrolysis proceses. *International Journal of Pharmaceutics* 234:101-111.

24. Ruiz-Carretero, P., Nacher, A., Merino-Sanjuan, M. & Casabo, V.G. (2000). Pharmacokinetics and absolute bioavailability of oral cefuroxime axetil in the rat. *International Journal of Pharmacokinetics* 202:89-96.
25. Mansour, S., Al-Khamis, K. & Niazy, E. (2000). Bioequivalence evaluation of two brands of cefuroxime 500 mg tablets (Cefuzime and Zinnat) in healthy human volunteers. *Biopharmaceutics and Drug Disposition*, 21:205-210.
26. Mylotte, J. & Weislo, P. (2000). Antibiotic use and cost indicators at a rural hospital: a pilot project. *American Journal of Infection Control*, 28(6):415-420.
27. NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados.
28. Guerci, A. (1988). *Laboratorio. Métodos de análisis clínicos y su interpretación*. Buenos Aires: El Ateneo.
29. Folch, J., Lees, M. & Sloane Stanley, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *Journal of Biological Chemistry*, 226:497-509.
30. Hartree, E.F. (1972). Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Analytical Biochemistry*, 48:422-427.
31. Al-Said, M.S., Al-Khamis, K.I., Niazy, E.M., El-Sayed, Y.M., Al-Rashood, K.A., Al-Bella, S., Al-Yamani, M.A., Al-Najjar, T.A., Alam, S.M., Dham, R. & Qumaruzaman, Q.Z. (2000). Bioequivalence evaluation of two brands of

- cefuroxime 500 mg tablets (Cefuzime<sup>®</sup> and Zinnat<sup>®</sup> in healthy human volunteers. *Biopharmaceutics & Drug Disposition*, 21:205-210.
32. Heard, C.R.C., Frangi, S. M. & Wright P.M. (1977). Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition: an experimental model using young rats. *British Journal of Nutrition*, 37(1):1-21.
33. Kim, Y.G., Cho, M.K., Kwon, W.J., Kim, S.G., Chung, S.J., Shim, C.K., Lee & M.G. (2001). Effects of cysteine on the pharmacokinetics of intravenous phenytoin in rats with protein-calorie malnutrition. *International Journal of Pharmaceutics*, 229:45-55.
34. Kim, Y.G., Cho, M.K., Kwon, J.W., Kim, S.G., Kim, S.H. & Lee, M.G. (2001). Effects of cysteine on the pharmacokinetics and pharmacodynamics of intravenous and oral azosemide in rats with protein-calorie malnutrition. *Life Sciences*, 68:2329-2345.
35. Ahn, C.Y., Kim, E.J., Kwon, J.W., Chung, S.J., Kim, S.G., Shim, C.K. & Lee, M.G. (2003). Effects of cysteine on the pharmacokinetics of intravenous clarithromycin in rats with protein-calorie malnutrition. *Life Sciences*, 72:1783-1794.
36. Bae S.K., Yang, S.H., Kim, J.W., Kim, T., Kwon, J.W. & Lee, M.G. (2005). Effects of cysteine on the pharmacokinetics of oltipraz in rats with protein-calorie malnutrition. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94(7):1484-1493.
37. Udaya, M., Kabadi, A.B. Eisenstein, I.S. (1976). Decrease plasma insulin but normal glucagon in rats fed low protein diets. *Journal of Nutrition*., 106:1247-1253.

38. Tulp, O., Gambert, S. & Horton, E.S. (1979). Adipose tissue development, growth, and food consumption in protein-malnourished rats. *Journal of Lipid Research*, 20:47-54.
39. Tulp, O.L. & Horton, E.S. (1981). Effect of prolonged experimental protein malnutrition and of refeeding on growth, adipose tissue development and body composition in rats. *Journal of Nutrition*, 111:1145-1156.
40. Sanahuja, J.C. & Harper, A.E.(1963). Amino acid balance and imbalance. XII Effect of amino acid imbalance on self-selection of diet by the rat. *Journal of Nutrition*, 81:363-371.
41. Musten, B., Peace, D. & Anderson, G.H. (1974). Food intake regulation in the weanling rat: self-selection of protein and energy. *Journal of Nutrition*, 104:563-572.
42. Peng, Y., Meliza, L.L., Vavich, M.G. & Kemmerer, A.R. (1975). Effects of amino acid imbalance and protein content of diets of food intake and preference of young, adult, and diabetic rats. *Journal of Nutrition*, 105:1395-1404.
43. Syme, G. (1982). The effect of protein-deficient isoenergetic diets on the growth of rat jejunal mucosa. *Brithish Journal of Nutrition*, 48:25-36.
44. Edozien, C. (1968). Experimental kwashiorkor and marasmus. *Nature*, 220:917-919.
45. Fletcher, K. (1966). Observations on the origin of liver fat in infantile malnutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 19:170-174.

46. Lewis, B., Hansen, J. D. L., Wittmann, W., Krut, L. H. & Stewart, F. (1964). Plasma free fatty acids in kwashiorkor and pathogenesis of the fatty liver. *American Journal of Clinical Nutrition*, 15:161-168.
47. Iputo, J.E., Wong, W.W. & Klein, P.D. (1998). Impaired dietary lipid oxidation in kwashiorkor. *Nutrition Research*, 18:1187-1201.
48. Burman, D. (1965). The jejunal mucosa in kwashiorkor. *Archives of Disease in Childhood*, 40(213):526-531.
49. Stanfield, J.P., Hutt, M.S.R. & Tunnicliffe, R. (1965). Intestinal biopsy in kwashiorkor. *Lancet*, 11,2(7411):519-523.
50. Viteri, F.E., Flores, J.M., Alvarado, J. & Behar, M. (1973). Intestinal malabsorption in malnourished children before and during recovery. Relation between severity of protein deficiency and the malabsorption process. *The American Journal of Digestive Diseases*, 18:201-211.
51. Zambonino Infante, J. L., Rouanet, J. M. & Besancon, P. (1993). Mathematical correlation between villus height and the nutritional state in Sprague-Dawley rats. *Gut*, 34:1066-1068.
52. Rossi, T.M., Lee P.C., Young, C.M., Lerner, A. & Lebenthal, E. (1986). Effect of nutritional rehabilitation on the development of intestinal brush border disaccharidases of postnatally malnourished weanling rats. *Pediatric Research*, 20(8):793-797.

53. Firmansyah, A., Suwandito, L., Penn, D. & Lebenthal, E. (1989). Biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats after prenatal and postnatal malnutrition. *American Journal of Clinical Nutrition*, 50:261-268.
54. Lares-Asseff, I., Cravioto, J., Santiago, P. & Pérez-Ortíz, B. (1992). Pharmacokinetics of metronidazole in severely malnourished and nutritionally rehabilitated children. *Clinical Pharmacology & Therapeutics*, 51:42-50.
55. Lares-Asseff, I., Cravioto, J., Santiago, P. & Pérez-Ortíz, B. (1993). A new dosing regimen for metronidazole in malnourished children. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, 25:115-121.
56. Mehta, S., Nain, C.K., Yadav, D., Sharma, B. & Mathur, V.S. (1985). Disposition of acetaminophen in children with protein calorie malnutrition. *International Journal of Clinical Pharmacology, Therapy and Toxicology*, 23(6):311-315.
57. Williams, M.L., Mager, D.E., Parenteau, H., Gudi, G., Tracy, T.S., Mulheran, M. & Wainer, I.W. (2004). Effect of protein calorie malnutrition on the pharmacokinetics of ketamine in rats. *Drug Metabolism and Disposition*, 32(8):786-793.

**Anexo**

**Artículo publicado**

**“Effect of malnutrition on the pharmacokinetics of  
cefuroxime axetil in young rats”**

**Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, 11(1):9-21, 2008**

## Effect of malnutrition on the pharmacokinetics of cefuroxime axetil in young rats

Iliana González-Hernández<sup>1</sup>, Helgi Jung-Cook<sup>1</sup>, Angela Sotelo<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cd. Universitaria, México, D.F., 04510, México.

Received July 3, 2007; Revised October 29, 2007; Accepted January 23, 2008; Published January 30, 2008.

**ABSTRACT – PURPOSE.** To determine the pharmacokinetics of cefuroxime axetil in malnourished rats using a diet with a restriction in energy and nutrients (group M), a diet with a low quality protein (group K) and a good quality diet (group C) as a control. **METHODS.** The rats were fed with the corresponding diet for 21 days, after which a single oral dose of cefuroxime axetil (equivalent to a 2.2 mg dose of cefuroxime) was administered and plasma samples were taken at 0, 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes; samples were assayed using an HPLC assay. Biochemical parameters were measured and a microscopy study of the small intestine was carried out. After a 21 day period of recovery of the malnourished groups a second pharmacokinetic study was performed using the same sample times as those in the first study. **RESULTS.** In malnourished animals of group K the levels of plasma proteins were low and the concentrations of fat in the liver were high. The relative bioavailability of cefuroxime was 78.2% for group M and 64.4% for group K. Groups M and K presented lower values of area under the curve; this means that the amount of antibiotic absorbed was lower than that of group C. In the second pharmacokinetic study although the animals received a good quality diet, it was observed that the area under the curve of group K was lower; the relative bioavailability was 54.3%, while group M had pharmacokinetic values similar to those of the control group. **CONCLUSIONS.** The pharmacokinetics of cefuroxime was affected by malnutrition, suggesting that the absorption process via the transporter was modified in the malnourished groups, especially in the group fed with low quality protein.

## INTRODUCTION

Severe protein energy malnutrition in children can be characterized by different syndromes known as marasmus and kwashiorkor. The factors determining whether kwashiorkor or marasmus develops remain unknown. Among other causes, diet has been proposed as a determinant factor for the development of a specific type of malnutrition. Kwashiorkor is related to the frequent use of diets poor in protein or low in good quality protein although rich in carbohydrates. Marasmus, on the other hand, is related principally to an energy deficit or to inadequate amounts of a good quality diet (1,2). Other factors such as the adaptation of the organism, for example, have been proposed as determinants. Marasmus has been described as an adaptation to a deficient energy and protein intake and kwashiorkor is considered as a dysadaptation (2,3). It would be helpful to establish if dietary patterns could result in one of the two types of malnutrition.

Some biochemical parameters have been used to determine the presence of malnutrition. When protein depletion becomes too severe, the adaptive mechanisms fail and the concentration of serum proteins, especially albumin, decreases. In kwashiorkor, protein deficit is higher than it is in marasmus, and for this reason, plasma proteins are in lower concentrations in kwashiorkor (4, 5). On the other hand, the presence of a fatty liver in children with kwashiorkor has been found.

---

**Corresponding Author:** Departamento de Farmacia, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Cd. Universitaria, México, D.F., México Tel (55) 56 22 52 81, E-mail [angela@servidor.unam.mx](mailto:angela@servidor.unam.mx)

This biochemical change in the liver is not observed in marasmus and could be used to differentiate between the two types of severe malnutrition (6). Another characteristic of kwashiorkor is the presence of edema. It has been proposed that a decreased synthesis of plasma proteins in the liver, particularly albumin, reduces intravascular oncotic pressure. Plasma water decreases and accumulates in extravascular tissues, thus contributing to the appearance of edema.

It has been established that there is a close relationship between malnutrition and infection. Infectious diseases are major contributing and precipitating factors in protein energy malnutrition (7). The most common infections in malnourished children are those of the upper and lower respiratory tract, urinary tract infections, otitis and shigellosis, amongst others (1, 8). For this reason, it is necessary to use antibiotics for the treatment of malnourished children. The initial phase of the treatment, once a child is admitted to a hospital, is the administration of antibiotics and the treatment of electrolyte disturbances. The World Health Organization (WHO) recommends that all children with severe malnutrition receive parenteral ampicillin and gentamicin (9). These antibiotics are chosen because they are cheap and widely available. However, it has been demonstrated that some of the organisms related to the infections are resistant to this antimicrobial regimen (10); for this reason it may be necessary to use other types of antibiotics. Considering that in malnutrition there may be a great number of changes in pharmacokinetic or pharmacodynamic processes of xenobiotics (11-13), it is important to investigate these changes for the proper treatment of patients in order to reach appropriate concentrations of the antibiotic in the organism and avoid toxic effects of the drug.

The effects of malnutrition on drug absorption are not well characterized in the literature. For drugs that are taken via the oral route it is necessary to consider that absorption can be altered by malnutrition because of changes in the small intestine of malnourished children, which is the principal site of absorption. In the case of kwashiorkor, it has been observed that the degree of intestinal mucosa damage is an important contributor to the poor response of antibiotics in children. The changes produced in the small intestine include the combination of an increased

capacity of permeation due to impaired barrier function and a decrease of absorption of some solutes owing to less absorptive surface area (14). Severe mucosal injury is more common in kwashiorkor, possibly due to the effect of protein depletion on mucosal recovery (15).

An antibiotic that is commonly used in the treatment of a variety of infections in children is cefuroxime, which is a broad-spectrum,  $\beta$ -lactamase-stable cephalosporin. In humans, gastrointestinal absorption of cefuroxime is negligible, whereas the acetoxyethyl ester of cefuroxime (cefuroxime axetil), an oral prodrug, shows bioavailability of 30 to 40% when taken before eating and 50 to 60% when taken after food. This prodrug is the form that has been used in children most frequently (16-18). Following absorption from the gastrointestinal tract, cefuroxime axetil is rapidly hydrolyzed by non-specific blood esterases into cefuroxime and acetaldehyde. It has been found that prior to absorption cefuroxime axetil can be hydrolyzed in the intestinal mucosa to the non absorbable cefuroxime, this hydrolysis being proposed as one of the causes of incomplete bioavailability of the prodrug (19-22).

There are no reports on the effects of malnutrition on the pharmacokinetics of cefuroxime axetil in the published literature. This study, therefore, describes the effects of two types of malnutrition models similar to marasmus and kwashiorkor on the pharmacokinetics of cefuroxime axetil.

## MATERIALS AND METHODS

**Chemicals.** Cefuroxime and cefuroxime axetil were provided by Kendrick Laboratories (Mexico City, Mexico). Acetonitrile and methanol were HPLC grade and were purchased from J.T. Baker (Philipsburg, NJ, USA). Bovine serum albumin and Folin reagent were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), and chloroform,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , HCl, NaCl were of analytical grade.

**Diets.** In the present study two different diets were used in order to generate malnutrition types similar to marasmus and kwashiorkor.

The diets were prepared in powder form, and the protein sources used were casein, maize

flour, powdered milk and gelatin with appropriate additions of vitamin and mineral mixtures. The composition of the diets is shown in Table 1. Diet 1 was of good quality with sufficient amounts of energy and nutrients. A mixture of milk and casein was used to provide a good quality protein. Diet 2 consisted of a cereal as the principal source of proteins and carbohydrates. These type of diets (based on cereals) usually have a low or similar protein content as good quality diets, but the quality of the protein is frequently low. The protein mixture used for diet 2 was made with maize flour, having a low content of tryptophan, which makes this protein of low quality. In order to increase the protein content in the diet, gelatin (which has also a deficit in tryptophan) was used in the mixture. The protein content of diet 1 was 150g/kg with an energy content of 17.7 MJ/kg (good quality diet used for the control group) while for diet 2 the protein content was 130g/kg and the energy content was 17.3 MJ/kg (protein deficient diet). The total content of carbohydrates and lipids was the same for both diets (590g/kg and 140g/kg, respectively).

To adjust these contents, the composition of protein sources in diet 2 was considered, and dextrans, sucrose, dextrose as well as vegetable oil and lard were added in order to adjust carbohydrate and lipid content, respectively. The protein, fat, carbohydrate and fiber contents were determined using the AOAC analytical techniques (23).

**Animals.** The study protocol complied with the "Guide to the Care and Use of Experimental Animal Care" and was approved by the Animal Ethics Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Newly weaned 21 days old male Sprague-Dawley rats (Harlan, Mexico City, Mexico) weighing 35-40 g were used.

A total of 138 rats were divided into three treatment groups of 46 rats each (ten animals were used for the biochemical determinations and for the microscopy study, while the rest of the animals were used for the pharmacokinetic studies). The groups formed were: group C (control group), group M (malnutrition type similar to marasmus),

**Table 1.** Composition of the diets

Ingredients (g/kg)	Diet 1	Diet 2
Casein (89.19% crude protein)	84.3	-
Powdered milk <sup>1</sup>	285.2	49.7
Maize flour <sup>2</sup>	-	641.8
Gelatin <sup>3</sup>	-	56.7
Sucrose	159.6	35.8
Dextrose	181.4	39.8
Dextrinized maize starch <sup>4</sup>	137.8	30.9
Lard	36.4	57.7
Maize oil	27.3	42.8
Cellulose	45.9	-
Vitamin mix <sup>5</sup>	20.0	20.0
Roger-Harper mineral mix <sup>6</sup>	22.1	24.8
Total protein content (g/kg)	150.0	130.0
Energy MJ/kg	17.7	17.3

<sup>1</sup> Nido®, <sup>2</sup> Maseca®, <sup>3</sup> Knox®, <sup>4</sup> Maizena®, <sup>5</sup> ICN Pharmaceutical 904654, Cleveland, vitamin mix (g kg<sup>-1</sup> mixture): vitamin A acetate 1.8, vitamin D<sub>2</sub> 0.125, DL- $\alpha$ -tocopherol acetate 22.0, ascorbic acid 45.0, inositol 5.0, choline chloride 75, menadione 2.25, p-aminobenzoic acid 5.0, niacin 4.25, riboflavin 1.0, pyridoxine hydrochloride 1.0, thiamine hydrochloride 1.0, calcium pantothenate 3.0, biotin 0.02, folic acid 0.09, vitamin B<sub>12</sub> 0.00135; <sup>6</sup> ICN Pharmaceutical 902842, Cleveland, mineral mix (g kg<sup>-1</sup> mixture): Ammonium molybdate 0.03, calcium carbonate 292.9, calcium phosphate.dibasic 2H<sub>2</sub>O 4.3, cupric sulfate 1.56, ferric citrate (16-17% Fe) 6.23, magnesium sulfate.7H<sub>2</sub>O 99.8, manganese sulfate.H<sub>2</sub>O 1.21, potassium iodide 0.005, potassium phosphate 343.1, sodium chloride 250.6, sodium selenite 0.02, zinc chloride 0.02.

and group K (malnutrition type similar to kwashiorkor). Groups C and K were fed *ad libitum* with diets 1 and 2, respectively. Group M was fed with diet 1, receiving 70% of the amount of diet consumed by group C; for this dietary regimen, in a previous study the amount of diet consumed per gram of body weight by the control group was determined and animals of group M received 70% of that amount (with respect to corporal weight).

The animals were housed in a rack with individual stainless steel cages under standard animal room conditions (19-22°C room temperature, 31-60% relative humidity, and 12-h light/dark cycle). Animals of groups C and K were allowed free access to diet and the three groups received drinking-water *ad libitum*. The dietary regimen was maintained for 3 weeks, and the body weight of the animals was monitored periodically during this period of time, after which 10 rats of each group were sacrificed to evaluate the biochemical parameters, the rest of the animals (36 rats of each group) being used for the pharmacokinetics studies. In order to evaluate the models, the body weight of the animals was used as an index of malnutrition.

**Biochemical parameters evaluation.** At the end of the 3 week period, ten animals of each group were sacrificed, and the following biochemical parameters were evaluated:

**Protein content.** Plasma, liver and proximal segment of the small intestine protein content were measured using a modified Lowry method (24).

**Total plasma protein content.** Blood was taken in centrifuge tubes with sodium citrate (0.1 mL per each mL of blood) and centrifuged at 1600g for 15 minutes to separate plasma; then the protein content was measured.

**Liver content of fat.** The liver was removed and weighed. The organ was finely minced and homogenized using a glass homogenizer equipped with a glass pestle, adding 4 mL of 0.02 M phosphate buffer per each gram of liver and adjusting the pH to 6 with HCl 0.1 N. The fat content was determined using the Folch method (25).

**Esterase activity determination.** The intestine was rinsed with isotonic saline solution and opened longitudinally. The intestinal mucosa of the proximal segment of the intestine was scraped using a glass microscope slide and the mucosa was weighed and homogenized with isotonic saline solution 1:4 (w/v). Each mixture was then homogenized using a glass homogenizer, and stored at -50°C until use. Protein content was measured, the enzymatic activity being determined by a previously reported method (20).

**Microscopy study.** This study was performed in the Instituto de Fisiología Celular of the UNAM. One animal of each group was sacrificed, and samples of the proximal segment of the intestine were obtained and immediately fixed in 4% glutaraldehyde solution for subsequent investigation by transmission electron microscopy.

**Pharmacokinetic studies.** Two pharmacokinetic studies were performed.

**Study I.** After the dietary regimen of three weeks, the first pharmacokinetic study was performed. The animals were fasted overnight and received 1.3 mL of a 2 mg/mL solution of cefuroxime axetil (dose equivalent to 2.2 mg cefuroxime) via oral intubation using a stainless steel ball-tipped gavage needle attached to an appropriate syringe. Rats were anaesthetized and blood samples (1 mL of blood per animal) were taken via orbital sinus puncture at: 0, 5, 10, 30, 45, 60, 90, 120, 180, 240, 300 and 360 minutes after the administration (n = 3 per sample time). The blood was centrifuged at 1600g for 15 minutes and the plasma samples were stored at -50 ± 3 °C until use.

**Study II.** In order to determine if a three week recovery period had an influence on the pharmacokinetics of cefuroxime, groups M and K were fed *ad libitum* using the same diet as that for group C. The feeding was maintained for 21 days, at the end of which the second pharmacokinetic study was performed using the same scheme as in period I.

**Analytical procedure for the determination of plasma cefuroxime content.** Cefuroxime was assayed using a high-performance liquid chromatography (HPLC) assay with a solid phase

extraction technique for sample preparation. For validation of the method, sodium cefuroxime was used. Briefly, solid phase extraction cartridges (OASIS HLB 30 mg, Waters Corporation, MA, USA) were conditioned with 1 mL of methanol and equilibrated with 1 mL of water, then 0.5 mL of plasma sample was added. The cartridge was washed with 1 mL of 5% methanol in water (v/v), and cefuroxime was eluted with 1 mL of methanol. The solution was evaporated to dryness and re-dissolved in 0.5 mL of mobile phase; then 50  $\mu$ L was injected into the chromatographic system. Analysis was performed on a reverse phase column (Symmetry C-18, 5  $\mu$ m, 4.6 x 150 mm, Waters Corporation, MA, USA) using a flow rate of 1.5 mL/min with acetonitrile and 0.05 M sodium dihydrogen phosphate buffer (pH 3), 13:87 (v/v) as a mobile phase. The analytical chromatographic system consisted of an Agilent 1100 (Agilent Technologies Inc., CA, USA) chromatograph with a quaternary pump, an automatic injector with a 100  $\mu$ L loop and a diode array detector set at a wavelength of 280 nm. The method was linear over the range of 0.25-10  $\mu$ g/mL. Intra-day coefficient of variation (CV%) ranged from 0.32 to 1.62% and inter-day CV ranged from 9.1 to 12.0%. The recovery was found to be in the range of 86 to 91%. The limit of quantification was 0.25  $\mu$ g/mL.

**Pharmacokinetic analysis.** Pharmacokinetic parameters were determined by a non compartmental model using a WinNonLin 4.0 program (Pharsight, Mountain View, CA, USA). The pharmacokinetic parameters evaluated were: the maximum plasma concentration of the antibiotic ( $C_{max}$ ), the area under the plasma concentration versus time curve from 0 to the last measured concentration (AUC), the area under the plasma concentration versus time from 0 to infinity ( $AUC_{0-\infty}$ ), the apparent volume of distribution ( $Vd/F$ ), the apparent clearance ( $CL/F$ ), half life ( $t_{1/2}$ ) and the mean residence time of cefuroxime (MRT).

**Statistical analysis.** Data are expressed as means  $\pm$  SD. A one-way analysis of variance (ANOVA) was applied to compare all the parameters evaluated. The Duncan test was used in order to determine any significant difference between groups M and K when compared with the control group and also

between groups M and K. Differences were considered significant at  $P < 0.05$ .

## RESULTS

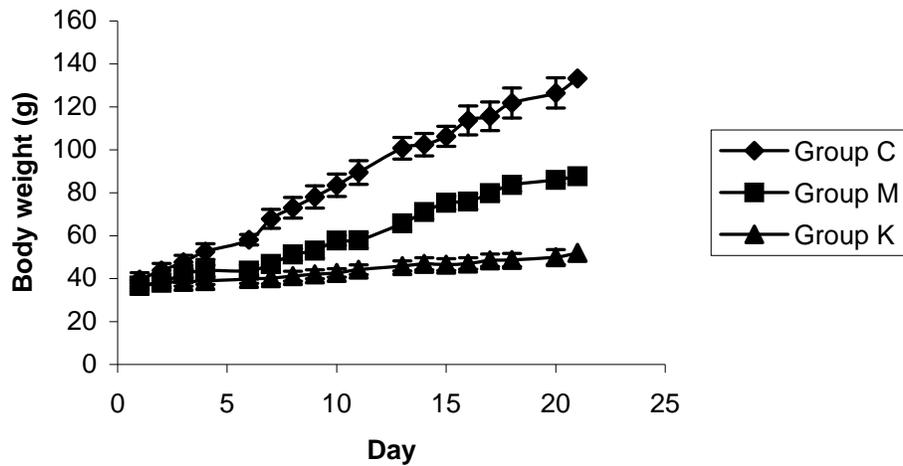
**Malnutrition models.** After 3 weeks on the dietary regimen, some of the biochemical features associated with kwashiorkor and marasmus were evident in the rats fed with a restriction in energy and nutrients (group M), and with a diet of low quality protein (group K).

The results of body weight vs. time (days) are shown in Figure 1. Table 2 shows the final weight and the amount of food consumed after 21 days of feeding. A significant difference in body weight between groups was found: group C had the highest mean body weight, while group K presented the lowest. Table 2 also shows that there was a significant difference in the total amount of food consumed by the three groups. In the case of group K, even though the animals were fed *ad libitum*, they consumed a significantly lower amount of food than the other two groups.

Biochemical parameters are shown in Table 3. It can be seen that the mean plasma protein content of group K was significantly lower ( $P < 0.05$ ). In the present study no differences in the content of lipids in the liver between group C and M were found, while group K presented significantly higher levels.

Table 4 shows the protein content and esterase activity in the proximal segment of the small intestine. Although no significant differences in the activity of small intestine esterases among the three groups were found, both malnourished groups presented lower levels of protein in this segment of the intestine.

Figures 2 A, B and C show the microscopy observations of the proximal segment of the small intestine. In control group the absorptive cells of duodenal mucosa showed a uniform pattern, microvilli having a normal appearance. In the malnourished animals of group K the microvilli were shorter, some of which appeared to be fragmented. When group M was compared with the control group it was found that although there were apparent differences in the number of villi (even though morphometric measures were not taken) these differences were less evident than those observed in group K.



**FIGURE 1.** Increase in body weight as a function of time (days) during a 21-day period in groups C (control), M (restricted in energy and nutrients) and K (fed with low quality protein). Each point represents the mean body weight  $\pm$  SD. n = 46 rats.

**Table 2.** Body weight of the animals and amount of food consumed after 21 days of feeding<sup>1</sup>

	Body weight g	Total amount of food consumed after 21 days g
Group C	133.3 $\pm$ 7.0	242.4 $\pm$ 11.7
Group M	85.9 $\pm$ 2.9 <sup>b</sup>	118.5 $\pm$ 2.6 <sup>b</sup>
Group K	51.9 $\pm$ 3.9 <sup>a</sup>	97.3 $\pm$ 8.3 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  SD n = 46

<sup>a</sup> Significantly different from group C at  $P < 0.05$ , <sup>b</sup> significantly different from groups C and K at  $P < 0.05$

**Table 3.** Biochemical parameters<sup>1</sup>

	Plasma proteins mg/mL	Liver content of fat mg lipids/g protein
Group C	25.4 $\pm$ 4.3	64.9 $\pm$ 10.9
Group M	22.3 $\pm$ 0.9	62.8 $\pm$ 7.3
Group K	19.1 $\pm$ 1.5 <sup>a</sup>	125.9 $\pm$ 7.9 <sup>a</sup>

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  SD, n = 10

<sup>a</sup> Significantly different from group C at  $P < 0.05$

**Table 4.** Protein content and esterase activity in the proximal segment of the small intestine<sup>1</sup>

	Protein content mg/g	Esterase activity $\mu$ g/mg protein/min
Group C	86.55 $\pm$ 9.5	0.0026 $\pm$ 0.0005
Group M	70.11 $\pm$ 5.3 <sup>a</sup>	0.0024 $\pm$ 0.0005
Group K	68.85 $\pm$ 4.2 <sup>a</sup>	0.0029 $\pm$ 0.0006

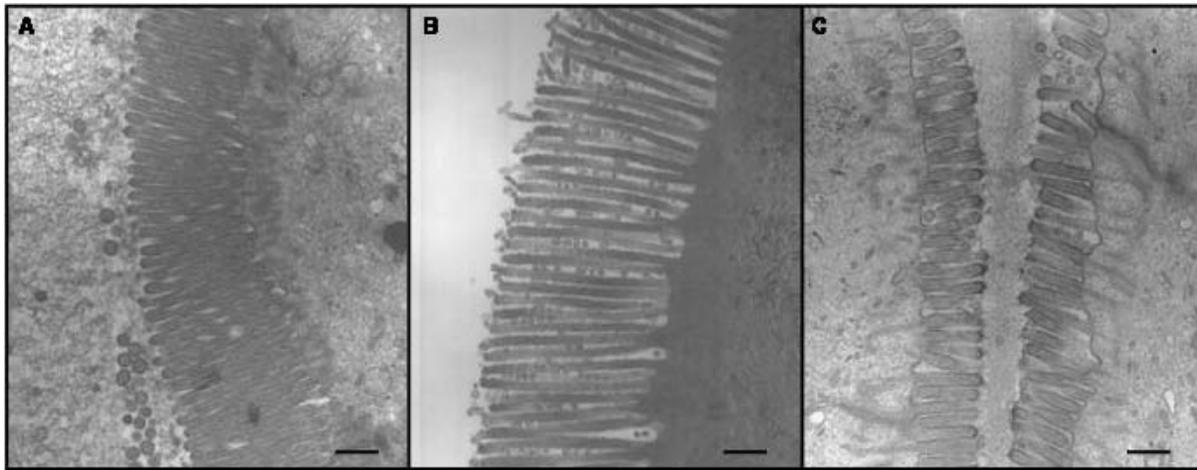
<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  SD, n = 10

<sup>a</sup> Significantly different from group C at  $P < 0.05$

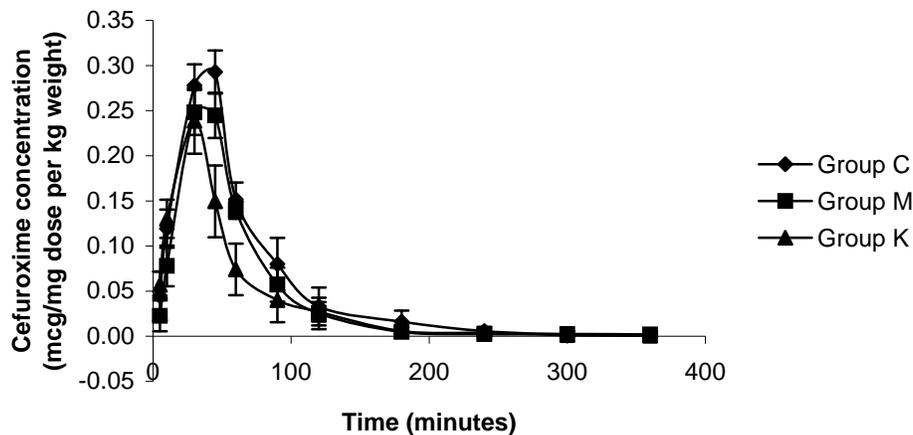
Figure 3 shows the pharmacokinetic profile of cefuroxime in plasma in the three groups from study I. In Table 5 the pharmacokinetic parameters are presented.

The AUC expressed by the dose per body weight (AUC/D) was significantly lower in malnourished groups, group K having the lowest value. When AUC/D values were compared, the

relative bioavailability (F) values were 78.2% for group M and 64.4% for group K. Significant differences were found between malnourished groups and the control group in Vz/F. Also group K presented higher Cl/F and group C had the lowest. No differences were found in  $t_{1/2}$  and MRT among the three groups.



**FIGURE 2.** TEM images of the duodenum segment of the small intestine. Figure 2A: control group; Figure 2B: group M (restricted in energy and nutrients); Figure 2C: group K (fed with low quality protein). Barr represents 500 nm.



**FIGURE 3.** Mean plasma concentrations of cefuroxime after oral administration (2.6 mg) of cefuroxime axetil in control and malnourished animals. Group C (control), Group M (restricted in energy and nutrients) and Group K (fed with low quality protein).

Figure 4 shows the increase in body weight after a three week recovery period of the malnourished groups. The gain in weight during this period showed that in the first two weeks of recovery period animals of groups M and K presented a greater weight gain rate than that of the control group. However, the rate of growth of the three

groups was similar during the third week, and the slope of gain weight was almost constant. At the end of the period there were still differences in corporal weight among the three groups (mean body weight: group C  $214.21 \pm 12.10$ g, group M  $193.37 \pm 10.02$  g, group K  $140.41 \pm 10.93$  g).

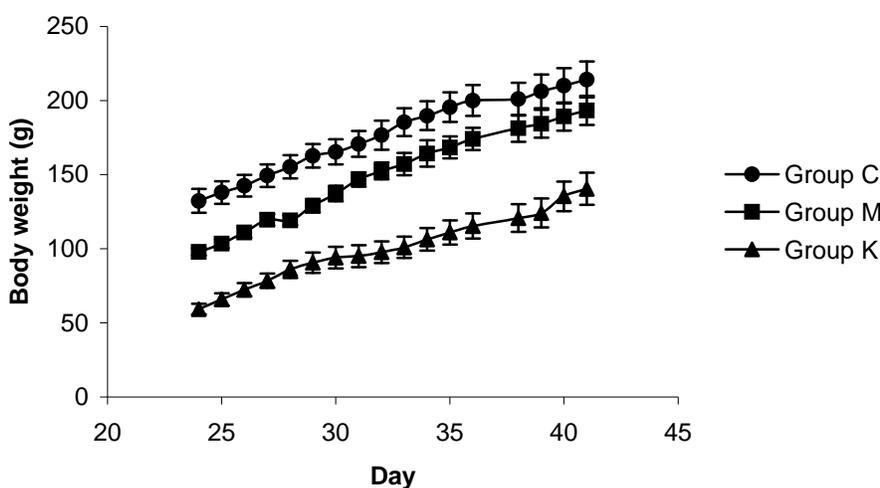
**Table 5.** Study I. Pharmacokinetic parameters of cefuroxime in control and malnourished rats.<sup>1</sup>

	Group C	Group M	Group K
$C_{max}/D$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{kg}$ )	$0.32 \pm 0.03$	$0.27 \pm 0.04$	$0.24 \pm 0.04^a$
$AUC/D_{0 \text{ to } t}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{kg}/\text{mL}/\text{mg}$ )	$23.9 \pm 1.2$	$18.7 \pm 1.5^b$	$15.4 \pm 0.7^a$
$AUC/D_{0 \text{ to } \infty}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{kg}/\text{mL}/\text{mg}$ )	$24.4 \pm 1.3$	$19.0 \pm 1.5^b$	$15.6 \pm 0.8^a$
$V_z/F$ ( $L/\text{kg}$ )	$2.6 \pm 0.5$	$4.1 \pm 0.2^a$	$4.6 \pm 0.4^a$
$Cl/F$ ( $L/\text{min}/\text{kg}$ )	$0.043 \pm 0.003$	$0.054 \pm 0.004^a$	$0.065 \pm 0.003^b$
$t_{1/2}$ ( $\text{min}$ )	$37.6 \pm 8.5$	$37.0 \pm 3.5$	$36.9 \pm 1.9$
$MRT$ ( $\text{min}$ )	$73.2 \pm 5.6$	$63.0 \pm 13.7$	$64.5 \pm 5.6$

<sup>1</sup> Values represent means  $\pm$  SD

<sup>a</sup> Significantly different from group C at  $P < 0.05$ , <sup>b</sup> significantly different from groups C and M at  $P < 0.05$

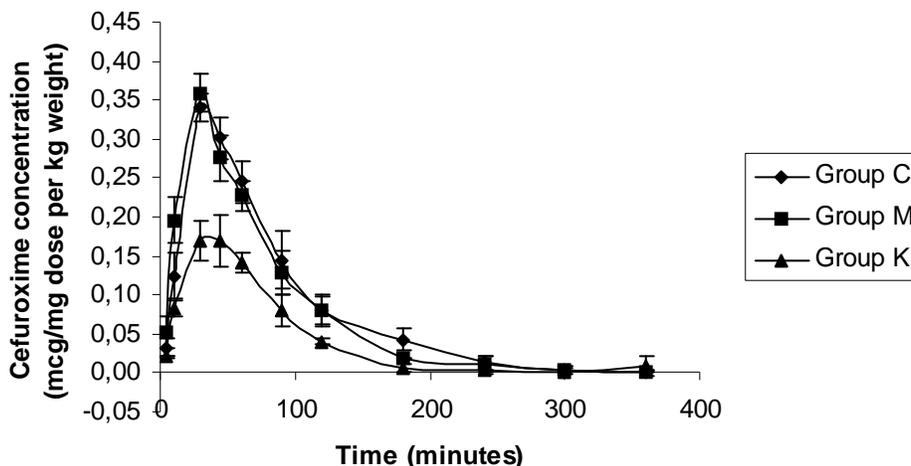
$C_{max}/D$ : maximum plasma concentration expressed by dose per corporal weight;  $AUC/D$ : area under the curve expressed by dose per corporal weight;  $V_z/F$ : apparent volume of distribution;  $Cl/F$ : apparent clearance;  $t_{1/2}$ : half life elimination;  $MRT$ : mean residence time



**FIGURE 4.** The increase in body weight as a function of time (days) during a 21-day period of recovery. Group C (control), Group M (restricted in energy and nutrients) and Group K (fed with low quality protein). Each point represents the mean body weight  $\pm$  SD, n = 36

The pharmacokinetic profile of study II is shown in Figure 5, the pharmacokinetic parameters being presented in Table 6. Animals of group M had no significant differences in any of the pharmacokinetic parameters when compared with the control group however, significant differences in  $C_{max}$  and AUC in group K compared with control and M groups were found. For this study an F value of 54.3% for K group was found, while group M

showed no differences in AUC/D compared with the control group, demonstrating that for this latter group the absorption of the antibiotic was similar to that of the control group, group K still having a lower absorption of the antibiotic. Moreover, values of  $V_z/F$  and  $Cl/F$  group K were higher than the other groups, while the value of MRT in group K was not significantly different from those of groups C and M.



**FIGURE 5.** Mean plasma concentrations of cefuroxime after oral administration (2.6 mg) of cefuroxime axetil in control and animals of groups M and K after a 21 day period of recovery. Group C (control), group M (restricted in energy and nutrients) and group K (fed with low quality protein).

**Table 6.** Study 2. Pharmacokinetic parameters of cefuroxime in control and malnourished rats after 3 weeks of recovery.<sup>1</sup>

	Group C	Group M	Group K
$C_{max}/D$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}/\text{kg}$ )	$0.35 \pm 0.01$	$0.38 \pm 0.06$	$0.20 \pm 0.02^a$
$AUC/D_{0 \text{ to } t}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{kg}/\text{mL}/\text{mg}$ )	$26.9 \pm 2.1$	$30.4 \pm 1.5$	$14.6 \pm 1.0^a$
$AUC/D_{0 \text{ to } \infty}$ ( $\mu\text{g} \cdot \text{min} \cdot \text{kg}/\text{mL}/\text{mg}$ )	$27.2 \pm 2.1$	$30.7 \pm 1.0$	$14.8 \pm 1.2^a$
$V_z/F$ ( $L/\text{kg}$ )	$1.9 \pm 0.3$	$1.9 \pm 0.4$	$3.1 \pm 0.3^a$
$Cl/F$ ( $L/\text{min}/\text{kg}$ )	$0.036 \pm 0.004$	$0.033 \pm 0.005$	$0.069 \pm 0.005^a$
$t_{1/2}$ ( $\text{min}$ )	$32.8 \pm 3.8$	$37.5 \pm 5.7$	$31.6 \pm 4.1$
MRT ( $\text{min}$ )	$84.11 \pm 3.1$	$79.06 \pm 5.3$	$83.9 \pm 22.9$

<sup>1</sup> Values are means  $\pm$  SD

<sup>a</sup> Significantly different from groups C and M at  $P < 0.05$

$C_{max}/D$ : maximum plasma concentration expressed by dose per body weight;  $AUC/D$ : area under the curve expressed by dose per body weight;  $V_z/F$ : apparent volume of distribution;  $Cl/F$ : apparent clearance;  $t_{1/2}$ : half life elimination; MRT: mean residence time

## DISCUSSION

So far most of the pharmacokinetic studies carried out on malnourished animals have been performed using insufficient amounts of good quality foods; this means that although the food has sufficient quantities of all nutrients, including a good quality protein (with all essential amino acids in sufficient quantities), the amount of food consumed by the animal, it is not enough to accomplish the nutrimental and energy requirements of the animal. Considering that the effects of a low quality protein have not been studied and could be different from those produced by the restriction in the amount of food consumed by the animal, the main aim of this paper was to determine if different types of malnutrition had an influence on the pharmacokinetics of cefuroxime axetil.

Animal models for malnutrition are based on the consumption of low quantities of a good quality diet (to simulate marasmus) or on diets with low protein content (to simulate kwashiorkor), usually casein or albumin. Edozien (26) has reported that young rats fed on a diet containing 0.5% albumin develop the clinical features of kwashiorkor, including edema after periods from 2 to 4 months. However, the extremely low level of protein and the time to develop malnutrition can cause stress in the experimental animals. In the present work it has been possible to obtain some biochemical features found in kwashiorkor in a shorter period of time using a food with a low quality protein.

The total amount of food consumed by group K during the first phase of the study was significantly lower when compared with that of the control group. This behavior has been observed by other authors it probably being a consequence of a deficit in essential amino acids in the diet (27-31). Peng et al. (32) suggested that young rats were able to select a protein diet appropriate to their bodily needs. The protein consumed by group K was of low quality (deficient in tryptophan) and the alterations produced by the imbalanced amino acid pattern could be the reason for the limited amounts of food consumed by this group. The significantly lower body weight of this group was a result of a poor quality protein as well as the lower quantity of food consumed by the rats.

Animals of group K presented the lowest plasma protein content as observed in kwashiorkor. These proteins tend to be lower when protein

deficiency is the principal cause of the malnutrition state and this could be the reason for the differences found between groups K and M.

The content of fat in the liver in M group was not different from that found in the control group. Group K showed a higher content of fat liver than that of the control group. These last results are similar to those found in autopsied children with kwashiorkor, who presented higher levels of fat in the liver (33). Some authors have proposed that a severe deficiency in protein such as that observed in kwashiorkor, can cause a decrease in liver proteins that transport lipids in the organism, causing its accumulation in the organ. It is also possible that an increased hepatic fatty acid synthesis from the excess carbohydrate, an impaired fatty acid oxidation by hepatocytes or an impaired whole-body fatty acid oxidation can cause accumulation of lipids in the liver (34-36).

The microscopy study showed that the small intestine was modified by severe malnutrition mainly in group K, which could alter the capacity of absorption by this tissue. In humans it has been observed that in kwashiorkor the villi are shortened and their number decreases owing to fusion so that the ridge or leaf-shaped villi are common; villous atrophy has also been observed (14, 37,38). Severe mucosal injury is more common in kwashiorkor than it is in marasmus, possibly due to the effect of protein depletion on mucosal recovery (15). This behavior was similar in group K, which had a deficit of good quality protein and presented more damage in the small intestine than group M. Zambonino et. al (39), found that villus height can be used as an indicator of the nutritional state in rats, and taking this into account, group K presented a more severe malnourished state than did group M.

The results obtained demonstrated that the malnutrition models of this study can be used to evaluate the changes and effects produced by these two types of malnutrition.

The results obtained in study I showed that for malnourished animals of groups K and M values of AUC/D were lower than those of the control group, which indicates that the absorbed fraction of the antibiotic was lower in the former groups. It has been reported that cefuroxime axetil can be transported by a carrier-mediated pH-dependent peptide transporter (PepT1), but it can also be absorbed by passive diffusion (22). It is possible that the decrease in the microvilli of the small

intestine in malnourished animals from group K decreased the surface available for absorption, which, as a consequence, reduced the absorption capacity of the drug. Group M also showed differences in AUC/D with respect to the control group, and although this group did not show differences in the height of microvilli, a reduction in the number was apparent, a situation that could also reduce the surface area for absorption. Bae et al. (40) found a similar behavior after the oral administration of an oxazolidinone, DA-7867 to malnourished rats fed with a 5% protein diet. The AUC was significantly smaller compared with that of the control group, suggesting a decrease in gastrointestinal absorption in malnourished animals.

Esterase activity in the intestinal mucosa was measured in the proximal part of the intestine because it has been demonstrated that this fraction has a greater absorption capacity for the prodrug (21). It has been proposed that one of the reasons for the variability in cefuroxime axetil bioavailability is the existence of interindividual variability in the enzymatic activity of the intestinal esterases, since these enzymes may hydrolyze the prodrug producing the non absorbable form of the drug (cefuroxime) (19). Esterase activity in the intestinal mucosa was measured in order to determine if it could be altered by malnutrition. The protein content in the proximal segment of the small intestine was lower in both malnourished groups when compared with the control group, but no significant differences in the activity of small intestine esterases among the three groups were found; this was probably due to the homeostasis that the organism maintains in some enzymes which are required for the digestion processes. Some authors have reported that the intestinal mucosa can obtain the energy even when malnutrition is present, the energy could be obtained from the lumen itself and also the intestine is one of the first tissues exposed to the dietary nutrients; these sources could provide energy substrates to support the activity of the small intestine, so the enzymatic activity can be maintained (41, 42). The results obtained in esterase activity of the small intestine suggests that in malnourished groups not all changes in the bioavailability of cefuroxime axetil can be attributed to differences in esterase activity in the small intestine.

With respect to the values of  $t_{1/2}$  found, there were no differences between groups,

suggesting that the elimination process of cefuroxime is not altered by malnutrition. Although differences in  $V_z/F$  and  $Cl/F$  between control and malnourished groups were found, these differences might be related to the fraction of dose absorbed by K and M groups since cefuroxime is not metabolized, no change in the metabolizing enzymes could alter the clearance of the drug.

The results of the pharmacokinetic study II showed that after the three week period of recovery, group M had a similar pharmacokinetic profile when compared with that of the control group. The body weight of these groups showed no significant differences, suggesting that group M recovered from malnutrition, and consequently the capacity of absorption of cefuroxime was restored. For group K the pharmacokinetic results were similar to those observed in study I. This means that in spite of the three week period in which the animals were fed with a good diet, the capacity of absorption of malnourished animals of this group was not restored. As can be observed, the animals of group K had 65% of the mean body weight of the control group and might need a longer period of time to recover their capacity of absorption. This behavior is similar to the observations made in children with kwashiorkor, who in spite of clinical recovery, did not show similar patterns of amino acid transport when compared with normal children because of a slow response of the small intestine morphology to nutritional rehabilitation (14, 15). As in study I, no differences were found in group K for  $t_{1/2}$  and MRT.

The changes in pharmacokinetics produced by malnutrition are different depending on the drug and on the route of administration. For example, Lares-Asseff et. al (43,44) found that metronidazole in children showed a different pharmacokinetic pattern in malnourished patients. No significant differences were found in absorption, AUC, and  $C_{max}$ . However, they demonstrated that the elimination half life was significantly longer in severely malnourished children when compared with the values obtained in nutritionally rehabilitated subjects, this change being accompanied by the corresponding decrease in clearance which could be due to modifications in the biotransformation of the drug. These changes indicate that there is a risk of accumulation of the drug after repeated doses and the authors propose that the dose of this drug should be reduced in malnourished children.

Conclusions. The results of this study show that the absorption of cefuroxime axetil was altered in malnutrition caused by a diet with a low quality protein. After a 3 week recovery period these animals still had alterations in the absorption of cefuroxime axetil while animals fed with a restriction in energy and nutrients but with a good quality protein presented a similar pharmacokinetic pattern to that of the control group of well nourished animals.

The authors thank Leticia Gil and Sarah Carolina González for technical assistance. The authors also would like to thank Dr. Héctor Bourges Rodríguez for his helpful advice.

## REFERENCES

- [1]. Farook Jahoor, Asha Badaloo, Marvin Reid and Terrence Forrester. Protein kinetic differences between children with edematous and nonedematous severe childhood undernutrition in the fed and postabsorptive states. *J Nutr*, 82:792-800, 2005.
- [2]. Mark J. Manary, Robin L. Broadhead and Kevin E. Yarasheski. Whole-body protein kinetics in marasmus and kwashiorkor during acute infection. *Am J Clin Nutr*, 67:1205-1209, 1998.
- [3]. K. S. Rao. Evolution of kwashiorkor and marasmus. *Lancet*, 1:709-11, 1974.
- [4]. C. R. C. Heard, Sylvia M. Frangi and Pauline M. Wright. Biochemical characteristics of different forms of protein-energy malnutrition: an experimental model using young rats. *Br J Nutr*, 37:1-21, 1977.
- [5]. L. John Hoffer. Clinical nutrition: 1. Protein-energy malnutrition in the inpatient. *CMAJ*, 165(10):1345-1349, 2001.
- [6]. Asha Badaloo, Marvin Reid, Deanne Soares, Terrence Forrester and Farook Jahoor. Relation between liver fat content and the rate of VLDL apolipoprotein B-100 synthesis in children with protein-energy malnutrition. *Am J Clin Nutr*, 81:1126-1132, 2005.
- [7]. Barry W. Ritz and Elizabeth M. Gardner. Malnutrition and energy restriction differentially affect viral immunity. *J Nutr*, 136:1141-1144, 2006.
- [8]. Marvin Reid, Asha Badaloo, Terrence Forrester, William C. Heird and Farook Jahoor. Response of splanchnic and whole-body leucine kinetics to treatment of children with edematous protein-energy malnutrition accompanied by infection. *Am J Clin Nutr*. 76:633-640, 2002.
- [9]. Management of the child with a serious infection or severe malnutrition. Geneva: World Health Organization, 2000.
- [10]. J. A. Scott, S. Mwarumba, C. Ngetsa, S. Njenga, B. S. Lowe, M. P. Slack, J. A. Berkley, I. Mwangi, K. Maitland, M. English, K. Marsh. Progressive increase in antimicrobial resistance among invasive isolates of *Haemophilus influenzae* obtained from children admitted to a hospital in Kilifi, Kenya, from 1994 to 2002. *Antimicrob Agents Chemother*, 49(7):3021-3024, 2005.
- [11]. Z. L. Mao, Y. K. Tam and R. T. Coutts. Effect of protein and calorie malnutrition on drug metabolism in rat-in vitro. *J Pharm Pharm Sci*, 9(1):60-70, 2006.
- [12]. Netter KJ. The role of nutrients in detoxification mechanisms. In: Kotsonis FN, Mackey M, Hjelle J, editors. *Nutritional toxicology*. Raven Press, Ltd., New York, USA 1994. p. 1-17.
- [13]. C. S. Catz. Malnutrition and drug metabolism in fetal and neonatal animals. *Dev Pharm Therap* 15(3-4):211-14, 1990.
- [14]. D. R. Brewster, M. J. Manary, I. S. Menzies, E. V. O'Loughlin and R. L. Henry. Intestinal permeability in kwashiorkor. *Arch Dis Child*, 76:236-241, 1997.
- [15]. F. E. Viteri, J. M. Flores, J. Alvarado, M. Behar. Intestinal malabsorption in malnourished children before and during recovery. Relation between severity of protein deficiency and the malabsorption process. *Am J Dig Dis*, 18:201-211, 1973.
- [16]. A. Finn, A. Straugun, M. Meyer, J. Chubb. Effect of dose and food on the bioavailability of cefuroxime axetil. *Biopharm Drug Dispos*, 8:519-526, 1987.
- [17]. Peter E. O. Williams, Stuart M. Harding. The absolute bioavailability of oral cefuroxime axetil in male and female volunteers after fasting and after food. *J Antimicrob Chemother*, 13:191-196, 1984.
- [18]. Dwight A. Powell, Nancy C. James, Michael J. Ossi, Milap C. Nahata and Karl H. Donn. Pharmacokinetics of cefuroxime axetil suspension in infants and children. *Antimicrob Agents Chemother*, 35(10):2042-2045, 1991.
- [19]. Callum J. Campbell, Laura J. Chantrell, Richard Eastmond. Purification and partial characterization of rat intestinal cefuroxime axetil esterase. *Biochem Pharmacol*, 36:2317-2324, 1986.
- [20]. Gerold L. Mosher, Julianne McBee and David B. Shaw. Esterase activity toward the diastereomers of cefuroxime axetil in the rat and the dog. *Pharm Res*, 9:687-689, 1992.

- [21]. Nieves Ruiz-Balaguer, Amparo Nacher, Vicente G. Casabo and Matilde Merino. Nonlinear intestinal absorption kinetics of cefuroxime axetil in rats. *Antimicrob Agents Chemother*, 41(2):445-448, 1997.
- [22]. N. Ruiz-Balaguer, A. Nacher, V. G. Casabo and M. Merino Sanjuan. Intestinal transport of cefuroxime axetil in rats: absorption and hydrolysis processes. *Int J Pharm*, 234:101-111, 2002.
- [23]. AOAC. Official Methods of Analysis, 15<sup>th</sup> ed.; Association of Analytical Chemists: Arlington, VA, 1990.
- [24]. E. F. Hartree. Determination of protein: a modification of the Lowry method that gives a linear photometric response. *Anal Biochem*, 48:422-427, 1972.
- [25]. Jordi Folch, M. Lees, G. H. Sloane Stanley. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biol Chem*, 226:497-509, 1957.
- [26]. J. C. Edozien. Experimental kwashiorkor and marasmus. *Nature*, 220:917-919, 1968.
- [27]. Udaya M. Kabadi, Albert B. Eisenstein, Inge Strack. Decrease plasma insulin but normal glucagon in rats fed low protein diets. *J Nutr*, 106:1247-1253, 1976.
- [28]. O. Tulp, S. Gambert, E. S. Horton. Adipose tissue development, growth, and food consumption in protein-malnourished rats. *J Lipid Res*, 20:47-54, 1979.
- [29]. Orien L. Tulp, Edward S. Horton. Effect of prolonged experimental protein malnutrition and of refeeding on growth, adipose tissue development and body composition in rats. *J Nutr*, 111:1145-1156, 1981.
- [30]. Juan C. Sanahuja and Alfred E. Harper. Amino acid balance and imbalance. XII Effect of amino acid imbalance on self-selection of diet by the rat. *J Nutr*, 81:363-71, 1963.
- [31]. Beverly Musten, Doryne Peace and G. Harvey Anderson. Food intake regulation in the weanling rat: self-selection of protein and energy. *J Nutr*, 104:563-572, 1974.
- [32]. Y. Peng, L. L. Meliza, M. G. Vavich and A. R. Kemmerer. Effects of amino acid imbalance and protein content of diets of food intake and preference of young, adult, and diabetic rats. *J Nutr*, 105:1395-1404, 1975.
- [33]. C. D. Williams. Kwashiorkor. *Lancet*, 2:1151-1152, 1935.
- [34]. K. Fletcher. Observations on the origin of liver fat in infantile malnutrition. *Am J Clin Nutr.*, 19:170-174, 1966.
- [35]. B. Lewis, J. D. L. Hansen, W. Wittmann, L. H. Krut, F. Stewart. Plasma free fatty acids in kwashiorkor and pathogenesis of the fatty liver. *Am J Clin Nutr*, 15:161-168, 1964.
- [36]. J. E. Iputo, W. W. Wong, P. D. Klein. Impaired dietary lipid oxidation in kwashiorkor. *Nutr Res*, 18:1187-201, 1998.
- [37]. D. Burman. The jejunal mucosa in kwashiorkor. *Arch Dis Child*, 40(213):526-531, 1965.
- [38]. J. P. Stanfield, M. S. R. Hutt, R. Tunnicliffe. Intestinal biopsy in kwashiorkor. *Lancet*, 11,2(7411):519-523, 1965.
- [39]. J. L. Zambonino Infante, J. M. Rouanet, P. Besancon. Mathematical correlation between villus height and the nutritional state in Sprague-Dawley rats. *Gut*, 34:1066-1068, 1993.
- [40]. S. K. Bae, S. J. Lee, J. W. Kwon, W. B. Kim, M. G. Lee. Effects of protein-calorie malnutrition on the pharmacokinetics of DA-7867, a new oxazolidinone in rats. *J Pharm Pharmacol*, 56(5):635-642, 2004.
- [41]. Thomas M. Rossi, P. C. Lee, Carolyn M. Young, Aaron Lerner, Emanuel Lebenthal. Effect of nutritional rehabilitation on the development of intestinal brush border disaccharidases of postnatally malnourished weanling rats. *Pediatr. Res.*, 20(8):793-797, 1986.
- [42]. Agus Firmansyah, Laurentius Suwandito, Duna Penn, Emanuel Lebenthal. Biochemical and morphological changes in the digestive tract of rats after prenatal and postnatal malnutrition. *Am. J. Clin. Nutr.*, 50:261-268, 1989.
- [43]. Ismael Lares-Asseff, Joaquín Cravioto, Pilar Santiago and Bartolomé Pérez-Ortíz. Pharmacokinetics of metronidazole in severely malnourished and nutritionally rehabilitated children. *Clin Pharmacol Ther*, 51(1):42-50, 1992.
- [44]. Ismael Lares-Asseff, Joaquín Cravioto, Pilar Santiago and Bartolomé Pérez-Ortíz. A new dosing regimen for metronidazole in malnourished children. *Scan J Infect Dis*, 25:115-1121, 1993.
-