



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA

Facultad de Farmacia
Doctorado en Biomedicina y Farmacia



Modelización

Farmacocinética de la Taurina:

Influencia del Estado Nutricional

Tesis Doctoral
Ana Catalán Latorre
Valencia, 2014

Diseño y grafismo de Portada por Miguel Catalán Latorre.
Los iconos empleados en la portada pertenecen a Icon8 (**buzz.icons8.com**).



VNIVERSITAT
D VALÈNCIA [Logo] Facultat de Farmàcia

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Programa de doctorado en Biomedicina y Farmacia

**“Modelización Farmacocinética de la Taurina:
Evaluación del Estado Nutricional”**

Memoria que, para optar al
grado de Doctor en Farmacia, presenta:

Ana Catalán Latorre

Directores:

Matilde Merino Sanjuán Amparo Nácher Alonso N. Víctor Jiménez Torres

Valencia, Mayo 2014



 **Facultat de Farmàcia**

Departamento de Farmacia y Tecnología Farmacéutica

Programa de doctorado en Biomedicina y Farmacia

Los que suscriben, Dña Matilde Merino Sanjuán, Catedrática de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia, Dña Amparo Nácher Alonso, Profesora titular de Farmacia y Tecnología Farmacéutica de la Universidad de Valencia, Don N. Víctor Jiménez Torres, Académico Numerario de la Real Academia Nacional de Farmacia.

CERTIFICAN:

Que la memoria de Tesis Doctoral realizada por Ana Catalán Latorre y que lleva por título "Modelización farmacocinética de la taurina: evaluación del estado nutricional", ha sido realizada bajo la dirección compartida de los mismos y reúne todos los requisitos necesarios para su presentación, juicio y calificación.

Lo que suscriben, en Valencia, 2 de Abril de 2014.

Matilde Merino Sanjuán Amparo Nácher Alonso N. Víctor Jiménez Torres

“La imaginación y no la inteligencia, es lo que nos hace humanos”

Terry Pratchett

Bueno, estamos ya en la recta final del trayecto. Son demasiadas horas, vivencias y ocurrencias para tratar de resumir estos últimos años, y dado que suelo extenderme bastante, si no te gustan las historias largas, mejor pasa por alto este apartado.

Los comienzos fueron un poco curiosos, tras comentar a mis compañeros mi intención de pedir la beca de colaboración en este departamento, surgieron varios comentarios “¿Beca de colaboración en Farmacia y Tecnología Farmacéutica? ¿En ese de tantos cálculos y tantos profes que te hacen pensar?” – “Pues si, a ese voy”, “Uf, pues creo que estás un poco loca”. Bendito punto de “locura”, como me dijeron, que me ha llevado a compartir tantas horas, días y años con vosotros. No es sólo la cantidad ingente de cosas que me habéis enseñado, porque quién iba a decirme a mí, que me mareaba al ver cómo limpiaban una raya en el mercado central de Castellón, que iba a aprender con vosotros a manejar e intervenir de mil formas a animales de experimentación, o que iba a comprender esa pantallita negra con un batiburrillo de letras y números blancos con un nombre con demasiadas enes y emes. Me llevo en una cajita las reuniones contigo, Víctor, en las que descubría conceptos y caminos que no había llegado a imaginar; tardes contigo, Mati, de risas, aprendizaje y lucha con Nonmem y SPSS en las que al final salíamos victoriosas; o cualquier rato de búsqueda de artículos científicos e intervenciones quirúrgicas contigo, Amparo, recordando con especial

cariño cuando me hiciste un hueco en tu despacho y el día que conseguimos canular la yugular de nuestras primeras ratas. Por todos esos momentos, mil gracias, vuestra paciencia y sabiduría no tienen límite. Destacar a otros dos miembros de esta familia, Virginia y Octavio, sobre todo por toda la ayuda, consejos y ánimos que me habéis brindado. Sin vosotros, mis aventuras con el HPLC habrían sido muchísimo más difíciles y no habría tenido la oportunidad de estudiar la iontoforesis o usar un microscopio confocal. Gracias por confiar en mí y considerarme una más en el equipo de Investigación. Hemos pasado ratos muy buenos y nos hemos reído hasta no poder mantenernos en pie en mitad de experimentos, pero también quería subrayar que en los últimos años hemos pasado momentos muy tristes por la pérdida de Vicente y otros problemas personales muy desagradables y siempre habéis sido un apoyo enorme, esperando también haberlo sido para vosotros. Empezasteis como tutores y profesores del grupo de investigación, pero en seguida os transformasteis en compañeros, amigos y familia.

Agradecer a Juana, Pilar, José, Carolina y Carmina por vuestra amistad y ayuda durante el tiempo que hemos coincidido, os debo una bien grande. Y por supuesto Mamen, que has sido tan decisiva en la recta final de la presentación de este escrito. A mi veterinaria favorita, Inma, nunca te lo diré suficientes veces, gracias, gracias y mil gracias por toda tu ayuda y sabiduría, trabajar contigo es una mezcla 50/50 de aprendizaje y bienestar (animal y personal); sin olvidarme de Jesús y Yulra por haber estado siempre ahí en mi segunda casa durante los periodos de desnutrición.

Agradecer al resto de profesores del departamento vuestra amabilidad y cordialidad, en caso de haber necesitado algo, siempre habéis intentado ayudarme. Y los compañeros, aquellos que ya no estáis por la universidad, con los que podría llenar páginas y páginas, muchas gracias por vuestra dedicación, camaradería y amistad. Querría mencionar a dos a las que guardo especial cariño: Amparo Centelles y Carla Mura, ¡al final he conseguido ser del club de las doctoras! Habéis sido un referente para mí. Y a la próxima en unirse al club, Ines Castangia, gracias por este último año. Y por supuesto María Rodríguez, me quedo con los trueques de productos de laboratorio que tantas veces me han sacado de apuros y de nuestras charlas en el estabulario con tus ratoncitos punkis “pelaos”, me hace mucha ilusión presentar esta Tesis Doctoral casi a la vez que tú. Aquellos que sí que seguís por aquí o que habéis acabado recientemente, gracias por vuestra camaradería y trato cordial, independientemente de en qué laboratorio he estado trabajando siempre me he sentido como en casa.

A mis compis de Facultad (Juane, Sara, Alma, Raúl, Lucía, Clara, Fran, Marías “la PhD” Rodríguez, Fos y Gálvez) y mis amigos de Castellón (Julio, Mariola, Granxo, Borja, Andrea, Maria G...): gracias por escucharme en esos momentos de desesperación en los que la tesis no parecía tener final y esas noches en las que hemos celebrado las noticias buenas y hemos intentado ver el vaso medio lleno con las malas. Sois un apoyo muy importante.

Micky, ahora que no nos oye nadie, muchas gracias por ayudarme con la portada, así como por tu paciencia cuando me pierdo con las

reflexiones de Rust. Haber sido comisión contigo en Monte el verano pasado me ayudó a despejarme. A ver si el Barça gana muchos títulos^^.

Jorge, puede que conocerte haya sido uno de los momentos más importantes de mi vida. Gracias por todos estos años llenos de ternura, confianza y cariño; da igual si el problema es grande o pequeño, peludo o con muchas patas, siempre lo dejas todo para ayudarme. ¡Hasta venir en fin de semana a dar de comer a las ratas! Muchísimas gracias por hacerme reír (hasta en los momentos más difíciles) y ser capaz de hacerme ver la parte buena de las cosas por muy negras que las pinte.

Mamá, eres el pilar que sustenta a nuestra familia, la única persona que conozco realista, práctica, trabajadora, cariñosa y positiva a partes iguales. Eres maravillosa y no te lo decimos lo suficiente. Espero haber heredado una décima parte de todas las cosas buenas que te definen, gracias a ti voy a defender este trabajo. Papá, el diccionario se queda corto para definir la admiración y el cariño que siento por ti, adoro todas tus vertientes, nunca he conocido a una persona tan fuerte, cosmopolita, melómana y extrovertida como tú, me encanta charlar contigo y dejar que me recomiendes grupos o cómics, eres un pozo de sabiduría. Me ha entristecido darme cuenta de que el tema de esta tesis está de rabiosa actualidad, pero no pasa nada, porque aunque el camino será largo y la diosa fortuna nos ha puesto varias zancadillas por el camino (si yo la pillara por banda...), eres la persona más fuerte que conozco y nos tienes a tu lado para sortear todos los baches. Ánimo, es duro pero tú eres más fuerte. Lo sé. Porque DJ Kron still breathes...

A JORGE

A MIS PADRES

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	1
2	OBJETIVOS.....	5
3	ANTECEDENTES	7
3.1	DESNUTRICIÓN	7
3.1.1	<i>Clasificación</i>	<i>8</i>
3.1.2	<i>Causas de la desnutrición.....</i>	<i>10</i>
3.1.3	<i>Manifestaciones clínicas de la desnutrición</i>	<i>11</i>
3.1.4	<i>Detección del grado o riesgo de desnutrición</i>	<i>13</i>
3.1.5	<i>Sistemas de cribado: detección de la desnutrición y riesgo</i>	<i>15</i>
3.2	DIETAS ENTERALES.....	16
3.2.1	<i>Utilidad terapéutica</i>	<i>17</i>
3.3	TAURINA	18
3.3.1	<i>Estructura y propiedades fisicoquímicas.....</i>	<i>19</i>
3.3.2	<i>Absorción, metabolismo y excreción.....</i>	<i>20</i>
3.3.3	<i>Funciones</i>	<i>22</i>
3.3.4	<i>Causas de deficiencia</i>	<i>23</i>
3.3.5	<i>Ingesta recomendada</i>	<i>25</i>
3.4	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO	26
3.4.1	<i>Análisis farmacocinético compartimental.....</i>	<i>27</i>
3.4.2	<i>Análisis farmacocinético no compartimental.....</i>	<i>36</i>
3.4.3	<i>Análisis farmacocinético poblacional.....</i>	<i>37</i>
3.4.4	<i>Biodisponibilidad.....</i>	<i>41</i>
4	MATERIALES Y MÉTODOS.....	51
4.1	TAURINA.....	51
4.1.1	<i>Taurina en solución libre</i>	<i>51</i>
4.1.2	<i>Preparados enterales</i>	<i>52</i>

4.2	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	55
4.2.1	<i>Método de desnutrición animal</i>	56
4.3	ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL INTESTINO	65
4.4	TÉCNICA QUIRÚRGICA.....	67
4.4.1	<i>Anestesia y analgesia</i>	67
4.4.2	<i>Técnica de canulación permanente de la vena Yugular</i>	68
4.5	PROTOCOLO DEL ENSAYO	75
4.5.1	<i>Administración de la solución de taurina y de los preparados enterales</i>	75
4.5.2	<i>Estabulado y toma de muestras</i>	78
4.5.3	<i>Preparación de las muestras sanguíneas</i>	80
4.6	VALORACIÓN ANALÍTICA DE LA TAURINA EN LAS MUESTRAS PLASMÁTICAS.....	82
4.6.1	<i>Elementos cromatográficos</i>	83
4.7	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	84
4.7.1	<i>Ensayos de linealidad</i>	85
4.7.2	<i>Ensayo de precisión y exactitud</i>	86
4.7.3	<i>Límite de detección</i>	86
4.7.4	<i>Límite de cuantificación</i>	87
4.8	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO.....	87
4.8.1	<i>Modelización de datos intravenosos</i>	90
4.8.2	<i>Modelización global de los datos orales e intravenosos</i>	92
4.8.3	<i>Modelización de la variabilidad interindividual</i>	93
4.8.4	<i>Modelización de la variabilidad aleatoria residual</i>	94
4.8.5	<i>Obtención de los parámetros farmacocinéticos individuales</i>	96
4.8.6	<i>Selección de covariables</i>	96
4.8.7	<i>Selección del modelo</i>	98
4.8.8	<i>Evaluación del modelo farmacocinético</i>	101
4.9	EL AUC COMO MÉTRICA DEL VALOR AÑADIDO DEL APORTE DE TAURINA A LOS PREPARADOS ENTERALES.....	103
4.10	MÉTODOS ESTADÍSTICOS	105

4.10.1	<i>Pruebas paramétricas</i>	107
4.10.2	<i>Pruebas no paramétricas</i>	108
4.10.3	<i>Criterios de calidad de los ajustados</i>	109
5	RESULTADOS	111
5.1	VALIDACIÓN DEL MÉTODO ANALÍTICO	111
5.1.1	<i>Análisis de linealidad</i>	111
5.1.2	<i>Ensayo de precisión y exactitud</i>	112
5.1.3	<i>Límite de detección y cuantificación</i>	113
5.2	ENSAYOS DE DIGESTIÓN “IN VITRO” DE LOS PREPARADOS ENTERALES	113
5.3	ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN. EVALUACIÓN DEL ESTADO NUTRICIONAL	114
5.3.1	<i>Parámetros biométricos y bioquímicos</i>	115
5.3.2	<i>Parámetros morfológicos</i>	118
5.3.3	<i>Valoración del grado de desnutrición</i>	119
5.4	ANÁLISIS HISTOLÓGICO DEL INTESTINO DELGADO	120
5.5	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO COMPARTIMENTAL	123
5.5.1	<i>Curvas de concentración plasmática tiempo</i>	123
5.5.2	<i>Modelización de datos intravenosos</i>	126
5.5.3	<i>Modelización global de los datos</i>	149
5.6	PREPARADOS ENTERALES: CURVAS CONCENTRACIÓN PLASMÁTICA DE TAURINA VS TIEMPO	162
5.6.1	<i>Administración de dosis única</i>	162
5.6.2	<i>Administración de dosis múltiples</i>	166
5.6.3	<i>Análisis farmacocinético no compartimental</i>	170
5.7	VALOR AÑADIDO DEL APORTE DE TAURINA POR EL PREPARADO-ENTERAL	183
6	DISCUSIÓN	187
6.1	MODELO ANIMAL	190
6.2	DISEÑO EXPERIMENTAL	195
6.3	ANÁLISIS MORFOLÓGICO DEL INTESTINO	198
6.4	ANÁLISIS FARMACOCINÉTICO COMPARTIMENTAL	200

..... Índice

6.4.1	<i>Modelización de los datos intravenosos</i>	200
6.4.2	<i>Modelización global de los datos</i>	209
6.5	SIMULACIÓN DE DATOS: VALIDACIÓN EXTERNA	215
6.6	PREPARADOS ENTERALES	217
6.6.1	<i>Análisis farmacocinético</i>	219
6.7	LIMITACIONES DEL ESTUDIO	222
7	CONCLUSIONES	227
8	ANEXOS	231
8.1	APROBACIÓN DEL COMITÉ ÉTICO	231
8.2	ARCHIVO CONTROL DEL MODELO FINAL (150b)	232
9	REFERENCIAS	237

1 INTRODUCCIÓN

La desnutrición es un estado patológico resultante de una deficiencia en el aporte de energía, proteínas y otros nutrientes que causa efectos adversos medibles en la composición y función de los tejidos, así como en la evolución clínica. Su prevalencia en la población europea no hospitalizada es de un 5-15% y en pacientes oncológicos alcanza hasta un 80%. La desnutrición calórico-proteica se ha asociado con variaciones en la absorción y distribución de fármacos debido a las alteraciones que se producen en las membranas absorbentes, en su unión a proteínas plasmáticas y tisulares, en el metabolismo hepático y/o en la eliminación renal. Por ello, no es atrevido imaginar que estas alteraciones puedan modificar la absorción, la distribución, el metabolismo y la excreción de los nutrientes esenciales, o los condicionalmente esenciales, que permiten el correcto funcionamiento de los procesos biológicos. En humanos sanos, los requerimientos alimenticios se cubren habitualmente con la ingesta de una dieta sana y equilibrada. Sin embargo, en determinados estados patológicos o cuando de forma continuada se ingiere una dieta no adecuada, los requerimientos alimenticios varían y se requiere un aporte exógeno mayor de los nutrientes esenciales y también de los condicionalmente esenciales, como la taurina.

La taurina es un aminoácido sulfurado condicionalmente esencial cuya obtención se realiza a partir de la dieta y mediante síntesis endógena. Es un compuesto antioxidante y osmorregulador, forma conjugados biliares, y participa tanto en el desarrollo del sistema nervioso central,

como en la excitabilidad muscular, cardíaca y neuronal. Los valores (“niveles”) fisiológicos de taurina en el organismo se alcanzan tanto por incorporación exógena a través de la dieta habitual, como por síntesis *de novo* a partir de la cisteína. Pero esta última vía no es suficiente “per se” para cubrir los requerimientos corporales en situaciones patológicas, como sucede en hepatopatías, nefropatías o procesos inflamatorios, así como en periodos precoces de desarrollo. En todas estas situaciones se recomienda incrementar el aporte exógeno de taurina para evitar carencias provocadas por el aumento de los requerimientos del organismo y/o por la disminución de la capacidad de síntesis corporal de este aminoácido. Por ello, algunas dietas o preparados enterales comerciales suplementan las fórmulas con taurina.

Existen pocos estudios publicados que evalúen la influencia de la desnutrición sobre la farmacocinética de fármacos; pero son aún más escasos los que evalúan la influencia de esta condición sobre la farmacocinética de nutrientes. Por ello se considera de especial interés analizar y describir la farmacocinética de la taurina administrada por vía oral y por vía intravenosa, en solución libre, a un grupo de animales normonutridos y a otro grupo de animales desnutridos para evaluar el impacto de la desnutrición calórico-proteica sobre los parámetros farmacocinéticos y la biodisponibilidad de este aminoácido.

2 OBJETIVOS

1. Validar el modelo de desnutrición animal utilizado mediante la caracterización y métrica de los cambios fisiológicos y morfológicos que acontecen.
2. Evaluar el impacto del estado nutricional del animal sobre el perfil farmacocinético de la taurina utilizando como referencia el grupo de animales normonutridos.
3. Cuantificar el valor añadido que representa la incorporación como “suplemento” de taurina en un preparado clínico de nutrición enteral.

3 ANTECEDENTES

3.1 DESNUTRICIÓN

La desnutrición es uno de los principales problemas de salud pública que afecta tanto a los países desarrollados como a los no desarrollados¹⁻³. Se define como una deficiencia en energía, proteínas y otros nutrientes que causa efectos adversos medibles en la composición y función de los órganos o tejidos, y que interfiere con la respuesta del huésped frente a la enfermedad y el tratamiento⁴. Se relaciona estrechamente con la enfermedad, siendo en numerosas ocasiones consecuencia de ésta, pero con el agravante de que puede actuar perpetuando los trastornos iniciales, empeorando el pronóstico evolutivo del paciente e incrementando la morbilidad y mortalidad⁵. Por ello, se establece una relación compleja entre la agresión causada por la enfermedad y el ayuno, ambos con consecuencias metabólicas apreciables y medibles⁶. Los grupos de población representados por pacientes geriátricos, los encamados durante tiempo prolongado u hospitalizados, pacientes con anorexia, trastornos psíquicos o cáncer y grupos de población marginada subsidiarios del consumo de drogas o alcohol, constituyen los grupos de mayor riesgo de desnutrición^{7,8}.

3.1.1 Clasificación

En la fisiopatología de la desnutrición asociada a la enfermedad habitualmente se diferencian distintas situaciones clínicas condicionadas por una ingesta de alimentos insuficiente, una digestión y una absorción alteradas, un aumento de las necesidades energéticas y proteicas y/o un aumento de las pérdidas ocasionado por una alteración catabólica. Según prevalezcan unas situaciones u otras se definen tres tipos de desnutrición: la desnutrición calórica o tipo marasmo; la desnutrición proteica o tipo kwashiorkor, y la desnutrición mixta, siendo la combinación del marasmo y del kwashiorkor.

Actualmente se reemplaza parte de la terminología anterior por desnutrición crónica (sustituyendo la palabra marasmo) y desnutrición aguda (que sustituye el término kwashiorkor).

La **desnutrición crónica** se desarrolla en situaciones de deficiencia crónica de energía y proteínas, manteniendo una proporción del aporte de ambos. Se caracteriza por la pérdida de las reservas corporales de masa muscular y grasa subcutánea, dando lugar a un aspecto caquéctico. La pérdida de masa muscular refleja la depleción proteica y puede afectar a órganos vitales como corazón, hígado y riñones⁹. Además, se produce una reducción en determinadas funciones corporales, como disminución tanto de la frecuencia cardíaca como de la tasa metabólica, una temperatura corporal por debajo de la media e incluso constipación intestinal².

Este estado se observa tras una inanición prolongada y es secundario a enfermedades crónicas¹⁰, entre ellas el cáncer, tumores de

esófago, cabeza y cuello, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), e infecciones como la causada por el virus de la inmunodeficiencia adquirida (VIH).

La desnutrición crónica, en general, responde positivamente al tratamiento nutricional, que debe iniciarse de forma paulatina para evitar que se desarrollen las alteraciones metabólicas características del síndrome de realimentación, como hipofosfatemia e insuficiencia respiratoria. Se considera que este tipo de desnutrición es una situación crónica adaptada a la privación calórica y proteica prolongada.

La **desnutrición aguda** se asocia clásicamente a los países subdesarrollados, ya que en la alimentación predomina la ingesta de cereales y el aporte de proteínas es restringido. Sin embargo, en la actualidad, este tipo de desnutrición también se detecta en los países desarrollados¹¹. A diferencia de la desnutrición crónica, este estado patológico se asocia a situaciones o enfermedades que amenazan la vida, como sepsis, traumatismos graves u otras situaciones que requieren ingreso en la unidad de cuidados intensivos. En todas ellas, las necesidades calóricas y proteicas aumentan en respuesta fisiológica al estrés y a su vez, la ingesta suele estar limitada o incluso restringida a sueroterapia^{9, 12}.

Las manifestaciones clínicas en las fases iniciales de la desnutrición aguda son difíciles de identificar. Las reservas grasas y musculares pueden ser normales o hallarse incrementadas, dando la falsa apariencia de un correcto estado nutricional. Los signos que orientan al diagnóstico de la desnutrición aguda son los edemas, las úlceras por presión, el retraso en la

cicatrización, disminución de la concentración de proteínas plasmáticas (albúmina, transferrina) y del número de linfocitos totales¹¹.

La reversión de un estado de desnutrición aguda es un proceso complejo y no siempre eficaz, por lo que su prevención constituye una oportunidad de mejora para los pacientes de riesgo. El pronóstico del paciente con este tipo de desnutrición es grave, incluso con tratamiento nutricional intensivo puesto que a diferencia de la desnutrición crónica, el paciente no suele tolerar la nutrición enteral y la respuesta a la renutrición es limitada.

La **desnutrición mixta** Corresponde a la combinación de los dos tipos de desnutrición descritos y se suele presentar cuando el individuo con desnutrición crónica se somete a un proceso agudo que le condiciona una situación de estrés, como cirugía, traumatismo o sepsis, añadiendo las condiciones de la desnutrición aguda a la situación crónica de malnutrición. Es una situación grave, ya que el paciente presenta riesgo elevado de infecciones y de otras complicaciones.

En este tipo de desnutrición es importante determinar qué componente predomina para establecer el plan nutricional más indicado y evitar así las complicaciones derivadas de cada tipo.

3.1.2 Causas de la desnutrición

La ingesta reducida de alimentos y nutrientes habitualmente es el factor etiológico más importante. Puede ocurrir debido a factores sociales

(guerra, pobreza, hambruna o dificultad para conseguir alimentos); a procesos fisiológicos (edad avanzada, pérdida de apetito); patológicos (patologías del sistema gastrointestinal, cabeza y cuello); psiquiátricos (desórdenes alimentarios, autismo, alcoholismo) o asociado a la medicación^{13, 14}.

Aunque la ingesta de alimentos sea adecuada y equilibrada, la absorción de los nutrientes se puede alterar por un cuadro de malabsorción. Éste es un síndrome caracterizado por la incapacidad para absorber ciertos nutrientes (hidratos de carbono, grasas, proteínas) u oligoelementos (vitaminas, elementos traza) y predispone a la pérdida de peso, y ulteriormente, a la desnutrición¹⁵. Patologías como la enfermedad de Crohn o la intolerancia al gluten constituyen dos ejemplos de estos procesos.

Los requerimientos y/o pérdidas de nutrientes específicos pueden incrementarse en situaciones patológicas y de estrés oxidativo elevado, como en pacientes quemados, con traumatismos o cáncer, debido a los cambios metabólicos que originan. Si no se ajusta la ingesta de nutrientes a las nuevas necesidades fisiológicas, esta nueva circunstancia puede desencadenar en un cuadro de desnutrición tanto crónica como aguda.

3.1.3 Manifestaciones clínicas de la desnutrición

La desnutrición puede desencadenar un aumento de la permeabilidad intestinal por atrofia de las vellosidades intestinales y consecuentemente, altera la absorción de numerosas moléculas, como

lípidos y glucosa^{16, 17}. La pared muscular que rodea al intestino delgado adelgaza y el recambio celular de la mucosa se ralentiza. Además, las secreciones gástricas, pancreáticas y biliares disminuyen, y se puede alterar la carga microbiota intestinal. Todo ello contribuye a generar un síndrome de malabsorción, en el que la función de barrera intestinal queda comprometida, favoreciendo la aparición de procesos infecciosos e inflamatorios¹⁸. Además, la desnutrición provoca atrofia hepática, de forma que el metabolismo de los fármacos puede alterarse. Los enzimas encargados de la gluconeogénesis aumentan, y por el contrario, disminuye la actividad de los sistemas enzimáticos restantes, fundamentalmente citocromos¹⁹.

La función respiratoria está comprometida debido a que la masa y fuerza de la musculatura diafragmática disminuye, reduciendo así los volúmenes ventilatorios⁹. La desnutrición también provoca una pérdida en la masa muscular cardíaca proporcional a la pérdida de peso, dando lugar a una reducción del gasto cardíaco, bradicardia e hipotensión. En el riñón la desnutrición provoca una disminución tanto en el flujo sanguíneo como en la filtración glomerular. En este órgano, la capacidad para excretar agua y electrolitos disminuye, aumentando de esta forma el líquido extracelular. Esta situación junto a la insuficiencia cardíaca propicia que se desencadene la aparición de edemas.

Además, la desnutrición predispone a los pacientes a la hipotermia, compromete gravemente la respuesta inmune celular, retrasa el tiempo de cicatrización, y aumenta la morbilidad y mortalidad de los sujetos⁹.

3.1.4 Detección del grado o riesgo de desnutrición

Para diagnosticar la desnutrición se deben combinar parámetros antropométricos, tales como el peso, talla, índice de masa corporal y especialmente la pérdida de peso en el tiempo; con parámetros bioquímicos como la albúmina, prealbúmina, o la proteína ligada al retinol⁹.

3.1.4.1 Parámetros biométricos.

El peso corporal es un parámetro muy útil para valorar la situación nutricional del individuo, pero no suficiente. Como valor absoluto tiene muchas limitaciones, puesto que puede estar falseado por edemas o ascitis. En combinación con la altura del sujeto, permite calcular el índice de masa corporal ($IMC = \text{peso en kg} / \text{altura en m}^2$), el cual permite diagnosticar con buena probabilidad una situación de desnutrición. También se puede evaluar utilizando como referente las tablas de normalidad para una determinada población, el porcentaje de peso del paciente referido al peso ideal.

Uno de los indicadores de desnutrición o de riesgo de desnutrición más fiable es la valoración de los cambios de peso que acontecen en el tiempo, con respecto al peso habitual del paciente. Se considera que una pérdida involuntaria de un 5% del peso previo en un mes o de un 10% en tres meses está relacionada con una probabilidad elevada de alcanzar un estado de desnutrición.

También se utiliza la medida de algunos pliegues cutáneos, como el tricipital, o el perímetro braquial, pese a que ambas medidas presentan una gran variabilidad intra e interobservador.

3.1.4.2 Parámetros bioquímicos

Hasta el momento no existe un marcador bioquímico ideal y único para diagnosticar la desnutrición, ya que la mayoría de parámetros de laboratorio tienen limitaciones por ser poco sensibles, poco específicos y sensibles a otros factores no nutricionales. Se ha utilizado la determinación de proteínas séricas, el recuento total de linfocitos o el balance nitrogenado, entre otros.

Se puede emplear la prealbúmina, la proteína ligada al retinol o *retinol binding protein* (RBP) o la transferrina; esta última con el inconveniente de que puede modificarse en la respuesta a alteraciones en el metabolismo del hierro.

No obstante, el marcador bioquímico que más se ha empleado en la práctica clínica ha sido la albúmina plasmática; proteína de síntesis hepática y semivida relativamente larga (de 16 a 21 días). La concentración plasmática de albúmina es muy sensible a los cambios del estado nutricional, y sus niveles se reducen hasta en un 50 por ciento en una desnutrición severa, lo cual parece estar relacionado de manera directa con el aporte de aminoácidos de cadena ramificada²⁰.

Cabe destacar que las modificaciones en la concentración plasmática de esta proteína pueden tener un origen multifactorial, entre

ellas las alteraciones hepáticas, incrementos del volumen acuoso extracelular o de las pérdidas renales, cutáneas o gastrointestinales. A pesar de ello, su determinación analítica es muy sencilla, además de ser un buen marcador de pronóstico evolutivo y, en consecuencia, se puede utilizar como control nutricional a largo plazo.

3.1.5 Sistemas de cribado: detección de la desnutrición y riesgo

En el ámbito hospitalario existen numerosos cuestionarios estructurados para realizar un cribado nutricional en el que se determinan tanto parámetros objetivos como subjetivos. La finalidad, por tanto, es efectuar una valoración inicial encaminada a detectar pacientes desnutridos o en riesgo nutricional, con el fin de remitirlos a una valoración nutricional más específica y/o implementar en ellos un plan nutricional. Los métodos de cribado nutricional se componen de una primera parte sencilla, que consta de 3-4 preguntas, cuya respuesta está ligada a protocolos de actuación validados que incluyen una valoración nutricional más específica y que combinan los parámetros anteriormente descritos en los pacientes de riesgo.

Entre los métodos de valoración nutricional empleados en clínica cabe destacar el Subjective Global Assessment (SGA)²¹, el Mini Nutritional Assessment (MNA)²², el Sistema de cribado para el CONTROL NUTricional (CONUT)²³, el Nutritional Risk Screening NRS-2002²⁴, el Malnutrition

Universal Screening Tool (MUST)²⁵ o el Mini Nutritional Assessment Short Form (MNA-SF)²⁶.

Hasta el momento no existe un consenso único en cuanto a cuál es el mejor método de diagnóstico. Todos los métodos de determinación del estado y del riesgo nutricional poseen limitaciones, puesto que ninguno posee un valor predictivo del 100% (gold standard). La sociedad europea de nutrición parenteral y enteral (ESPEN) recomienda utilizar una combinación de parámetros clínicos y bioquímicos para evaluar la desnutrición (por ejemplo, el NRS-2002 junto con MUST, o en combinación con MNA en pacientes geriátricos institucionalizados)²⁷.

3.2 Dietas enterales

La nutrición enteral (NE) es una técnica de soporte nutricional mediante la cual se aportan sustancias nutritivas al aparato digestivo, bien por vía oral, o bien directamente mediante sondas implantadas por vía nasal o enterostómica. Este proceso puede considerarse como un procedimiento terapéutico más, con sus indicaciones, contraindicaciones, e incluso técnicas especiales. La aplicación de este soporte nutricional ha de ser siempre un proceso individual y dinámico, adaptándose a las necesidades del paciente en cada momento, evolucionando a la par que su estado clínico.

Las *fórmulas de nutrición enteral* son productos constituidos por una mezcla de macro y micronutrientes, nutricionalmente equilibrada y

completa, que se puede administrar por vía oral o por vía enteral. Los *suplementos* se definen como mezclas de macro y micronutrientes desequilibradas, que sirven para reforzar o modificar una dieta.

Entre los diferentes criterios para clasificar las fórmulas enterales se emplean la densidad calórica (hipocalóricas, normocalóricas, hipercalóricas), la cantidad de proteínas (normoproteicas o hiperproteicas), la complejidad de las proteínas (oligoméricas o poliméricas), la existencia de fibra y el tipo, la osmolaridad y las formas de presentación^{28, 29}.

3.2.1 Utilidad terapéutica

Actualmente la NE ha dejado de ser exclusivamente un vehículo de nutrientes para alimentar al paciente y ha adquirido un papel terapéutico relacionado con los conceptos de “alimento-medicamento”, “nutrición órgano-específica” y “nutrición enfermedad-específica”. El conocimiento más profundo de la fisiopatología de distintas entidades clínicas y la implicación directa de algunos nutrientes específicos ha revolucionado la práctica de la NE, permitiendo no sólo nutrir a los pacientes sino hacerlo implicándose en el manejo terapéutico de la enfermedad de base. En estos casos, la Sociedad Española de nutrición Enteral y Parenteral (SENPE) define como “arma terapéutica” estas formulaciones enterales, puesto que los propios nutrientes poseen un efecto terapéutico³⁰.

Estas “fórmulas específicas en NE” son fórmulas poliméricas u oligoméricas, que alterando la cualidad o la cantidad de algún macro o

micronutriente o añadiendo nutrientes especiales, se apartan de la composición habitual del resto de las fórmulas de la NE³⁰.

Debido a las propiedades antioxidantes, citoprotectoras e inmunomoduladoras de la taurina, algunas fórmulas enterales comerciales se enriquecen con taurina. Concretamente aquellas destinadas a pacientes con ingesta disminuida, con dificultades para sintetizar taurina a partir de sus precursores ramificados, o para pacientes con elevadas pérdidas debidas a otras enfermedades. De esta forma, en numerosas afecciones de etiología dispar como en el síndrome de malabsorción, caquexia debida al cáncer, o en pacientes críticos (quemados, politraumatizados) se recomienda una dieta suplementada de taurina. La ESPEN incluyó en *“The surgical guidelines for enteral nutrition”* los beneficios que aporta en la prevención de complicaciones postoperatorias la instauración de la NE con las denominadas *“fórmulas inmunomoduladoras”* a los pacientes desnutridos que van a someterse a una intervención quirúrgica²⁷. En concreto, a este tipo de formulaciones enterales se tiende a añadir taurina por sus propiedades antioxidantes e inmunomoduladoras. Fórmulas de diferentes casas comerciales con la misma indicación, como T-Diet Plus® (TPD), Peptisorb® o Reconvan®, se suplementan con taurina, alcanzando estas dos últimas concentraciones iguales o superiores a 8 mg/100 ml^{31,32}.

3.3 TAURINA

La taurina, un metabolito resultante del catabolismo de la cisteína, se aisló por primera vez de la bilis de buey (*Box taurus*) en 1827. Es un

aminoácido que no se incorpora en las proteínas, y se encuentra libre en el citosol de prácticamente todos los tejidos de los animales vertebrados. En numerosos mamíferos, y concretamente en humanos, es la amina intracelular en forma libre más abundante³³.

3.3.1 Estructura y propiedades fisicoquímicas.

La taurina (ácido β-amino-etano-sulfónico) es un aminoácido sulfurado. La fórmula molecular de la taurina es C₂H₇NO₃S y se presenta en forma de sólido cristalino pulverulento de color blanco.

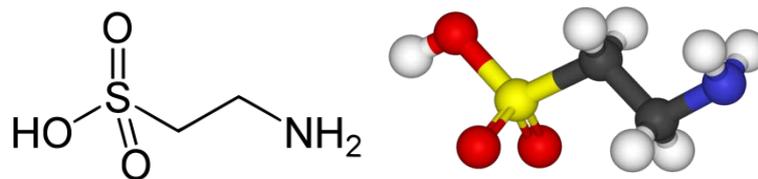


Figura 3-1. Estructura IUPAC y en 3 dimensiones de la taurina.

Posee un peso molecular de 125,15 g/mol, y una temperatura de fusión de 300°C. La solubilidad en agua fría o a temperatura ambiente es elevada, siendo la solubilidad máxima en estas condiciones de 65 g/l. Para su correcta conservación, se recomienda utilizar recipientes herméticamente cerrados y protegidos de la luz. No es necesario almacenar el producto a bajas temperaturas, puesto que no presenta problemas de estabilidad o degradación a temperatura ambiente (25°C)³⁴.

3.3.2 Absorción, metabolismo y excreción

Los niveles fisiológicos de taurina se alcanzan y se mantienen tanto por incorporación exógena a través de la dieta habitual, como por síntesis de novo a partir de la cisteína.

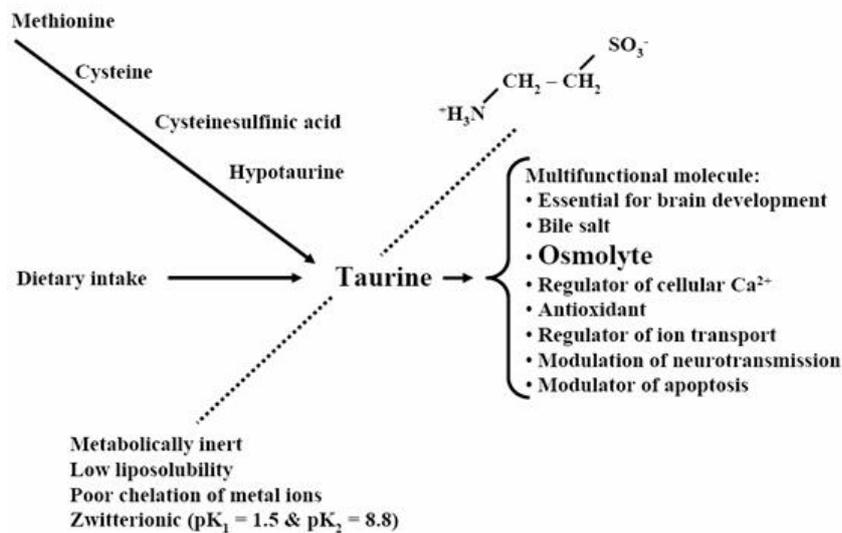


Figura 3-2. Esquema de obtención, síntesis y funciones de la taurina³⁵.

El paso de la taurina a través de las membranas celulares está facilitado por diversos transportadores, entre los que se encuentra el sistema de transporte de taurina β (TauT)³⁶. Es un transportador Na^+-Cl^- dependiente que transporta otras moléculas además de taurina, como β -alanina, y ácido γ -aminobutírico³⁷. Es un sistema de transporte saturable de alta afinidad y baja capacidad que se encuentra en altas concentraciones en riñón, hígado, cerebro, retina, placenta, células inmunes, músculo cardíaco y esquelético³⁸.

En el intestino, el transportador TauT se localiza en la membrana apical de los enterocitos. La absorción de aminoácidos, producto de la digestión proteica, a través de la membrana intestinal es muy eficiente (95-99%) y la actividad de este transportador parece ser mayor en animales en desarrollo que en adultos³⁶.

La metabolización del precursor cisteína a taurina ocurre en numerosos tejidos como riñón, corazón, cerebro, pulmones, leucocitos y músculo esquelético, siendo mayoritaria en el hígado. Durante el desarrollo, esta transformación en el hígado y en el cerebro es de gran importancia, donde a pesar de haber un déficit de la enzima, existe una elevada concentración de taurina³⁹.

El epitelio del túbulo proximal renal también contiene sistemas de transporte (TauT), que reabsorben de forma eficiente aminoácidos de la fracción filtrada. A diferencia de la mayoría de aminoácidos, la taurina no se reabsorbe completamente, y la fracción excretada puede variar ampliamente.

Esta reabsorción renal de la taurina juega un importante papel en el mantenimiento de los niveles corporales del aminoácido. Debido a las variaciones en la ingesta y a la regulación adaptativa en la reabsorción del aminoácido, los niveles de taurina excretados en orina varían ampliamente. Durante periodos de ingesta reducida o inadecuada de taurina o de sus precursores sulfurados, se excreta en orina una menor cantidad de taurina y las reservas de los tejidos se mantienen. La concentración renal de

taurina parece ser la señal que desencadena cambios en la actividad de los transportadores^{35, 40}.

3.3.3 Funciones

Una de las principales funciones de la taurina es su papel en la conjugación con ácidos biliares formado taurocolato. Puesto que los ácidos biliares se forman a partir del colesterol, la taurina contribuye a disminuir las concentraciones de colesterol circulantes excretándolo en forma de taurocolato.

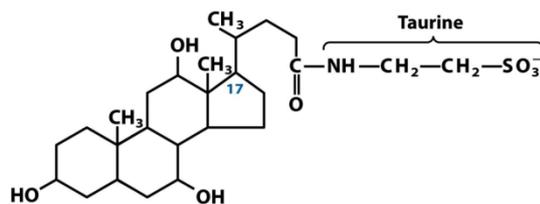


Figura 3-3. Estructura química del taurocolato

En los neonatos, especialmente en los prematuros de menos de 33 semanas de gestación, la suplementación de las fórmulas lácteas con taurina permite aumentar la síntesis de ácidos biliares tauroconjugados y la absorción de grasa. Asimismo, la taurina parece prevenir la colestasis.

Posee una función de gran relevancia en la respuesta inmunitaria por la capacidad de atrapar los oxidantes clorados, actuando como un potente antioxidante y reduciendo la expresión de citoquinas proinflamatorias⁴¹⁻⁴³. Además, debido a su capacidad antioxidante, participa en la protección frente al daño celular provocado por la hipoxia y

productos tóxicos e inhibe la apoptosis al detener la formación de radicales libres de oxígeno^{9, 44}.

Una función de gran relevancia es mediar como regulador osmótico, induciendo a su vez influencia sobre el potencial de membrana o la actividad enzimática celular⁴⁵. Debido a su implicación en la modulación del transporte de calcio intracelular y por su capacidad para estabilizar la membrana a la taurina se le atribuyen acciones inotrópicas, así como un importante papel en la neuromodulación⁴⁶. Se considera que en los mamíferos, la taurina participa en el desarrollo y crecimiento de las células troncales cerebrales precursoras de las neuronas⁴⁷ y en la excitación del sistema nervioso central (SNC), así como en la protección del músculo esquelético y cardíaco⁴⁸.

Por todo ello, la taurina se considera condicionalmente esencial⁴⁹, y además, algunos autores le confieren la característica potencial de fármaco-nutriente, entendiendo como tal a los sustratos nutritivos que, además de su valor nutricional, tienen efectos beneficiosos adicionales para el organismo, debido principalmente a su papel en la preservación de la función orgánica frente a un elevado impulso catabólico⁹.

3.3.4 Causas de deficiencia

Las causas que contribuyen a que se produzca una deficiencia de éste aminoácido se pueden clasificar según la edad de los pacientes.

- Neonatos: Síntesis endógena inmadura.

En neonatos y lactantes el aporte exógeno de taurina es importante, puesto que los sistemas enzimáticos necesarios para su obtención a partir de precursores no está completamente desarrollado, y el mecanismo de reabsorción tubular activo es limitado. Además, necesitan un alto aporte exógeno, puesto que la concentración de taurina en la retina en este grupo de población es muy elevada, y supone un 40-75% de los compuestos nitrogenados no proteicos libres. Un aporte de taurina reducido en esta fase del desarrollo, afecta drásticamente a los niveles del aminoácido.

- Adultos: alteraciones en la síntesis y aumento del estrés oxidativo.

En pacientes críticos con patologías hepáticas o renales, o en grupos especiales de enfermos, como son los oncológicos, terminales y enfermos de sida (VIH), el proceso endógeno de formación de taurina a partir de precursores se ralentiza, y tanto su excreción renal como las necesidades corporales de este aminoácido aumentan, provocando un descenso en las concentraciones de éste aminoácido aunque el aporte de los precursores sea el adecuado⁹.

En pacientes polimedcados, los procesos de detoxificación mediados por conjugación pueden saturarse, comprometiendo el aclaramiento de los fármacos. De esta forma, se acumulan los productos tóxicos, comprometiendo la calidad y seguridad del tratamiento. Además, si el paciente padece patologías en las que los procesos oxidativos están incrementados, el riesgo aumenta de forma considerable.

3.3.5 Ingesta recomendada

En recién nacidos alimentados con nutrición parenteral durante un tiempo prolongado o en aquellos con patologías, se recomienda un aporte exógeno de taurina debido a la inmadurez del sistema enzimático encargado de su obtención, así como por encontrarse los requerimientos aumentados⁴¹.

Al analizar las dietas de diferentes grupos de población adulta, se obtiene una gran disparidad en las cantidades de taurina ingeridas, en función de los alimentos que conforman la dieta base de los individuos. De esta forma, la cantidad de taurina ingerida por vegetarianos estrictos es indetectable, mientras que las dietas omnívoras europeas contienen una cantidad media de taurina de $463 \pm 156 \mu\text{M}/\text{día}$ ⁴⁰.

3.3.5.1 Recomendaciones de las sociedades científicas

La Sociedad Europea de Nutrición Clínica y Metabolismo (ESPEN), en la guía de nutrición parenteral señala que el tratamiento óptimo de la enfermedad metabólica hepática podría contemplar, entre otras opciones, la suplementación con taurina.

Las recomendaciones para la valoración nutricional y el soporte nutricional especializado de los pacientes críticos del Grupo de Metabolismo y Nutrición de la Sociedad de Medicina Intensiva Crítica y Unidades Coronarias (SEMICYUC) recoge que la mezcla de aminoácidos administrada en las dietas enterales y parenterales a pacientes con

patologías renales deben contener histidina, tirosina y taurina con un grado de recomendación C (recomendación favorable, no concluyente).

La ESPEN, la Sociedad Europea de Gastroenterología, Hepatología y Nutrición Pediátrica (ESPGHAN) y el documento de Consenso sobre Nutrición Parenteral Pediátrica de la Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral (SENPE), en sus guías específicas para la nutrición parenteral en la población pediátrica, concluyen respecto a la taurina, que en los recién nacidos pretérmino no hay evidencias que permitan apoyar la suplementación, pero recomiendan que en los preparados destinados a este grupo de población ésta debe encontrarse en la misma cantidad que en la leche humana (aproximadamente 2,8 mg de taurina/g de aminoácido), y que no existe evidencia científica que permita hacer recomendaciones sobre los límites inferior o superior recomendables⁹.

3.4 Análisis Farmacocinético

La farmacocinética puede definirse como la rama de la farmacia que estudia el paso de los medicamentos por el organismo. Para ello, se desarrollan diferentes modelos que simplifican los numerosos procesos que tienen lugar entre el organismo y el fármaco. En todos los modelos, el estudio detallado de los sucesivos pasos que atraviesa el fármaco en el organismo se agrupan con el acrónimo LADME: Liberación del producto activo, Absorción del mismo, Distribución por el organismo, Metabolismo y Excreción del analito o los metabolitos resultantes.

El tratamiento de los datos puede realizarse atendiendo a dos perspectivas, la teoría compartimental clásica o la teoría no compartimental. En la teoría compartimental, pese a que el modelo policompartimental es el más próximo a la realidad, la complicación que conlleva ha hecho que sean los modelos monocompartimental y bicompartimental los más usados.

3.4.1 Análisis farmacocinético compartimental

Las teorías compartimentales describen al organismo como un conjunto de compartimentos. Cada compartimento representa una fracción de material biológico en la que el fármaco se supone uniformemente distribuido y presenta las mismas propiedades cinéticas. Se trata de un concepto meramente cinético, ya que estos compartimentos no tienen por qué corresponder con estructuras fisiológicas, en un sentido estricto.

3.4.1.1 Modelos farmacocinéticos lineales

Un modelo farmacocinético lineal es aquel en el que los procesos cinéticos que determinan la evolución temporal del fármaco en el organismo responden a cinéticas de orden uno y por ello, puede aplicarse el principio de superposición. En este caso, los valores de los parámetros farmacocinéticos no varían con la dosis, la concentración del fármaco a un tiempo dado es directamente proporcional a la dosis administrada y el área bajo la curva (AUC) es una función lineal de la dosis administrada.

Clásicamente los modelos más utilizados en la descripción del comportamiento cinético de los fármacos han sido el monocompartimental y el bicompartimental.

Modelo farmacocinético monocompartimental

El modelo monocompartimental es el modelo más sencillo, puesto que considera el organismo como un único compartimento teórico de carácter fundamentalmente acuoso. Por ello, tras la administración intravenosa rápida, el analito se encuentra distribuido de manera instantánea y uniforme en todo el organismo, pudiendo considerar la concentración plasmática, Cp, igual a la del resto del cuerpo.

La ecuación diferencial que describe la evolución de la concentración de fármaco en el modelo monocompartimental tras la administración intravenosa rápida y eliminación de primer orden es la siguiente:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{el} \cdot C \qquad \text{Ecuación 3.1}$$

donde C es la concentración de fármaco en el compartimento y K_{el} la constante de eliminación del fármaco.

Modelo farmacocinético bicompartimental

La mayoría de los fármacos requieren un modelo más complejo que el monocompartimental. El siguiente modelo en complejidad, modelo bicompartimental, intenta reflejar el hecho de que la distribución del

fármaco o analito en el organismo no es un proceso instantáneo. Tras la administración intravenosa rápida, este modelo considera el organismo dividido en dos compartimentos teóricos, el central, constituido por los tejidos en los que se alcanza un rápido equilibrio en la distribución de la molécula (y puede considerarse instantáneo) y periférico, que corresponde a los tejidos en los que el equilibrio en la distribución precisa un mayor tiempo para alcanzarse. Si la administración es extravasal se consideran tres compartimentos, uno externo (lugar de absorción) y dos internos (central y periférico).

De esta forma, el compartimento central está constituido por el plasma, el fluido intersticial y el agua intracelular de tejidos con flujo sanguíneo superior a 0,5 ml/g/min. En cambio, el compartimento periférico está constituido por los depósitos no acuosos y el agua intracelular de los tejidos con flujo sanguíneo inferior a 0,05 ml/g/min (tejido muscular, adiposo,...). El analito se encuentra distribuido de manera uniforme en cada compartimento, de modo que la concentración plasmática, C_p , se considera igual a la del compartimento central, y entre ambos compartimentos existe un equilibrio representado por las constantes de transferencia del central al periférico, k_{12} , y la de retorno a central, k_{21} .

Administración intravenosa rápida

Tras la administración de una dosis única, tipo bolus intravenoso, de un fármaco con características de bicompartimentalidad y velocidad de eliminación de orden uno, las ecuaciones diferenciales que describen la

evolución de las concentraciones en cada uno de los compartimentos son las siguientes:

$$\frac{dC}{dt} = -k_{12} \cdot C - k_{10} \cdot C + k_{21} \cdot P \quad \text{Ecuación 3.2}$$

$$\frac{dP}{dt} = k_{12} \cdot C - k_{21} \cdot P \quad \text{Ecuación 3.3}$$

siendo C y P las concentraciones de fármaco en el compartimento central y periférico, respectivamente, k_{12} y k_{21} , las constantes de transferencia del central al periférico y de retorno a central, respectivamente y k_{10} , la constante de eliminación del fármaco.

La distribución del fármaco en el organismo no es un proceso instantáneo. Tras su administración, el fármaco se distribuye instantáneamente en el compartimento central, desde el cual accede al compartimento periférico, de acuerdo con una cinética de primer orden, regido por la constante de velocidad k_{12} . Desde este compartimento periférico, retorna al compartimento central, de acuerdo a un proceso de primer orden, regido por la constante de velocidad k_{21} . El proceso que motiva la desaparición del fármaco del compartimento central, por eliminación y por distribución al compartimento periférico, se denomina disposición.

Tras la administración del fármaco, la concentración del mismo en el compartimento central disminuye rápidamente hasta obtener el estado de equilibrio de distribución. Esta fase se denomina fase rápida de

disposición y está determinada por la constante híbrida α . A continuación, se inicia una fase de disposición lenta, en la cual las concentraciones de fármaco del compartimento central se reducen más lentamente. La fase de disposición lenta se encuentra definida por la constante híbrida β . Ambas constantes híbridas tienen unidades de tiempo recíproco (t^{-1}).

La ecuación 3.2 en su forma integrada adopta la siguiente expresión:

$$C = A_0 \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} \quad \text{Ecuación 3.4}$$

siendo A_0 y B_0 los coeficientes de disposición, α y β la constante de disposición rápida y lenta, respectivamente.

Los parámetros de disposición se relacionan con las constantes reales del modelo y con el volumen de distribución del compartimento central, V_c , mediante las siguientes ecuaciones:

$$A_0 = \frac{D \cdot (\alpha - k_{21})}{V_c \cdot (\alpha - \beta)} \quad \text{Ecuación 3.5}$$

$$B_0 = \frac{D \cdot (k_{21} - \beta)}{V_c \cdot (\alpha - \beta)} \quad \text{Ecuación 3.6}$$

$$\alpha = \frac{k_{12} + k_{21} + k_{10} + \sqrt{(k_{12} + k_{21} + k_{10})^2 - 4 \cdot k_{21} \cdot k_{10}}}{2} \quad \text{Ecuación 3.7}$$

$$\alpha = \frac{k_{12} + k_{21} + k_{10} - \sqrt{(k_{12} + k_{21} + k_{10})^2 - 4 \cdot k_{21} \cdot k_{10}}}{2} \quad \text{Ecuación 3.8}$$

El carácter aparente del volumen de distribución en el modelo bicompartimental se acentúa al considerar la lenta ocupación del compartimento periférico. En este modelo se considera el volumen del compartimento central, V_c , y el volumen del compartimento periférico, V_p , cuya suma es el volumen de distribución corporal, V_d . Sin embargo, sólo presenta una verdadera utilidad cinética el V_c , ya que es el único que puede calcularse con exactitud y por procedimientos directos. De hecho, para el cálculo de la cantidad de fármaco en el compartimento central y periférico, Q_c y Q_p respectivamente, sólo se requiere conocer V_c . No obstante, V_p y V_d son ilustrativos de la mayor o menor capacidad de distribución a tejidos y estructuras extravasculares.

El concepto de semivida biológica de un fármaco que presenta un comportamiento de distribución bicompartimental, cobra sentido cuando la curva entra en su fase monoexponencial terminal o fase lenta de disposición. Así, el término semivida biológica coincide con el término de semivida en fase beta, $t_{1/2\beta}$, y su valor se calcula mediante la Ecuación 3.9. En este caso, se comprende fácilmente que la semivida biológica es un parámetro de disposición y no de eliminación, pues depende de la constante híbrida β .

$$t_{1/2\beta} = \frac{\ln 2}{\beta}$$

Ecuación 3.9

Administración oral

El hecho de que exista un mayor número de fenómenos de transferencia del fármaco en el organismo, dificulta la correcta interpretación de las constantes de velocidad de cada proceso. Esta dificultad es mayor cuando no se dispone de datos obtenidos tras la administración del fármaco por vía intravenosa.

El modelo extravasal bicompartimental se caracteriza por el hecho de que el valor de V_d y V_c , que se obtienen por vía oral, no coinciden con los obtenidos por vía intravenosa, puesto que llevan implícita la fracción de dosis absorbida, f . Las variaciones de concentración por unidad de tiempo, en cada uno de los compartimentos considerados, corresponden a las ecuaciones diferenciales:

$$\frac{dC}{dt} = k_{01} \cdot A - k_{10} \cdot C - k_{12} \cdot C + k_{21} \cdot P \quad \text{Ecuación 3.10}$$

$$\frac{dA}{dt} = -k_{01} \cdot A \quad \text{Ecuación 3.11}$$

$$\frac{dP}{dt} = k_{12} \cdot C - k_{21} \cdot P \quad \text{Ecuación 3.12}$$

dónde A es la concentración de fármaco en lugar de absorción y k_{01} , la constante de absorción del fármaco.

Mediante el método de las transformadas de Laplace y tras aplicar varias técnicas algebraicas se llega a la expresión integrada:

$$C = A_0 \cdot e^{-\alpha \cdot t} + B_0 \cdot e^{-\beta \cdot t} + P_0 \cdot e^{-k_{01} \cdot t} \quad \text{Ecuación 3.13}$$

Se trata de una ecuación triexponencial, siendo representativa cada exponencial de los procesos que sufre el fármaco: absorción, regida por la k_{01} ; la fase de disposición rápida y lenta, regidas por α y β , respectivamente.

3.4.1.2 Modelos farmacocinéticos no lineales

Los procesos de absorción, distribución y eliminación de los fármacos no son siempre lineales, en ocasiones puede tratarse de procesos saturables. La absorción puede tener lugar mediante un proceso mediado por portadores, la distribución puede verse afectada por la unión del fármaco a las proteínas plasmáticas o a depósitos tisulares y la eliminación puede llevarse a cabo mediante mecanismos susceptibles de saturarse, como es el caso de la secreción y reabsorción tubular activa o el metabolismo. Se trata de procesos no lineales y en estos casos, los fármacos y/o nutrientes se caracterizan por tener una farmacocinética no lineal. En los modelos no lineales no se cumple el principio de superposición y no existe una proporcionalidad entre la dosis y concentraciones plasmáticas, ni entre la dosis y AUC.

El fenómeno saturable de no linealidad puede ser expresado a través de la ecuación de Michaelis-Menten:

$$-\frac{dC}{dt} = \frac{V_{max} \cdot C}{K_m + C} \quad \text{Ecuación 3.14}$$

siendo V_{max} la velocidad máxima del proceso, la cual es proporcional a la concentración total de las enzimas encargadas de la biotransformación o a los sistemas de transporte implicados, K_m es la constante de Michaelis-Menten y corresponde con la concentración a la cual la velocidad del proceso es la mitad de la máxima, y C es la concentración plasmática a tiempo t .

Cuando la concentración de fármaco o nutriente es inferior a la de saturación del proceso no lineal ($C \ll K_m$), la velocidad del proceso varía proporcionalmente con la concentración, ya que la Ecuación 3.14 puede simplificarse a:

$$-\frac{dC}{dt} = \frac{V_{max}}{K_m} \cdot C = K_{el} \cdot C \quad \text{Ecuación 3.15}$$

En este caso puede considerarse que el proceso sigue una cinética de pseudo-primer orden, ya que la relación V_{max}/K_m representa una constante (K_{el}).

A concentraciones próximas a la de saturación la velocidad aumenta de forma menos rápida y cuando las concentraciones superan significativamente este umbral de saturación ($C \gg K_m$) la velocidad del proceso se estabiliza y no varía en función de la concentración. En este caso, la Ecuación 3.14 puede simplificarse en la siguiente expresión:

$$-\frac{dC}{dt} = V_{max} \quad \text{Ecuación 3.16}$$

puesto que el proceso tiene lugar a velocidad constante, puede ser considerado un proceso cinético de orden cero.

En consecuencia, los procesos no lineales regidos por una cinética de Michaelis-Menten se ajustan a un proceso cinético de orden uno para concentraciones bajas y de orden cero para concentraciones elevadas.

3.4.2 Análisis farmacocinético no compartimental

A diferencia del modelado compartimental, el organismo no está considerado por compartimentos de naturaleza cinética diferente, en este caso constituye una sola entidad cinética.

El cálculo de los parámetros farmacocinéticos se basa en la estimación del área bajo la curva de nivel plasmático frente al tiempo (AUC), definido por la Ecuación 3.17.

$$AUC_0^\infty = \int_t^\infty C \cdot dt \quad \text{Ecuación 3.17}$$

Para la estimación del AUC se puede escoger el método trapezoidal o logarítmico trapezoidal. El cálculo consiste en sumar las áreas de los trapecios definidos por los valores experimentales de concentración plasmática y tiempos de toma de muestra. El área correspondiente al tramo final de la curva, desde el último punto experimental hasta el infinito, se determina aplicando la Ecuación 3.18.

$$\int_0^\infty C \cdot dt = \frac{C^*}{\lambda} \quad \text{Ecuación 3.18}$$

En esta expresión, λ es la pendiente de la recta que define la fase terminal de la curva semilogarítmica, t^* el tiempo de muestra del último punto experimental y C^* el valor teórico de concentración plasmática a ese tiempo.

A partir de AUC de cero a infinito AUC_0^∞ y la dosis administrada D , se puede calcular los parámetros farmacocinéticos del fármaco o nutriente, entre otros, el aclaramiento plasmático (Cl_p).

$$Cl_p = \frac{D}{AUC_0^\infty}$$

Ecuación 3.19

3.4.3 Análisis farmacocinético poblacional

La farmacocinética poblacional tiene su principal aplicación en el estudio del comportamiento de los fármacos y nutrientes, mediante la estimación de valores medios de los parámetros farmacocinéticos en un grupo de individuos o población; así como la variabilidad asociada con dichos parámetros. Según lo expuesto, el término de farmacocinética poblacional se podría aplicar a aquellos estudios que investigan la variabilidad en las concentraciones plasmáticas entre los individuos cuando se administra un régimen de dosificación estándar⁵⁰.

Analizar la información disponible de todos los sujetos en estudio permite de manera simultánea cuantificar tanto la magnitud de la variabilidad dentro de la población de estudio como la contribución de determinadas características (demográficas, fisiopatológicas o

terapéuticas) a dicha variabilidad. De esta forma, factores como la edad, sexo, hábitos, fenotipo genético, enfermedades o de adherencia al tratamiento pueden dar lugar a variabilidad en la respuesta (concentración) para un régimen de dosificación dado. La influencia de estas características de los sujetos en los parámetros farmacocinéticos y farmacodinámicos se conoce como **variabilidad interindividual**.

Otra fuente de variación es la **variabilidad residual**. En ella se engloban factores tales como la **variabilidad intraindividual**, caracterizada por cambios en los valores de los parámetros farmacocinéticos en un mismo paciente a lo largo del tiempo. Otras fuentes de variabilidad residual son los errores asociados al ensayo como el error de la técnica analítica, el error en la selección del modelo, el error en los tiempos de muestreo.

3.4.3.1 Modelos de efectos mixtos no lineales

Los modelos de efectos mixtos implementados en los programas comerciales para efectuar análisis poblacionales incluyen dos componentes fundamentales: **modelo estructural**, cuyos parámetros constituyen los efectos fijos (puede incluir o no covariables), y el **modelo estadístico** o de varianza, cuyos parámetros constituyen los efectos aleatorios. Estos modelos consideran que la variabilidad global observada en la respuesta medida (concentración del analito) en una muestra de n individuos es producto tanto de la de la variabilidad interindividual como del error residual (incluyendo la variabilidad intraindividual).

La concentración observada en un individuo dado, dentro del contexto de los modelos de efectos mixtos no lineales, puede ser descrita mediante la Ecuación 3.20

$$y_{ij} = f_{ij}(\theta_i, x_{ij}) + \epsilon_j \quad \text{Ecuación 3.20}$$

siendo y_{ij} para $j=1, \dots, n$, las observaciones experimentales del individuo i a cada uno de los tiempos x_{ij} , θ_i es el vector de parámetros farmacocinéticos del individuo i . f_{ij} es una función no lineal que establece la relación entre predicciones y parámetros farmacocinéticos en cada individuo i , o dicho de otro modo, el modelo estructural que mejor explica las observaciones experimentales de cada individuo i a cada tiempo j . ϵ_j es el error de medida de la observación al tiempo j , o dicho de otro modo, la desviación entre el valor observado y el esperado a tiempo j . La Ecuación 3.20 forma parte de un modelo poblacional puesto que puede definirse para todos los individuos, es decir, $i=1, \dots, N$, donde N es el número de individuos de la muestra. Se asume, en general, que los valores de ϵ_j son independientes y presentan una distribución simétrica alrededor de cero y de varianza σ^2 , representativa de la variabilidad residual. Es lógico asumir que los parámetros farmacocinéticos (θ_i) son los mismos desde un punto de vista cualitativo para todos los individuos de la población pero pueden variar cuantitativamente de uno a otro. Matemáticamente esto puede expresarse mediante la ecuación 3.21

$$\theta_i = g(\bar{\theta}, z_{ij}) + \eta_i \quad \text{Ecuación 3.21}$$

siendo g un modelo estructural (no cinético) que describe el valor esperado de θ_i como función de una serie de covariables específicas para

cada individuo z_{ij} , tales como peso, edad, etc. (que pueden variar con el tiempo), y el vector de parámetros poblacionales $\bar{\theta}$. Se asume que los valores de η_i son independientes y describen una distribución simétrica alrededor de cero y de varianza ω^2 , representativa de la variabilidad interindividual asociada al parámetro $\bar{\theta}$.

Como consecuencia, la aproximación de los modelos no lineales de efectos mixtos proporciona por una parte los valores poblacionales de los parámetros farmacocinéticos ($\bar{\theta}$) comunes a todos los sujetos del estudio (efectos fijos), y por otra, los valores poblacionales de los parámetros de efectos aleatorios, representativos de la variabilidad interindividual y residual. Estos últimos vienen dados por las varianzas de las distribuciones de los valores de η_i (ω^2) e ε_j (σ^2), respectivamente, a su vez obtenidas a partir de las matrices de varianza-covarianza Ω y Σ , respectivamente.

Modelo estructural

El modelo estructural describe el comportamiento farmacocinético medio (también denominado típico) del fármaco o nutriente en la población de estudio. En una primera etapa se identifica el modelo estructural base que mejor describe las observaciones en ausencia de covariables. Una vez identificado, se desarrollarán modelos de covariables que consiste en incluir aquellos factores de pronóstico (covariables) que puedan tener influencia clínica y estadísticamente significativa en alguno de los parámetros farmacocinéticos del modelo base. Tanto los valores poblacionales de los parámetros farmacocinéticos como los parámetros de

regresión de las covariables incluidas en el modelo estructural se conocen como efectos fijos.

Modelo estadístico

El modelo estadístico describe los dos niveles de variabilidad o efectos aleatorios ya mencionados, es decir, la variabilidad interindividual y el error residual. No solo el valor medio de los parámetros farmacocinéticos es importante, sino también la variabilidad asociada a los mismos entre los distintos individuos que constituyen la población. Dicha variabilidad no debe confundirse con el error estándar asociado a la precisión de la estimación del parámetro, sino que representa la magnitud de la variación de dicho parámetro de un individuo a otro. Esta variabilidad convierte al parámetro en un efecto aleatorio en contraposición a un efecto fijo que no presenta variabilidad asociada.

3.4.4 Biodisponibilidad

La *biodisponibilidad* es un parámetro biofarmacéutico, desarrollado en el ámbito de la Farmacocinética, cuyo fin es evaluar el aprovechamiento de los fármacos en el organismo. En 1945 Oser y col. introdujeron una aproximación al concepto actual de *biodisponibilidad*: la *disponibilidad fisiológica*⁵¹. Ésta define la cantidad de fármaco absorbido en relación a una formulación de referencia. Posteriormente, en 1958, Dost y col. demostraron la existencia de una relación entre el área bajo la curva de la concentración plasmática del fármaco- tiempo (AUC) y la fracción de dosis absorbida, enunciando así la ley de proporcionalidad de las áreas⁵². Esta ley

dio lugar al uso de la vía intravenosa como patrón universal; así como al origen de los conceptos de *biodisponibilidad absoluta*, y *biodisponibilidad relativa*.

Se entiende por *biodisponibilidad absoluta*, la comparación entre los resultados obtenidos tras la administración extravasal de un fármaco, con los obtenidos tras la administración intravenosa de dicho fármaco. Por definición, cualquier fármaco formulado para la vía intravenosa presenta una biodisponibilidad del 100%. Ésta intenta determinar los factores que puedan afectar al aprovechamiento del fármaco tras su administración extravasal, especialmente aquellos referidos a funciones fisiológicas y procesos de absorción.

Sin embargo, cuando se comparan dos formas de dosificación diferentes administradas por la misma vía extravasal, o bien por distintas vías extravasales, se cuantifica la *biodisponibilidad relativa*. Ésta da información acerca de los efectos de las diferentes formas de dosificación en la absorción del fármaco, incluyendo factores como el pK_a , estado físico, grado de cristalización, propiedades físico-químicas del fármaco y otras propiedades dependientes de la forma farmacéutica empleada, como la velocidad de disolución y las variables de fabricación.

El concepto de biodisponibilidad, a su vez, incluye otros dos conceptos: *biodisponibilidad en magnitud*, que representa la fracción de la dosis administrada que alcanza de forma inalterada la circulación sistémica⁵³ y la *biodisponibilidad en velocidad*, la velocidad con la que se produce dicho proceso⁵⁴.

Para el estudio del aprovechamiento del fármaco, la farmacocinética no sólo tiene en cuenta la cantidad de fármaco que accede inalterado a la circulación sistémica, sino también la velocidad con la que accede; ya que una baja biodisponibilidad en velocidad puede originar niveles subterapéuticos y por el contrario, si es elevada, puede ocasionar toxicidad.

La biodisponibilidad está condicionada por diversos factores relacionados con el principio activo, con la formulación, incluso con el individuo. De manera que una baja biodisponibilidad puede ser debida a fenómenos de primer paso intestinal y/o hepático, y también a una baja absorbabilidad. Por tanto, las posibles causas de una absorción no completa de la dosis administrada pueden ser una velocidad de disolución lenta, malas propiedades de absorción o una formulación inadecuada que impida la liberación durante el tiempo de tránsito útil para la absorción.

3.4.4.1 Determinación de la biodisponibilidad

Los estudios de biodisponibilidad se basan en el tratamiento de las curvas de concentración plasmática de la molécula objeto de estudio frente al tiempo (AUC). En ocasiones, también se usan las curvas de excreción urinaria

Biodisponibilidad en magnitud

En la determinación de la biodisponibilidad a partir de dosis únicas, se asume que la cantidad de fármaco que accede al plasma, equivale a la

cantidad de fármaco que se elimina de éste; transcurrido el tiempo suficiente para su eliminación completa.

La velocidad de eliminación, cantidad de fármaco eliminado por unidad de tiempo, puede expresarse como:

$$\frac{dQ_{el}}{dt} = Cl \cdot C \quad \text{Ecuación 3.22}$$

siendo C la concentración plasmática del fármaco y Cl el aclaramiento plasmático total. Esta ecuación se puede transformar en:

$$dQ_{el} = Cl \cdot C \cdot dt \quad \text{Ecuación 3.23}$$

Tras la administración intravenosa del fármaco, puede considerarse que la cantidad total del fármaco eliminado a tiempo infinito, corresponde a la cantidad administrada, es decir, a la dosis D. De este modo, si se integra la expresión anterior entre tiempo cero e infinito se obtiene:

$$\int_0^{Div} dQ_{el} = Cl \int_0^{\infty} C \cdot dt \quad \text{Ecuación 3.24}$$

La integral equivale al área bajo la curva de nivel plasmático (AUC).Sustituyendo en la ecuación anterior se llega a:

$$D_{iv} = Cl \cdot AUC \quad \text{Ecuación 3.25}$$

Si el fármaco es administrado por vía extravasal, la expresión se transforma en:

$$f \cdot D_{ev} = Cl \cdot AUC_0^{\infty} \quad \text{Ecuación 3.26}$$

$$f = \frac{Cl \cdot AUC_0^{\infty}}{D_{ev}} \quad \text{Ecuación 3.27}$$

siendo f la fracción de dosis que accede inalterada a la circulación sistémica, y D_{ev} la dosis de fármaco administrada por vía extravasal. Se puede establecer que la cantidad de fármaco que se elimina del plasma es directamente proporcional al Cl y al AUC. De forma que, si se conocen ambos parámetros y la dosis administrada, se puede calcular la biodisponibilidad en magnitud, que puede expresarse en tanto por uno.

La biodisponibilidad absoluta en magnitud de un fármaco se puede expresar mediante la siguiente ecuación:

$$f = \frac{AUC_{ev} \cdot D_{iv}}{AUC_{iv} \cdot D_{ev}} \quad \text{Ecuación 3.28}$$

Si se asume que tras la administración del fármaco por vía intravenosa, el 100% de la dosis administrada alcanza la circulación sistémica y que el Cl del fármaco, para un mismo individuo, es constante dentro del ámbito de dosis administrada e independiente de la vía de administración y de la forma farmacéutica utilizada.

En el caso de que las dosis administradas por vía intravenosa y extravasal sean iguales, se puede simplificar la expresión anterior y se obtiene la siguiente:

$$f = \frac{AUC_{ev}}{AUC_{iv}} \quad \text{Ecuación 3.29}$$

Otro método utilizado en la determinación de la biodisponibilidad en magnitud, es el basado en las curvas de excreción urinaria, aunque para

fármacos que sufren biotransformación y se excretan parcialmente inalterados, tiene una utilidad limitada.

Cuando no es factible la administración del fármaco por vía intravenosa, se suele utilizar como patrón de referencia otra administración extravasal del fármaco, lo más biodisponible posible. De manera que se realiza un estudio de biodisponibilidad comparativo, respecto al patrón de referencia, determinándose la biodisponibilidad relativa. Sustituyendo en la Ecuación 3.29, el valor del AUC_{iv} , por el AUC del patrón de referencia, AUC_r , se obtiene:

$$f_{rel} = \frac{f_p}{f_r} = \frac{AUC_p/D_{evp}}{AUC_r/D_{evr}} = \frac{AUC_p \cdot D_{evr}}{AUC_r \cdot D_{evp}} \quad \text{Ecuación 3.30}$$

En la que el subíndice r identifica la formulación de referencia y el subíndice p la formulación problema.

La biodisponibilidad puede determinarse también tras la administración de dosis múltiples, para lo que se requiere haber alcanzado el estado estacionario. La determinación de la biodisponibilidad en condiciones de equilibrio estacionario presenta una serie de ventajas que pueden concretarse en las siguientes:

- La biodisponibilidad se estima en una situación más próxima a la aplicación clínica del fármaco.
- Se requiere menos muestras de plasma para determinar el valor de AUC para un intervalo de dosificación respecto a las necesarias tras la administración de una dosis única.

- Los niveles plasmáticos son generalmente superiores a los de una dosis única, lo cual permite, generalmente, una mayor fiabilidad de la técnica analítica.

Las principales desventajas de la estimación de la biodisponibilidad en condiciones de equilibrio estacionario radican en:

- La obligatoriedad de adaptarse estrictamente al régimen posológico (existe un mayor riesgo de incumplimiento en el paciente)
- La duración del estudio es más prolongada en comparación con la estimación tras dosis únicas
- Mayor riesgo para los sujetos al recibir un mayor número de dosis.

La estimación tras dosis múltiples se basa en el hecho de que el área bajo la curva desde tiempo cero hasta infinito (AUC_0^∞) tras la administración de una dosis única es igual al área bajo la curva correspondiente a un intervalo de dosificación cuando se ha alcanzado el estado de equilibrio estacionario, AUC_τ , siempre que el comportamiento del fármaco considerado sea lineal.

A partir de esta igualdad pueden aplicarse las ecuaciones de 3.26 a 3.30 sustituyendo los valores de AUC_0^∞ correspondientes a dosis únicas, por los del área de un intervalo de dosificación en estado estacionario AUC_τ .

El cálculo del AUC puede realizarse utilizando métodos modelo-independientes o modelo-dependientes. Estos últimos, utilizan expresiones matemáticas en las que intervienen los parámetros obtenidos a partir de un modelo compartimental. En estudios de biodisponibilidad, la utilización del AUC calculada mediante métodos modelo-dependientes presenta inconvenientes ya que en algunos casos las ecuaciones matemáticas definidas por los modelos farmacocinéticos no pueden ajustarse correctamente a las curvas obtenidas para cada individuo.

Dentro de los métodos modelo-independientes más utilizados se encuentran:

Método trapezoidal. Es el más utilizado y sencillo. Subestima el área durante la fase de absorción y la sobrestima en la fase descendente, de forma que ambos efectos se compensan y el resultado suele ser bastante exacto⁵⁵.

Método logarítmico trapezoidal. Utiliza la transformación logarítmica entre cada par de concentraciones. Es el método de elección en la fase monoexponencial terminal de la curva de niveles plasmáticos.

Método mixto. Utiliza el método trapezoidal hasta la fase monoexponencial terminal y el método logarítmico trapezoidal durante esta última fase.

Biodisponibilidad en velocidad

En ocasiones, establecer un modelo farmacocinético apropiado, para interpretar las curvas de nivel plasmático y su incidencia en la estimación de la biodisponibilidad, presenta dificultades. La Agencia Europea del Medicamento (EMA) y la Food and Drug Administration (FDA) recomiendan la utilización de parámetros puntuales como C_{max} o t_{max} , y si bien ambas coinciden en que la información que suministran dichos parámetros es escasa e imprecisa, su determinación experimental es obligada⁵⁶⁻⁵⁸. El C_{max} o máxima concentración plasmática observada representa la concentración plasmática máxima alcanzada tras la administración extravascular de un fármaco y está relacionada con la cantidad de fármaco absorbida. El t_{max} o tiempo máximo representa el tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima del fármaco (C_{max}) en sangre tras la administración extravascular. En el análisis no compartimental los valores de C_{max} y T_{max} corresponden a los valores experimentales observados.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 *Taurina*

La molécula objeto de estudio, taurina, ha sido adquirida de Sigma Aldrich, con una pureza establecida superior al 99%. También se ha administrado como parte integrante de la composición de dos preparados enterales ricos en nutrientes, T-Diet Plus[®] (TDP) e Isosource-ST[®] (IST), comercializados por los laboratorios Vegemat y Novartis, respectivamente.

4.1.1 Taurina en solución libre

Tanto para la administración oral como intravenosa, se han elaborado soluciones de taurina a las concentraciones de 1, 10 y 100 mg/ml.

Las soluciones de ensayo de 1 y 10 mg/ml se obtienen a partir de una solución madre de taurina que contiene 100 mg de aminoácido por ml. Para ello, se pesan 5 g de taurina y se colocan en un matraz aforado de 50 ml. A continuación, se enrasa el matraz con suero fisiológico (Cloruro sódico simple[®], Braun S.A.) y se sonica hasta su completa disolución. La solución de 10 mg/ml se obtiene por dilución 1/10 de la solución madre con suero fisiológico, y la de 1 mg/ml a partir de una dilución 1/100. Finalmente se comprueba la osmolaridad de las soluciones mediante un osmómetro automático Osmomat OM-6020. En caso de necesidad, se corrige la tonicidad de las muestras utilizando como isotonzante la

cantidad necesaria de Cloruro sódico, para alcanzar el valor fisiológico de 300 mOsm. Las soluciones se preparan el mismo día que se realiza la administración, y se conservan en nevera un máximo de 5 días.

4.1.2 Preparados enterales

Se ha evaluado el valor añadido que representa el suplemento de taurina en un preparado destinado a la nutrición enteral. Se han seleccionado dos dietas enterales: T-Diet Plus Standard® (TDP) como preparado problema (lote 8861) e Isosource-ST® (IST), como preparado de referencia (lote 0279). Las características diferenciales entre los preparados enterales seleccionados son básicamente dos: la primera que el preparado TDP está enriquecido con el aminoácido taurina en forma libre, mientras que el IST no lo está, y la segunda es la fuente de proteína de origen vegetal utilizada en cada preparado, siendo la proteína de guisante la integrante en el preparado IST y la de soja en el preparado TDP. En el Cuadro 4-1 se describe la composición cualitativa y cuantitativa, referida a 100 ml de preparado enteral, de las dos dietas estudiadas.

Composición	IST por cada 100 ml	TDP por cada 100 ml
Valor energético	100 Kcal	100 Kcal
Proteínas	4,0 g	4,0 g
Hidratos de carbono	12,3 g	13,6 g
Grasas	3,9 g	3,3 g
Fibra alimentaria	1,7 g	-----

Minerales	Calcio	70,00	mg	Calcio	55,00	mg
	Fósforo	65,00	mg	Fósforo	55,00	mg
	Potasio	250,00	mg	Potasio	135,00	mg
	Sodio	83,33	mg	Sodio	70,00	mg
	Cloruro	126,67	mg	Cloruro	100,00	mg
	Hierro	0,83	mg	Hierro	1,10	mg
	Zinc	0,73	mg	Zinc	1,10	mg
	Cobre	60,00	µg	Cobre	0,14	mg
	Yodo	10,00	µg	Yodo	12,00	µg
	Selenio	3,67	µg	Selenio	4,60	µg
	Magnesio	24,67	mg	Magnesio	22,00	mg
	Manganeso	0,15	mg	Manganeso	0,22	mg
	Fluoruro	0,19	mg	Fluoruro	0,16	mg
	Molibdeno	3,67	µg	Molibdeno	5,40	µg
	Cromo	2,00	µg	Cromo	4,00	µg
Vitaminas	A	60,00	µg	A	80,00	µg
	D	1,00	µg	D	1,00	µg
	E	1,00	mg	E	0,80	mg
	C	6,00	mg	C	5,00	mg
	B1	0,08	mg	B1	0,12	mg
	B2	0,09	mg	B2	0,16	mg
	B3	1,07	mg	B6	0,16	mg
	B6	0,12	mg	B12	0,20	µg
	B9	26,67	µg	K	5,60	µg
	B12	0,16	µg	Niacina	1,80	mg
	Biotina	1,34	µg	Ácido fólico	20,00	µg
	Ácido pantoténico	0,80	mg	Biotina	6,0	µg
	K	8,00	µg	Ácido pantoténico	0,40	mg
				Colina	10,00	mg
Osmolaridad	333 mOsmol/L			293 mOsmol/L		
Enriquecido en taurina	Si			No		

Cuadro 4-1. Composición cuali y cuantitativa de los preparados enterales estudiados.

4.1.2.1 Digestión *in vitro* de los preparados enterales: Protocolo del ensayo

Para determinar la cantidad total de aminoácido que contiene cada uno de los preparados se ha llevado a cabo la digestión de los preparados de nutrición clínica puesto que la taurina se incorpora a los mismos en forma libre y conjugada. Además, la cantidad incorporada durante la formulación de estos preparados no se especifica en la etiqueta del producto comercial.

El **Protocolo de ensayo** se corresponde con las pautas establecidas por la normativa actual recogida en la guía *Food and Drug Administration* (FDA)⁵⁹. En esencia se procede de la siguiente manera:

Se acondiciona un baño de agua a 37°C y se mantiene bajo agitación controlada para simular el peristaltismo. Una vez estabilizadas las condiciones de ensayo, se procede a digerir las muestras. Se ejecutan 6 replicados de 25 ml de cada uno de los preparados enterales^{59, 60}. Durante la primera hora, se simula el pH ácido y la capacidad proteolítica enzimática de la fase gástrica. Para ello se adiciona 1ml de ácido clorhídrico 1 M y 0,1 ml de una solución de pepsina (10 mg/ml). Concluido el tiempo de digestión gástrica, se detiene la reacción enzimática sumergiendo las muestras en un baño de hielo y se toma una muestra de 3 ml. El volumen restante, 22 ml, se atempera en el baño a 37°C y se mantiene durante 3 horas para evaluar la digestión intestinal.

Para emular la digestión intestinal, al fluido gástrico inicial se añaden 0,4 g de bicarbonato sódico para neutralizar el pH y 2 ml cada 30 minutos de una solución que contiene 37,5 mg de pancreatina y 4 mg de sales biliares.

Transcurridas 3 horas, se procede a retirar las muestras del baño y se neutraliza la actividad enzimática introduciendo las muestras en un baño de hielo durante 5 minutos. A continuación, las muestras se centrifugan y se cuantifica la taurina en el sobrenadante mediante cromatografía líquida de alta resolución (CLAR o HPLC) utilizando detección por fluorescencia.

La toma de muestras se efectúa a los tiempos 0, 1 y 3 horas del ensayo, coincidiendo la primera muestra con el blanco sin digestión, la segunda con la finalización de la fase de digestión gástrica, y la tercera y última con el término de la fase de digestión intestinal.

4.2 Animales de experimentación

Se han utilizado ratas albinas macho adultas de raza Wistar, (*ratu norvegicus*) procedentes de una colonia seleccionada y criada en el estabulario de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valencia, en perfectas condiciones de higiene y climatización. Todos los animales se estabularon de forma individual en cajas de polietileno de 22x22x16 cm (Figura 4-1) en condiciones de temperatura (22-23°C), humedad (50–60%) y ciclos de luz/oscuridad (12 h) controladas.

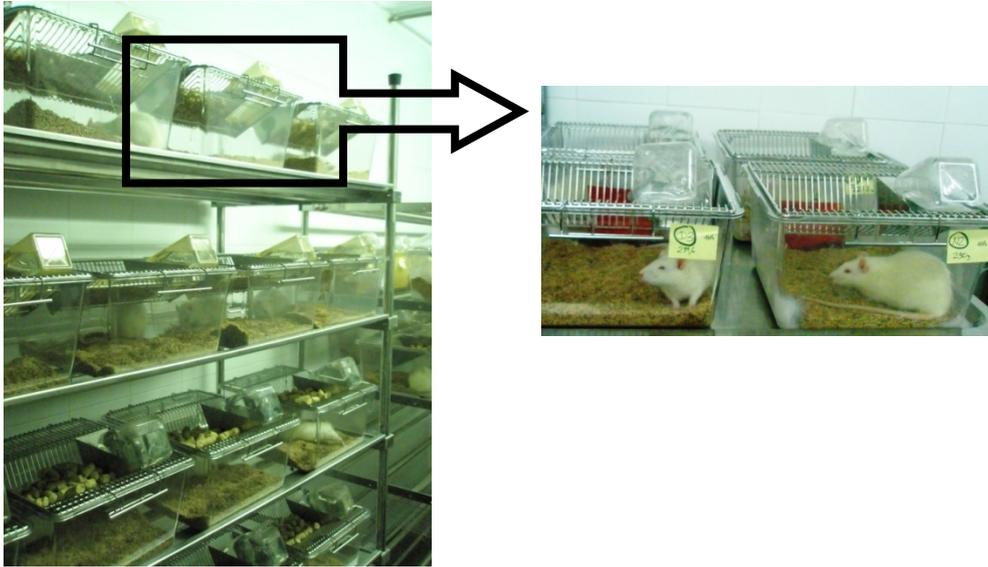


Figura 4-1. Estabulado de los animales.

4.2.1 Método de desnutrición animal

Todos los animales de experimentación empleados se han sometido a las normas de correcto uso y manipulación de animales de laboratorio recogida en la directiva 2010/63/UE del 22 de septiembre de 2010 relativa a la protección de los animales utilizados para fines científicos. Asimismo, el estudio fue aprobado el 31 de Octubre de 2008 por el Comité Ético de Experimentación Animal de la Universidad de Valencia (Anexo 8.1).

Para garantizar la consecución del estado nutricional (normonutridos o desnutridos) en los animales se ha seguido el protocolo desarrollado y publicado por nuestro grupo de investigación⁶¹. En el Cuadro 4-2 se muestran las variables biométricas, bioquímicas y el ámbito

de valores utilizados como criterios de inclusión de los animales utilizados en el estudio.

Tipo de Parámetro	Criterio	Valor
Biométrico	Edad	8-9 semanas
	Peso	220-255 g
Bioquímico	Albúmina plasmática	4,3-2,3 g/dl
	Colesterol total plasmático	30-195 mg/dl

Cuadro 4-2. Criterios bioquímicos y biométricos de inclusión de los animales.

Los animales seleccionados, en la medida de lo posible procedentes de la misma camada, se estabulan individualmente y de forma aleatoria se asignan a dos grupos de ensayo: grupo Normonutrido (NN) y grupo Desnutrido (DN). Todos los animales tuvieron acceso libre al agua de bebida, pero acceso controlado al alimento. El grupo NN se alimenta con una dieta estándar comercializada por Laboratorios Harlan (dieta 2014), de acuerdo con las necesidades nutricionales diarias de la rata (14% de proteína, dosis diaria ingerida: 20 g/60,2 kcal). El grupo DN se alimenta con una dieta de reducido contenido proteico, y se restringen, además, las calorías totales diarias ingeridas (dieta TD 99168 de Laboratorios Harlan; 5% de proteínas, dosis diaria ingerida: 10 g/38 kcal).

Ambos grupos se alimentan con la dieta asignada durante un periodo de adaptación comprendido entre 23-26 días. Durante este periodo, se realiza un control de peso diario, y un control bioquímico semanal (albúmina plasmática y colesterol total) mediante kits comercializados (Laboratorios QCA, España).

4.2.1.1 Pesado de los animales

Para el control ponderal diario de los animales, tanto del grupo NN como del grupo DN, se deposita el animal suavemente en una caja de polietileno previamente tarada sobre una báscula, tal y como se observa en la Figura 4-2. Inmediatamente después del pesado del animal se deposita el alimento diario en la caja.



Figura 4-2. Pesado de los animales

El control diario de peso es imprescindible para asegurar el correcto estado de los animales, puesto que una pérdida de peso masiva debido a problemas bucales, movimientos repetitivos anormales (“Abnormal repetitive behaviour”) o pérdida de tejido ungueal pueden ser indicio de estrés u otras patologías concomitantes no deseadas, que requieren intervención y que justifican la exclusión del animal en el estudio.

4.2.1.2 Determinación de albúmina y colesterol

Toma de muestra

Los días 1, 7, 14, 21 y el día de la intervención quirúrgica se extraen muestras sanguíneas, mediante punción venosa, para realizar el control bioquímico de albúmina y colesterol plasmáticos. Para ello, en una de las extremidades posteriores del animal, se localiza la vena safena (Figura 4-3) y se extrae un volumen de sangre comprendido entre 100 y 200 μl ⁶²

El procedimiento implica la inmovilización del animal con ayuda de un trapo de hilo, dejando al descubierto una de las extremidades posteriores. A continuación, se rasura la cara externa del miembro posterior y se aplica alcohol etílico 96^o, de esta forma se visualiza cómodamente la vena safena, se evita la coagulación y/o contaminación de la muestra, y se desinfecta la zona.

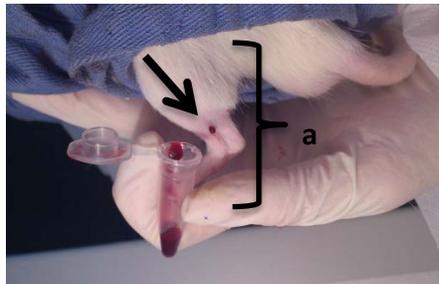


Figura 4-3. Extracción de sangre de la vena safena de la extremidad posterior (a) de los animales. Flecha: gotícula formada tras la punción del vaso.

Una vez evaporado el alcohol, se realiza una ligera presión en la zona para ralentizar el retorno venoso y se aplica una fuente de calor lumínica para vasodilatar la vena. Acto seguido se procede a la punción del

vaso y se recoge la sangre en un tubo Eppendorf® previamente heparinizado (heparina sódica 1%).

Para evitar la hemólisis y posteriores interferencias en el análisis bioquímico, la recogida de las muestras sanguíneas se debe realizar mediante la formación de gotículas de sangre en la zona de punción, evitando extender las muestras en la extremidad del animal.

Finalizada la toma de muestra, se aplica una ligera presión local con una gasa estéril y, tras comprobar que el sangrado se ha detenido, se aplica povidona yodada.

La muestra recogida se centrifuga inmediatamente a 5.000 r.p.m. durante 10 minutos, y se separa el plasma. La muestra plasmática se analiza, y el excedente se conserva a -20°C para repetir el análisis en caso de que fuese necesario.

Cuantificación de la albúmina plasmática y colesterol total

Ambas moléculas se determinan mediante kits comerciales (Laboratorios QCA). A continuación se describe brevemente las bases del método de cuantificación y el protocolo seguido en el análisis de las muestras plasmáticas.

La albúmina se determina mediante el método del verde de bromocresol. A pH ácido, la albúmina se combina específicamente con el verde de bromocresol para formar un complejo coloreado que se cuantifica fotométricamente.

Para ello se emplea un estándar acuoso de albúmina de 5 g/dl, que actúa como solución madre en la obtención de los patrones empleados en las rectas de calibrado (5, 2,5 y 1 g/dl), y un reactivo compuesto por tampón succinato 50 mM, azida sódica al 0,09% y verde de bromocresol 0,75 g/l.

Para analizar las muestras experimentales se deposita 1 ml del reactivo en una cubeta de plástico de espectrofotómetro. Se añade 6 µl de patrón o de plasma problema, se mezcla mediante aspiración con pipeta, y se incuba a temperatura ambiente durante un mínimo de 5 minutos en oscuridad. Transcurrido este tiempo se procede a su lectura en el espectrofotómetro, seleccionando la longitud de onda de 630 nm.

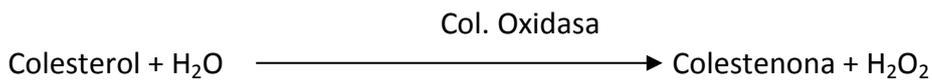
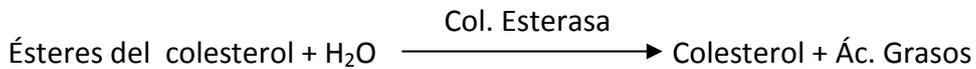


Figura 4-4. Cubetas con el reactivo y los patrones de albúmina una vez ha finalizado el periodo de incubación.

El correcto uso del reactivo requiere respetar la fecha de caducidad, así como realizar pruebas adicionales para asegurar su perfecto estado. Si aparecen partículas o turbidez, o el blanco presenta una absorbancia mayor o igual a 0,40 unidades, el reactivo se debe desechar.

La reacción entre el verde de bromocresol y la albúmina es instantánea, mientras que otras fracciones proteicas producen con el tiempo una coloración adicional. Se recomienda, por tanto, no emplear periodos de incubación superiores a 1 hora. En este estudio se ha estandarizado el tiempo de incubación y medida de las muestras en un periodo comprendido entre 30 y 40 minutos. Asimismo, la hemólisis de la muestra interfiere en el análisis aumentando la intensidad de la señal, por lo que es importante disponer de muestras plasmáticas limpias y no hemolizadas.

El colesterol se ha analizado mediante un test enzimático colorimétrico denominado CHOD-PAP. Emplea esterasas, oxidadasas y peroxidasas (POD) del colesterol (Col.) según el esquema que se muestra a continuación.



En el ensayo se emplea un estándar de colesterol de 200 mg/dl a partir del cual se prepara la curva de calibrado (200, 100, 50 y 25 mg/dl).

En este caso, el reactivo está compuesto por un tampón Pipes 60 mM, Fenol 6 mM, 3,5-diclorofenol 0,2 mM, 4-Aminoantipirina 0,5 mM, y las enzimas colesterol esterasa (≥ 500 k U/l), colesterol oxidasa (≥ 300 k U/l) y peroxidasa (≥ 1200 kU/l).

Para el análisis de las muestras se deposita en una cubeta 1,5 ml del reactivo, junto con 15 μ l de patrón o plasma problema. Se agita por aspiración mediante pipeta, y la mezcla se incuba durante un mínimo de 10 minutos a temperatura ambiente y en oscuridad. Finalizado el periodo de incubación, se mide la intensidad de señal en el espectrofotómetro seleccionando la longitud de onda de 505 nm.

En el análisis del colesterol también es de suma importancia utilizar el reactivo sin sobrepasar el periodo de validez. En caso contrario, se recomienda desecharlo, así como si presenta un aspecto turbio, o si la absorbancia del blanco es superior a 0,10 unidades.

Pese a que en la reacción no interfiere la presencia de bilirrubina cuando su concentración es inferior a 15 mg/dl, ni la de hemoglobina en concentraciones inferiores a 200 mg/dl, se recomienda utilizar muestras no hemolizadas y limitar el tiempo de incubación a 40 minutos.

4.2.1.3 Criterios para la valoración del estado nutricional de los animales

Los animales se han considerado malnutridos si al finalizar el periodo de adaptación, su peso no supera el 80% del peso alcanzado por los animales del grupo NN y la concentración de albúmina sérica es inferior

a 2,3 g/dl. Durante el periodo de adaptación también se ha monitorizado de forma periódica la concentración plasmática de colesterol total, y se han realizado diversas observaciones cualitativas, entre ellas, la existencia de piloerección, la pérdida de masa capilar, la fragilidad ungueal y/o la actividad locomotora alterada, aunque ninguna de estas variables se ha utilizado para valorar el estado nutricional alcanzado por los animales.

Clasificación del estado nutricional

El grado de desnutrición calórico-proteica logrado en los animales del grupo DN se ha clasificado mediante un sistema de puntuación asignado al valor del peso y concentración plasmática de albúmina, tal y como se expone en el Cuadro 4-3^{23, 61}.

		Alteración de los parámetros			
		Nula	Leve	Moderada	Severa
Parámetro bioquímico	Albúmina (g/dl)	4,3-2,3	2,29- 1,9	1,89-1,5	<1,5
	Puntuación	0	2	4	6
Parámetro biométrico	Peso corporal (g)	310-240	239-220	219-190	<190
	Puntuación	0	1	2	3
Puntuación total		0	1-3	4-6	7-9
Grado de desnutrición		Nulo	Leve	Moderado	Severo

Cuadro 4-3. Valoración del grado de desnutrición de los animales utilizando los criterios indicados.

4.3 Análisis histológico del intestino

Para valorar el estado fisiológico y la integridad del tejido intestinal de los animales NN y DN se ha evaluado microscópicamente el tejido intestinal de animales empleados previamente en el estudio farmacocinético (n=6).

Para extraer el intestino se procede de la forma siguiente: una vez finalizado el estudio farmacocinético de administración de taurina por vía intravenosa, se seleccionaron 3 animales NN y 3 animales DN. Se cierra la vía central implantada para la extracción de muestras sanguíneas y durante 24 horas se les permite libre acceso al agua y a la alimentación estándar de acuerdo con el grupo nutricional al que pertenece cada animal. Transcurrido ese tiempo, los animales se someten a un periodo de ayuno de 6 horas para vaciar el contenido intestinal y a continuación se sacrifican administrando pentobarbital sódico (100 mg/kg) por vía intraperitoneal. Tras comprobar la ausencia de signos vitales en el animal, rápidamente se escinde el intestino delgado completo y se deposita en una placa petri que contiene suero fisiológico. Con ayuda de unas pinzas de punta roma y de bisturí, se lava el órgano y se divide en secciones para su correcta conservación. El tejido intestinal se separa en tres secciones de igual longitud, que equivalen a las regiones fisiológicas intestinales proximal, media y distal.

Para preservar el material biológico se realiza la fijación y deshidratación del mismo. Para ello, el tejido intestinal se deposita en los casetes o cajas de conservación, y se sumergen en una solución de

formaldehído al 4% tamponada a pH 7 durante 24 horas a 5°C. Finalizado este primer periodo, se lavan, y se conservan en formaldehído al 0,4% tamponado a pH 7 a la temperatura de 5°C durante un mínimo de 24 horas. Finalizado el periodo de fijación, se deshidrata el tejido con baños sucesivos utilizando soluciones de etanol 96º de concentración creciente, y se orienta en parafina líquida caliente (56°C). El bloque de parafina endurecido que incluye el tejido fijado se corta con el micrótopo en finas láminas que se montan sobre diferentes portaobjetos para su observación microscópica posterior.

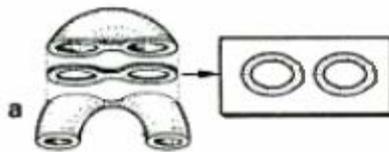


Figura 4-5. Obtención y montaje de los cortes intestinales.

Los cortes así obtenidos se desparafinan con xileno, se hidratan y se someten a un proceso de tinción con los colorantes hematoxilina y eosina. La hematoxilina, por ser catiónica o básica, tiñe estructuras ácidas (basófilas) en tonos azul y púrpura, como por ejemplo los núcleos celulares; y la eosina, de carácter aniónico o ácido, tiñe los componentes básicos (acidófilos) como el citoplasma, en tonos rosáceos.

Finalizada la tinción, la muestra se deshidrata de nuevo, y tras lavarla se depositan unas gotas del líquido de montaje y se cubre con una lámina de vidrio fino o cubreobjetos.

Las muestras se observan a través de un microscopio óptico Leica® DM4500 B con cámara acoplada (Leica DCF300 FX) y se procesan mediante el software Image J®.

4.4 Técnica quirúrgica

4.4.1 Anestesia y analgesia

La anestesia y analgesia de los animales se induce con un anestésico general y un antiinflamatorio. A partir de una solución de pentobarbital sódico 20% (p/v) (Dolethal®), se prepara diariamente una disolución diluida 1:10 con suero fisiológico (Cloruro sódico simple, Braun S.A.) que se utiliza como solución anestésica. Esta dilución se administra por vía intraperitoneal a razón de 30 mg por kilogramo de peso del animal. Para ello, el animal se inmoviliza con ayuda de un trapo y se ubica en posición ventral, sujetando la cabeza entre los dedos índice y corazón. Con el abdomen al descubierto se procede a inyectar el anestésico por vía intraperitoneal, 2 cm por encima del poro genital. Tras la inyección se realiza un masaje abdominal, con objeto de acelerar el paso del anestésico a la circulación sanguínea, y el animal se deposita en una jaula con doble fondo y con una fuente de calor. Una vez se ha inducido la anestesia, el analgésico y antiinflamatorio butorfanol tartrato (Torbugesic®) se administra subcutáneamente en la zona ventral superior a razón de 0,5 mg por kilo de peso corporal.

Una vez alcanzada la anestesia profunda se procede a la canulación de la vena yugular, comprobando, previamente, la ausencia de respuesta motora a estímulos mediante la pérdida del reflejo palpebral.

4.4.2 Técnica de canulación permanente de la vena Yugular

La técnica quirúrgica utilizada consiste en la implantación permanente de un catéter de silicona en la vena yugular derecha⁶³. Esta técnica permite que la administración intravenosa y la toma de muestras plasmáticas se realicen sin necesidad de anestesiarse al animal o limitar su movilidad, evitando así un estrés adicional para el animal de experimentación.

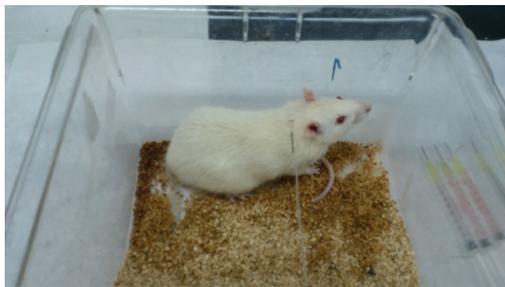


Figura 4-6. Animal con la vena yugular canulada.

4.4.2.1 Soluciones y material de trabajo

A continuación se describe una relación de los materiales necesarios para realizar la intervención quirúrgica:

- Catéter o cánula, de aproximadamente 15 cm de longitud. Se prepara a partir de un tubo de silicona (*cat. No. Silastic® R 602-155*) de 0,6

mm de diámetro interno. A 3,4 cm de uno de los extremos del tubo se fija un hilo de seda 4/0, con ayuda de un sellador de silicona Orbasil®. Este montaje cumple dos funciones:

- Limitar la longitud de la cánula que se introduce en la vena yugular.
- Permitir la fijación de la cánula, una vez implantada, al músculo digástrico de la rata.

El extremo de 3,4 cm que se introduce en la vena yugular, se debe cortar transversalmente en bisel o “pico de flauta” para facilitar su implantación. Éste catéter se esteriliza en el autoclave durante 20 minutos a 120°C.

- Instrumental quirúrgico. Se compone de tablilla de PVC, pinzas en diente de ratón, pinzas “pean”, pinzas de punta fina curva, tijeras de punta roma, tijeras de punta fina, aguja de administración intratecal, aguja curva de sutura de sección circular, suturas de seda trenzada 4/0, y aguja curva de sutura de sección triangular acoplada a hilo de sutura de seda 4/0.

- Jeringuillas de insulina de 1ml con aguja de punta roma. Se utilizan en la toma de muestras. Se preparan expresamente, en el laboratorio, con punta roma con el propósito de no dañar la cánula, y se heparinizan para evitar la coagulación de las muestras.

- Flexo o manta calefactora. Es imprescindible contar con una fuente de calor durante la inducción de la anestesia, la intervención quirúrgica, y la posterior recuperación de la consciencia del animal para

evitar la hipotermia causada por la disminución de la frecuencia cardíaca que se desarrolla bajo la anestesia del animal.

En cuanto a las soluciones de trabajo: para el restablecimiento de la volemia se emplea una solución de suero fisiológico isotónico estéril (Cloruro sódico simple®, Braun S.A.), heparinizado en el laboratorio bajo condiciones asépticas, utilizando la cantidad necesaria de heparina sódica al 5% (Hospira®) que permite obtener una solución de suero fisiológico con 20 U.I./ml de heparina. Para ello, de un envase de 500 ml de suero fisiológico se extrae un volumen de 2 ml y a los 498 ml restantes se les añade 2 ml de heparina al 5%. La solución heparinizada se conserva en nevera a 4°C hasta el momento de su utilización. Los tubos Eppendorf® donde se recolecta las muestras sanguíneas y las jeringas empleadas en la extracción de sangre se heparinizan con una solución acuosa de heparina al 1%, es decir, una parte de heparina al 5% y cuatro de agua destilada.

4.4.2.2 Técnica de implantación

Una vez el animal alcanza la anestesia profunda se coloca sobre una tabla de PVC, en posición decúbito supino, fijando sus extremidades mediante cinta adhesiva. La inmovilización se debe realizar sin forzar las extremidades superiores, evitando así presionar el tórax e impedir la correcta respiración del animal.

Tras la localización visual de la vena yugular en la zona medio-clavicular, se rasura la zona y se impregna con povidona yodada (Betadine®) y se efectúa sobre la piel, con ayuda de unas pinzas de diente

de ratón y de unas tijeras de punta roma, una incisión transversal menor de medio centímetro. A continuación se procede a realizar la exteriorización del catéter (Figura 4-7, A). Desde la incisión practicada, la cánula se conduce, a través del tejido subcutáneo, hacia la zona cervical con ayuda de una aguja intratecal, donde se exterioriza a través de la piel (Figura 4-7, C). El catéter se rellena con suero fisiológico heparinizado mediante la conexión de una jeringuilla de 1 ml, con punta roma, al extremo exteriorizado del mismo. De esta forma se impide la entrada de aire al torrente circulatorio cuando se introduzca el catéter en la vena yugular.

A continuación, se desbridan las capas superiores de tejido subcutáneo en la incisión realizada, mediante unas tijeras de punta fina y pinzas de punta curva, hasta descubrir la vena yugular, con la precaución de no dañar los vasos o las estructuras adyacentes. Seguidamente, se localiza el área de la vena yugular más próxima a la ramificación de la vena subclavia, y se disecciona la vena yugular del tejido conectivo mediante unas pinzas de punta fina (Figura 4-7, B).

Ulteriormente, se procede al aislamiento de la vena yugular utilizando un hilo de seda que se desliza de forma doble por debajo de la misma. Tras este paso, se corta el extremo doble, consiguiendo de este modo, situar dos filamentos por debajo del vaso. Se sujetan los dos cabos de cada hilo en los extremos del vaso con unas pinzas “pean” para facilitar la implantación del catéter, así como para disminuir la hemorragia en el momento de la incisión en la vena y facilitar la manipulación de la misma. A

continuación se realiza una pequeña incisión en bisel en la pared de la vena yugular sin seccionar el vaso, por la que se introduce el extremo del catéter cargado de suero fisiológico heparinizado. La operación se debe realizar en el menor tiempo posible y con extrema precaución para evitar que se produzca una elevada pérdida de sangre.

Seguidamente se evidencia la correcta inserción de la cánula en el vaso aspirando con la jeringa de insulina acoplada al catéter, y comprobando que al aspirar se obtiene sangre sin la aparición de vacío o aire. Esta operación se debe repetir a lo largo del proceso quirúrgico con objeto de comprobar que el catéter no esté obturado. Finalizado el proceso, los hilos de seda que aislaban el vaso se retiran. La cánula se fija al músculo pectoral o digástrico mediante un punto de sutura con ayuda de la aguja curva de sección circular. El hilo utilizado es el que previamente se ha fijado a la cánula con un tope de silicona. Por último, con la aguja curva de sección triangular acoplada a un nuevo hilo de seda, se cose la capa de tejido subcutáneo y la piel mediante los puntos de sutura necesarios. Al finalizar, se realiza un doble nudo próximo a la sutura y se escinde el hilo sobrante para evitar que el animal una vez consciente pueda manipularlo.

Finalizada la intervención, se corta una porción del catéter exteriorizado dejando que sobresalga del lomo del animal un extremo de entre 3-4 cm; longitud adecuada para impedir que el animal alcance la cánula y la dañe, y para permitir la toma de muestras sanguíneas posterior. El extremo que sobresale al exterior se tapona mediante un obturador,

preparado con tubo rígido de polietileno, cuyo diámetro coincide con el del catéter.

El animal se deposita en una jaula sobre una manta calefactora hasta despertar. A continuación, se suministra a los animales la dieta sólida correspondiente al grupo de estudio (NN o DN) y se les permite el acceso libre al agua de bebida.

Al día siguiente se comprueba la total recuperación del animal y se realiza el ensayo farmacocinético. Previo la administración, al extremo de la cánula que sobresale del animal se acopla un puente de metal de 1 cm de longitud aproximadamente. En el extremo libre del puente, se coloca una cánula de unos 10 cm de longitud acoplada a una jeringa, ambas colmadas de suero fisiológico heparinizado (Figura 4-7, D). A través de esta conexión, se toman las muestras sanguíneas y se administra la taurina por vía intravenosa.

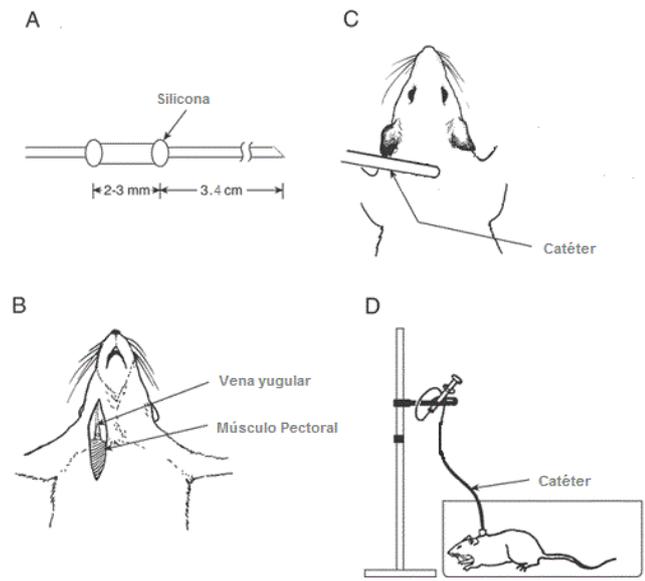


Figura 4-7. Canulación de las ratas. A Catéter empleado en la canulación. B: Vista ventral del animal, se muestra la localización de la vena yugular y el músculo pectoral donde se ancla. C: Vista dorsal del animal al finalizar la intervención, detalle de la exteriorización de la cánula. D: Animal estabulado tras la intervención quirúrgica.

Los animales se mantienen en ayunas y se asignan de forma aleatoria a un grupo de ensayo (solución de aminoácido o dieta enteral, vía de administración y dosis de aminoácido). El periodo de ayuno se mantiene durante el ensayo pero durante éste se permite el acceso libre al agua de bebida.

La privación de alimento durante la administración de los preparados/soluciones a ensayar y durante la toma de muestras se realiza para evitar interferencias, puesto que la dieta aporta taurina y sus precursores.

4.5 Protocolo del ensayo

El estudio se ha realizado de acuerdo a un diseño paralelo, puesto que cada animal recibe un único preparado, y aleatorio. Los animales se distribuyen en 24 grupos, en función de la formulación ensayada (solución libre o preparado enteral comercial), la vía de administración (intravenosa u oral), la pauta posológica (dosis única o múltiple), y grupo nutricional (NN o DN) al que pertenecen.

4.5.1 Administración de la solución de taurina y de los preparados enterales

Las diferentes soluciones de taurina ensayadas se administran por inyección intravenosa rápida.

Como paso previo a la administración, se toma una muestra sanguínea que servirá de blanco. Se inyecta 1 ml de la solución a administrar, por acoplamiento de una jeringa que contiene dicha solución. Posteriormente, se inyecta el volumen suficiente de suero fisiológico para asegurar que la dosis administrada accede íntegramente al torrente sanguíneo, y de forma simultánea se pone en marcha el cronómetro.

Por último, se procede al cambio del puente y el tramo de 10 cm de cánula para evitar contaminaciones en la toma de muestras, y se acopla una jeringuilla de insulina cargada de suero fisiológico heparinizado para cerrar el circuito. Se debe tener especial precaución durante todo el proceso tanto en la administración de las soluciones como en la toma de

muestras para evitar, durante la manipulación de la cánula, el paso de aire a la circulación sanguínea del animal.

Así como en la administración intravenosa, en la administración oral se toma una muestra sanguínea previa al ensayo, que servirá de blanco en el análisis de las muestras. A continuación, el animal se inmoviliza en posición vertical con ayuda de un trapo, alineando el tracto gastroesofágico. Por la cavidad oral se introduce una sonda gastroesofágica para perfusión oral acoplada a una jeringa de 2,5 ml, y se administra 1 ml de la solución de aminoácido, 2,5 ml del preparado enteral o agua. En estas condiciones, el animal mantiene el reflejo de deglución, ya que no se requiere la administración de anestesia. Finalmente, se pone en marcha el cronómetro.

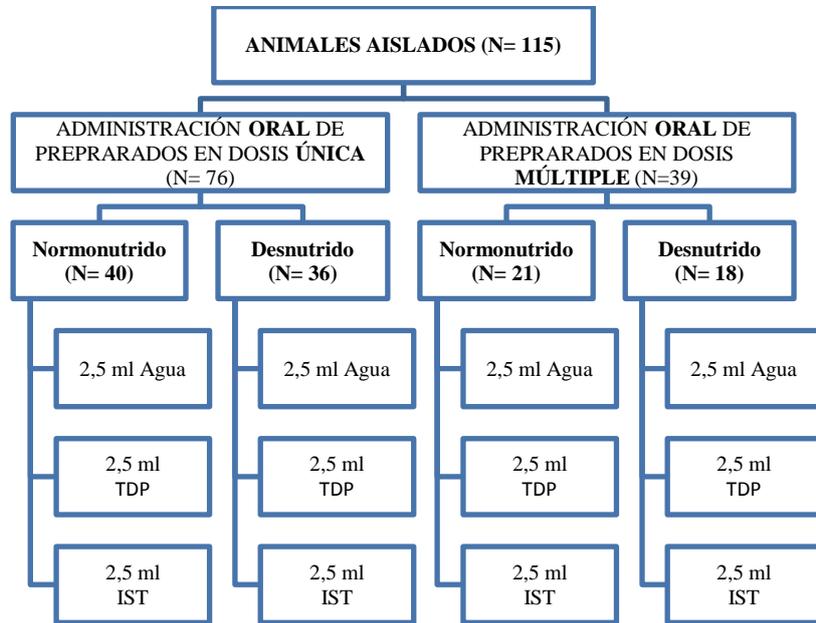
Para la realización del estudio farmacocinético compartimental de la taurina se administró una **solución libre de taurina** por vía intravenosa y oral. Transcurridas entre 16 y 24 horas desde la intervención quirúrgica, los animales se distribuyen de forma aleatoria en 8 grupos, en función de la dosis, la vía de administración y el estado nutricional. Se administra en forma de bolus intravenoso o por vía oral 1 ml de solución de taurina a la concentración de 1, 10 o 100 mg/ml. Se toman muestras durante un total de 2 horas, excepto en el caso de la administración oral de 100 mg de taurina, en que el periodo de toma de muestras se prolonga durante 3 horas.

Antes de iniciar el estudio farmacocinético no compartimental tras la administración oral de los **preparados enterales** y agua, las ratas se

distribuyen aleatoriamente en tres grupos diferentes, tal y como se describe en el Cuadro 4-4, en el que se distingue:

- Grupo control. Se les administran 2,5 ml de agua, lo que permite controlar la evolución de las concentraciones basales de taurina durante las 4 horas del ensayo. Los valores obtenidos se han considerado como valor de referencia del nutriente a lo largo del experimento.
- Grupo TDP. Se les ha administrado 2,5 ml del preparado enriquecido T-Diet Plus[®] y se ha cuantificado la concentración plasmática de la taurina durante 4 horas.
- Grupo IST. Se les ha administrado 2,5 ml del preparado no enriquecido Isosource-ST[®] y se ha determinado la concentración plasmática del aminoácido taurina durante 4 horas.

La administración oral de los preparados enterales y agua se ha realizado tanto en régimen de dosis única como en régimen de dosis múltiple. En este último caso se administra una dosis cada dos horas hasta un total de cuatro dosis.



Cuadro 4-4. Diagrama de distribución de los animales y administración de preparados comerciales enterales administrados a cada grupo ensayado.

4.5.2 Estabulado y toma de muestras

Durante la toma de muestras sanguíneas, los animales se depositan en cajas de polietileno, idénticas a las empleadas para estabularlos durante el periodo de adaptación (Epígrafe 4.2).

La recolección de las muestras se realiza mediante jeringuillas de insulina heparinizadas de 1 ml de capacidad acopladas a aguja de punta roma. En los 15 segundos previos al tiempo de toma de muestra, se conecta una jeringuilla y se succiona la sangre, desplazando el suero de la cánula. Esta primera fracción de muestra se rechaza, ya que se encuentra diluida por el suero fisiológico de la cánula. Se renueva la jeringuilla por

otra vacía previamente heparinizada, y se toman 0,10 ml de muestra sanguínea. Por último, se reemplaza de nuevo la jeringuilla por otra que contiene 1 ml de suero fisiológico heparinizado, del que se inyectan 0,10 ml más un exceso correspondiente al volumen muerto de la cánula, que permiten restablecer la volemia de la rata además de limpiar la cánula. Esta operación se repite en todas las tomas de muestra realizadas.

Tras la administración de taurina en solución por vía oral e intravenosa se han tomado muestras de sangre distribuidas en los siguientes intervalos de tiempo:

- En la administración intravenosa: 0 (muestra previa a la administración); 0,08; 0,17; 0,33; 0,50; 1,00 y 2,00 horas.
- En la administración oral: 0 (muestra previa a la administración); 0,17; 0,25; 0,33; 0,50; 1,00, 2,00 horas (3,00 horas en la dosis de 100 mg).

Tras la administración oral de agua y de los preparados enterales la toma de muestras de sangre se realizó durante un periodo de cuatro horas, distribuidas en intervalos de tiempo diferentes según el régimen de dosificación utilizado.

En régimen de dosis única los tiempos de muestreo seleccionados han sido: 0 (muestra previa a la administración); 0,25; 0,50; 1,00; 1,50; 2,00; 3,00 y 4,00 horas.

En régimen de dosis múltiple los tiempos de muestreo seleccionados han sido: 0 (muestra previa a la administración); 0,25; 0,50; 1,00; 2,00; 2,50; 4,00; 4,50; 6,00; 6,50; 7,00 y 8,00 horas.

Así se han obtenido muestras sanguíneas suficientes para determinar los parámetros farmacocinéticos del aminoácido evitando provocar un shock hipovolémico o un descenso acusado del hematocrito en el animal y, por lo tanto, un deterioro de su estado físico y de los parámetros farmacocinéticos.

4.5.3 Preparación de las muestras sanguíneas

La **desproteización** de las muestras sanguíneas es imprescindible antes de proceder a su determinación cuantitativa por cromatografía líquida, ya que permite alargar la vida del sistema cromatográfico y disminuir las interferencias analíticas.

El procedimiento consiste en depositar la muestra de sangre en un tubo Eppendorf® heparinizado y centrifugar inmediatamente a 5000 r.p.m. durante 5 min (Centrífuga Sigma Laborzentrifugen 2K15). Se extraen 100 µl del plasma y se trasvasan a un tubo Eppendorf® que contiene 2,5 mg de ácido sulfosalicílico (SSA). Se vortea enérgicamente durante 30 segundos, y se centrifuga a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se separa en un nuevo tubo Eppendorf® identificado adecuadamente, y congela a -80°C durante un mínimo de 24 horas. Transcurrido ese tiempo, se descongela a temperatura ambiente, se centrifuga de nuevo a 10.000 r.p.m. durante 10 minutos y se recoge el sobrenadante libre de proteínas⁶⁴.

Se toman 5 µl de las muestras desproteinizadas para su análisis mediante CLAR, y el excedente se conserva a -20°C manteniendo su estabilidad durante un periodo de 6 meses.

Puesto que la taurina no emite fluorescencia, para el análisis fluorimétrico ha sido necesario transformar esta molécula mediante reacción química en otra, cuya estructura sea apropiada para que posea fluorescencia. Por ello, se han derivatizado las muestras con orto-ftalaldehído y ácido mercaptopropiónico (OPA-MCA), utilizando los reactivos y el protocolo que se describen a continuación⁶⁴.

Se preparan dos tipos de soluciones. En primer lugar, el reactivo responsable de la reacción de derivatización y, en segundo lugar, el neutralizador. Debido a la fotosensibilidad del OPA, es necesario proteger de la luz las soluciones de trabajo, utilizando frascos de vidrio topacio y, cuando no es posible (matraces aforados, tubos Eppendorf®, etc.), recubriendo los recipientes con papel de aluminio.

Para obtener el reactivo de derivatización se prepara una solución de tampón borato 100 mM a pH 10. Para ello se pesan 1,24 g de ácido bórico, y se depositan en un matraz aforado de 100 ml de capacidad. A continuación, se añaden 10 ml de una disolución de NaOH 1 M, y se afora el matraz con agua destilada. Se comprueba el pH, y en caso necesario se corrige utilizando una solución de NaOH 1 M.

Simultáneamente, se disuelven 25 mg de OPA en 0,5 ml de metanol en un tubo Eppendorf®. Cuando se alcanza la completa disolución

mediante agitación con vórtex en campana de extracción de gases, se añaden 4,5 ml de la solución tampón borato y 25 µl de ácido 3-mercaptopropiónico. Se agita suavemente y se reserva protegido de la luz. Esta mezcla es estable durante un máximo de 72 horas.

El reactivo final de derivatización se compone de 21 partes, una de ellas corresponde a la mezcla descrita anteriormente, y las 20 restantes a la solución tampón borato 100 mM de pH 10.

El neutralizador está constituido por una mezcla de una parte de solución tampón dihidrogeno fosfato potásico 400 mM y 10 partes de trietilamina. Para la preparación del tampón se pesan 6,96 g de dihidrogeno fosfato potásico y se depositan en un matraz aforado de 100 ml. En campana de gases, se añade un pequeño volumen de agua destilada, junto con 1 ml de trietilamina. Para finalizar, se enrasa con agua destilada y se lleva a ultrasonidos hasta total disolución.

Con el reactivo de derivatización y el neutralizador se desarrolla la reacción descrita en la bibliografía⁶⁴.

4.6 Valoración analítica de la taurina en las muestras plasmáticas

Como se ha comentado con anterioridad, la cuantificación de taurina se ha realizado mediante CLAR con detección fluorimétrica. La validación del método analítico se ha realizado diariamente a través de una

curva de calibración y de patrones de concentración conocida, preparados a partir de una solución madre de aminoácido⁶⁵.

4.6.1 Elementos cromatográficos

Se ha utilizado un cromatógrafo Perkin Elmer de reparto y de fase inversa, compuesto por los siguientes elementos:

- Bomba HP 515 Waters.
- Inyector Spectra System AS1000
- Detector fluorimétrico modelo HP 200 ($\lambda_{\text{ex}}= 230 \text{ nm}$ y $\lambda_{\text{em}}= 389 \text{ nm}$).
- Registrador-integrador, modelo HP 3395.

La fase estacionaria consta de una columna de acero inoxidable (Análisis Vínicos) de 100 mm de longitud por 4,6 mm de diámetro interno, rellena de gel de sílice silanizado con radicales alifáticos de 18 átomos de carbono, con un tamaño de partícula de 3 μm .

Una precolumna (Tecnokroma), con dos filtros de 2 μm de poro y un relleno pelicular análogo al de la columna pero con un tamaño de partícula de 40 μm . Su función es retener las partículas de mayor tamaño susceptibles de obturar la columna y el sistema cromatográfico.

La fase móvil ternaria utilizada se compone de una fase acuosa y de una fase orgánica. La fracción acuosa es una solución de fosfato potásico 9 mM y 0,5 ml de trietilamina por cada litro de tampón ajustada a un pH final

de 6,9. En caso necesario, el pH se ajusta al valor seleccionado utilizando una disolución de hidróxido potásico 1 M.

La fase orgánica está compuesta por una mezcla 90:10 de metanol/acetoneitrilo (ambos de calidad HPLC). La proporción final de las fases acuosa y orgánica es de 75:25 (v/v).

Previo a su uso, la fase móvil se filtra a través de un filtro "Millipore GVWP" de 0,45 μm de diámetro de poro, con ayuda de un dispositivo de filtración por vacío. Esta operación permite desgasificar la fase móvil y eliminar la presencia de partículas sólidas susceptibles de dañar la columna. Para la elución de las muestras se ha utilizado un flujo constante de 0,9 ml/min. El volumen de inyección en el cromatógrafo ha sido de 50 μl .

En estas condiciones, el pico de taurina tras la derivatización con orto-ftaldehído ácido mercaptopropiónico (OPA-MCA) presenta un tiempo de retención de 8,5 minutos.

4.7 Validación del método analítico

Con el fin de obtener la concentración del compuesto en cada muestra experimental se han realizado curvas de calibración en las que se interpolan las áreas experimentales de los picos cromatográficos. Para asegurar la calidad de los datos experimentales, es necesario comprobar previamente la linealidad, la precisión y exactitud del método analítico, así como el límite de cuantificación⁶⁶.

4.7.1 Ensayos de linealidad

Para comprobar la linealidad del método analítico en las condiciones del ensayo, se han construido curvas de calibrado, una para cada vía de administración y día de ensayo. Estas abarcan el ámbito de concentraciones que permiten cuantificar las muestras problema por interpolación. Los patrones empleados han sido acuosos para evitar la interferencia de la taurina plasmática circulante, y se han tratado del mismo modo que las muestras experimentales.

Se procede a realizar una regresión lineal por mínimos cuadrados entre las áreas de los picos de los cromatogramas y las concentraciones del aminoácido, según la ecuación:

$$A = m \cdot C + b \qquad \text{Ecuación 4.1}$$

en la que *A* representa el área del pico del cromatograma y *C* la concentración teórica de los patrones ensayados. Para comprobar la dependencia lineal entre las áreas y las concentraciones de taurina se ha utilizado el coeficiente de correlación *r*.

Se han construido dos curvas de calibración. Una con un ámbito de concentraciones comprendido entre 0,60 y 35 µg/ml, que ha servido para determinar la concentración plasmática de taurina tras la administración de los preparados enterales. Otra se construyó utilizando un ámbito de concentraciones de taurina comprendido entre 10 y 500 µg/ml, y permitió calcular las concentraciones plasmáticas del aminoácido tras la administración oral o intravenosa de las soluciones estudiadas.

4.7.2 Ensayo de precisión y exactitud

La determinación de la precisión y exactitud del método analítico utilizado se ha realizado mediante el uso de patrones de concentración conocida, que se han cuantificado por interpolación en las curvas de calibrado. Cada patrón se ha valorado por triplicado. Los patrones se han procesado como si de muestras problemas se tratase, se han preparado en los días de obtención de las muestras experimentales y se han conservado del mismo modo hasta su posterior valoración, donde eran distribuidos al azar entre las muestras. La concentración de los patrones preparados se elegía de forma aleatoria atendiendo siempre al ámbito de concentraciones de las rectas de calibrado.

La exactitud se expresa como el error absoluto y relativo, calculado para cada concentración de patrón, según las siguientes expresiones:

$$E_{absoluto} = |C_{teórico} - C_{experimental}| \quad \text{Ecuación 4.2}$$

$$E_{relativo} = \left| \frac{C_{teórico} - C_{experimental}}{C_{teórico}} \right| \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4.3}$$

La precisión se estima a partir de la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación de la media de los replicados de cada patrón (CV%).

4.7.3 Límite de detección

El límite de detección (LOD) se calcula a partir de las curvas de calibración utilizadas, donde las áreas se representan en el eje de

ordenadas y las concentraciones en el eje de abscisas a partir de la siguiente ecuación.

$$LOD = \frac{3,3 \cdot \sigma}{S} \qquad \text{Ecuación 4.4}$$

en la que σ es la desviación estándar de la ordenada, y s la pendiente de la curva de calibración estimada a partir de soluciones del analito.

4.7.4 Límite de cuantificación

El límite de cuantificación (LOQ) se determina a partir de las curvas de calibración utilizadas en la valoración analítica de taurina en las muestras, mediante la ecuación 4.5

$$LOD = \frac{10 \cdot \sigma}{S} \qquad \text{Ecuación 4.5}$$

en la que σ representa la desviación estándar de la ordenada en el origen y s la pendiente de la recta de calibración.

4.8 *Análisis farmacocinético*

El análisis exploratorio inicial de los datos disponibles se ha realizado con el programa informático IBM SPSS Statistics versión 20. Se comprobó la distribución normal de los pares de valores concentración plasmática vs tiempo de cada grupo mediante el estadístico de Kolmogorov-Smirnov.

Tras este análisis previo se ha realizado la modelización farmacocinética de la taurina mediante el método no lineal de efectos mixtos con doble precisión y estimación de primer orden (FO) implementado en el programa informático NONMEM 7.0. Los pares de valores de concentración plasmática de taurina obtenidos en los tiempos de muestreo se utilizaron para caracterizar el modelo farmacoestadístico que describe el comportamiento farmacocinético de la taurina.

Este modelo asume que los parámetros farmacocinéticos individuales proceden aleatoriamente de una función de distribución de probabilidad, cuyos primeros dos momentos estadísticos son directamente estimados del conjunto de concentraciones plasmáticas existentes en la muestra de estudio. Adicionalmente, cuando el número de concentraciones plasmáticas por individuo es superior a 1, la regresión por mínimos cuadrados extendidos, implementada en NONMEM, puede estimar la variabilidad interindividual (VII) y la variabilidad residual (VR) en las concentraciones plasmáticas del fármaco.

El desarrollo del modelo se realizó en dos fases. En la primera fase se selecciona el modelo farmacocinético estructural básico o modelo de referencia con los datos de concentración plasmática-tiempo obtenidos tras la administración del aminoácido por vía intravenosa. A continuación, se evalúa la linealidad farmacocinética en el proceso de disposición mediante una aproximación empírica y la influencia de diferentes covariables sobre los parámetros farmacocinéticos del modelo estructural básico. Con la información obtenida en el apartado anterior se evalúan los

modelos mecanicistas que permiten explicar la variación de los parámetros farmacocinéticos atendiendo a los mecanismos implicados en los procesos fisiológicos que intervienen en cada uno de los procesos farmacocinéticos.

Una vez caracterizada la fase de disposición del aminoácido se incorporan los datos de concentración plasmática-tiempo obtenidos tras la administración del aminoácido por vía oral y de esta forma se obtiene el modelo farmacocinético final. Al igual que en la primera fase, en esta última etapa se diseñan en primer lugar modelos empíricos y posteriormente modelos que incorporan la evaluación del mecanismo implicado en el proceso.

De este modo, la incorporación de los datos al modelado se ha realizado de forma secuencial tal y como se describe a continuación:

- **Primera Fase:** Datos intravenosos
 - o Análisis empírico:
 - Datos intravenosos de los grupos 1, 2 y 3 (NN) y/o datos grupos 7, 8 y 9 (DN).
 - o Análisis mecanicista:
 - Datos intravenosos de los grupos 1, 2 y 3 (NN) y/o datos grupos 7, 8 y 9 (DN).
- **Segunda Fase:** Datos intravenosos y orales
 - o Análisis empírico:
 - Datos intravenosos y orales de los grupos 1, 2, 3, 7, 8 y 9 (NN); y/o 4, 5, 6, 10, 11 y 12 (DN).
 - o Análisis mecanicista:

- Datos intravenosos y orales de los grupos 1, 2, 3, 7, 8 y 9 (NN); y/o 4, 5, 6, 10, 11 y 12 (DN).

4.8.1 Modelización de datos intravenosos

A continuación se describen las fases que han consolidado la selección del modelo farmacocinético.

4.8.1.1 Análisis empírico

El modelado comienza siempre por el análisis del modelo más sencillo, es decir, por el modelo monocompartimental tras administración de la taurina por vía intravenosa estimando los parámetros aclaramiento (Cl) y volumen de distribución (Vd), usando la minimización de primer orden (FO). A continuación se analizó el modelo bicompartimental con administración en bolus intravenoso, estimando los parámetros aclaramiento, volumen de distribución central (Vc) y las constantes de distribución y retorno k_{12} y k_{21} . Puesto que la taurina se sintetiza de forma endógena, en todos los análisis se incorporó el parámetro Q_0 , que describe la velocidad de incorporación de taurina endógena al torrente sanguíneo (mg/h). Por ello, se empleó la subrutina ADVAN 6 (TOL 5) en todos los modelos.

Inicialmente, la modelización monocompartimental y bicompartimental se realizó de forma independiente para cada estado nutricional. A continuación se formalizó el ajuste con el conjunto de datos

obtenidos tras la administración intravenosa de taurina a los animales NN y DN.

Por último se efectuó el análisis de covariables. Se evaluó la influencia del estado nutricional, concentración de albúmina plasmática y peso en el volumen de distribución y aclaramiento plasmático. Asimismo, se evaluó de forma empírica la existencia de no linealidad en el proceso de disposición del aminoácido.

4.8.1.2 Análisis mecanicista

Se ajustan las ecuaciones diferenciales de distintos modelos bicompartimentales que incluyen procesos lineales y no lineales a los datos experimentales. Estos modelos se construyen en base a la información obtenida en el análisis empírico anterior.

En primer lugar se diseñan diversos modelos mecanicistas, y se aplican a los datos experimentales obtenidos tras la administración intravenosa de taurina de forma independiente en animales NN y DN. A continuación se realizan estos ajustes utilizando los datos experimentales obtenidos en de todos los animales ensayados (NN y DN) y se selecciona el modelo que satisface al conjunto de datos. Asimismo, al igual que en la etapa anterior, se evalúan las covariables relacionadas con el estado nutricional sobre los parámetros farmacocinéticos.

4.8.2 Modelización global de los datos orales e intravenosos

Una vez descrito el proceso de disposición, se evalúa el proceso de incorporación del aminoácido al organismo considerando en el análisis los datos experimentales de concentración plasmática-tiempo obtenidos tras la administración oral de la taurina.

4.8.2.1 Modelización empírica del proceso de absorción

En esta fase del análisis farmacocinético se ha seguido un procedimiento similar a la anterior. De esta forma se ha realizado un análisis empírico de los datos, primero segregando la población de estudio de acuerdo con el estado nutricional (animales NN o DN) y posteriormente de forma conjunta. En esta fase del estudio, los parámetros de disposición se fijan a los valores obtenidos en la fase anterior y únicamente se estiman los parámetros correspondientes al proceso de absorción oral. Como en etapas anteriores, se explora la influencia de diferentes covariables predictoras en los parámetros farmacocinéticos.

4.8.2.2 Análisis mecanicista del proceso de absorción

Se diseñan los modelos mecanicistas del proceso de absorción, primero de forma independiente según el estado nutricional de los animales (NN o DN), para proceder en la última etapa al análisis conjunto.

De acuerdo con este procedimiento, los parámetros de disposición se fijan con los obtenidos el análisis mecanicista de datos intravenosos, y así se evalúa la linealidad en el proceso de absorción oral del aminoácido

primero en cada estado nutricional y por último con los datos experimentales obtenidos con la población total.

4.8.3 Modelización de la variabilidad interindividual

El modelo de varianza interindividual (VII) de los parámetros medios poblacionales puede calcularse de acuerdo con las siguientes expresiones:

Modelo aditivo:

$$\theta_i = \bar{\theta} + \eta_i \quad \eta_i \sim N(0, \omega^2) \quad \text{Ecuación 4.6}$$

Modelo proporcional:

$$\theta_i = \bar{\theta} \cdot (1 + \eta_i) \quad \eta_i \sim N(0, \omega^2) \quad \text{Ecuación 4.7}$$

Modelo exponencial:

$$\theta_i = \bar{\theta} \cdot e^{\eta_i} \quad \eta_i \sim N(0, \omega^2) \quad \text{Ecuación 4.8}$$

siendo θ_i el valor del parámetro farmacocinético (θ) del individuo i , $\bar{\theta}$ el valor poblacional de ese parámetro farmacocinético, y η_i la variabilidad interindividual de una población (N) que presenta una distribución aleatoria alrededor de 0 y de varianza ω^2 . Asimismo, pueden emplearse combinaciones de las ecuaciones mostradas anteriormente, como por ejemplo, modelos de varianza interindividual aditivo-exponenciales.

La selección del modelo de variabilidad interindividual depende del tipo de datos experimentales. El modelo aditivo (Ecuación 4.6) asume que la desviación es constante independientemente de cuál sea la magnitud del

parámetro, motivo por el que también se conoce como como modelo de coeficiente de variación constante. En farmacocinética, la variabilidad interindividual en los parámetros suele modelarse de forma exponencial (Ecuación 4.8) puesto que los valores individuales de dichos parámetros deben ser acotados para que no puedan presentar valores negativos. Por esa razón, en esta memoria se ha empleado el modelo exponencial para modelar la variabilidad interindividual.

La magnitud de la variabilidad interindividual puede expresarse en términos de coeficiente de variación porcentual (CV%), cuyo cálculo depende del modelo de variabilidad interindividual seleccionado. En la Ecuación 4.9 se muestra la expresión que se emplea en el modelo exponencial.

$$CV(\%) = \sqrt{\omega^2} \cdot 100 \qquad \text{Ecuación 4.9}$$

Donde ω^2 representa la varianza del parámetro farmacocinético poblacional seleccionado. Las varianzas $\omega^2_{1\dots m}$ (siendo m el número de parámetros del modelo con variabilidad interindividual asociada) se obtienen a partir de la matriz de varianza-covarianza Ω calculada, y corresponden a los elementos diagonales de dicha matriz.

4.8.4 Modelización de la variabilidad aleatoria residual

La variabilidad residual atribuible a variables o efectos aleatorios puede cuantificarse mediante las siguientes expresiones:

Modelo aditivo:

$$y_{ij} = f(\theta_i, D_i, x_{ij}) + \epsilon_j; \quad \epsilon_j \sim N(0, \sigma_1^2) \quad \text{Ecuación 4.10}$$

Modelo proporcional:

$$y_{ij} = f(\theta_i, D_i, x_{ij}) \cdot (1 + \epsilon_j); \quad \epsilon_j \sim N(0, \sigma_1^2) \quad \text{Ecuación 4.11}$$

Modelo exponencial:

$$y_{ij} = f(\theta_i, D_i, x_{ij}) \cdot e^{\epsilon_j}; \quad \epsilon_j \sim N(0, \sigma_1^2) \quad \text{Ecuación 4.11}$$

donde $f(\theta_i, D_i, x_{ij})$ representa la concentración individual predicha mediante el correspondiente modelo estructural farmacocinético (f), en función de los valores individuales de los parámetros farmacocinéticos (θ), la dosis administrada (D_i), y los tiempos j de determinación de las concentraciones en el individuo i (variable independiente) (x_{ij}). Se asume que los efectos aleatorios residuales son independientes y presentan una distribución simétrica alrededor de cero y varianza σ_1^2 . Tal y como sucede en el cálculo de la variabilidad interindividual, la variabilidad residual también permite el cálculo combinado de modelos, como por ejemplo, el modelo aditivo-proporcional.

De todos los modelos descritos, en esta Memoria se ha empleado el modelo exponencial. En el modelo exponencial, la magnitud de la variabilidad residual puede expresarse en términos de coeficiente de variación porcentual (CV%), calculado según la siguiente expresión:

$$CV(\%) = \sqrt{\sigma^2} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4.12}$$

donde σ^2 representa la varianza del parámetro farmacocinético poblacional seleccionado. Las varianzas $\sigma^2_{1\dots z}$, siendo z el número de variables dependientes posibles en el modelo (fármaco y metabolito, nutriente en plasma y orina, etc...), representan los elementos diagonales de la matriz de varianza-covarianza Σ .

4.8.5 Obtención de los parámetros farmacocinéticos individuales

Una vez seleccionados los modelos de variabilidad y el modelo farmacocinético estructural se obtienen los parámetros farmacocinéticos individuales usando la metodología bayesiana de máxima probabilidad a posteriori (procedimiento POSTHOC del NONMEM).

4.8.6 Selección de covariables

El modelo farmacocinético estructural seleccionado constituye el modelo de referencia, cuya FMO y VR se utiliza como valor de referencia para valorar estadísticamente el efecto de la incorporación de los modelos de regresión con variables predictoras sobre la variabilidad de los parámetros farmacocinéticos. Se valoró la influencia del estado nutricional (NN o DN), gravedad del grado de desnutrición (SCORE), el peso y la albúmina (variables predictoras) sobre los parámetros farmacocinéticos del modelo farmacocinético poblacional seleccionado en la primera y segunda fase. En este estudio la selección de covariables se realiza mediante el método directo⁶⁷. Este método consiste incluir las covariables una a una de

manera secuencial, seleccionando la mejor relación matemática (lineal, potencial o exponencial), utilizando para ello los parámetros utilizados para la selección del modelo, que se comparan con los obtenidos en el modelo referencia. Se emplearon niveles de significación del 5% (diferencia en la FMO >3,841 puntos) y 1% (diferencia en la FMO >6,635 puntos) en el proceso de inclusión y exclusión secuencial de covariables.

Inicialmente se realiza la representación gráfica de la covariable predictora frente al parámetro objeto de estudio obtenido en el modelo de referencia seleccionado previamente. Se realizan regresiones lineales potenciales y exponenciales para determinar si existe relación entre la covariable predictora y el parámetro farmacocinético, así como acotar el tipo de relación matemática existente entre ellos. Esta relación se evalúa tanto gráficamente como mediante el parámetro estadístico coeficiente de correlación “r”.

En la fase de inclusión secuencial de las covariables se introducen las covariables de forma secuencial, buscando la mejor relación matemática entre la covariable y el parámetro farmacocinético. La expresión matemática y las covariables así seleccionadas se incorporaron, una a una, al modelo farmacoestadístico hasta obtener el modelo completo; es decir, el modelo en el cual la inclusión de más covariables no mejora la estimación de los parámetros farmacocinéticos de taurina.

En la exclusión secuencial de cada covariable se valora la contribución de cada covariable al modelo completo mediante su eliminación del modelo farmacoestadístico. Este proceso secuencial

permitió conservar únicamente las covariables predictoras cuya aportación era significativa.

4.8.7 Selección del modelo

Durante la selección del modelo se aplica el principio de parsimonia, ya que cuando se ajusta más de un modelo a nuestras observaciones (niveles del fármaco o del nutriente), siempre se debe seleccionar el modelo más simple que explique nuestras observaciones, asumiendo siempre un grado aceptable de precisión. Existen varias técnicas para el refinamiento de los modelos farmacocinéticos poblacionales que incluyen tanto aproximaciones numéricas como gráficas. No obstante, en ningún caso una técnica por sí sola es concluyente, y por tanto, sólo la combinación de los resultados obtenidos mediante la utilización de varias técnicas proporciona una visión general sobre la bondad del ajustado, y consecuentemente, permite ayudar en el proceso de selección de modelos. En la selección del modelo farmacocinético se ha empleado como criterio estadístico el valor de la función mínima objetivo, y como criterio gráfico se han representado las gráficas de bondad de ajuste.

El cálculo del criterio estadístico **función mínima objetivo** se basa en la relación existente entre la función objetivo (Obj) y la función de máxima probabilidad (Lmax) optimizada en los métodos de mínimos cuadrados extendidos, de acuerdo a la ecuación:

$$Obj = -2\ln(Lmax) \qquad \text{Ecuación 4.13}$$

Según esta ecuación, la función mínima objetivo (FMO) es proporcional a menos dos veces el logaritmo de la probabilidad de los datos. En consecuencia, la minimización de Obj (FMO) equivale a la maximización de Lmax. El cambio que se produce en la función cuando se introducen uno o más parámetros en el modelo, puede utilizarse para evaluar su significación estadística, ya que la diferencia entre los valores de la función mínima objetivo obtenidos en los modelos, se encuentra asintóticamente distribuida como χ^2 con tantos grados de libertad como diferencia en el número de parámetros entre los modelos. Para analizar si la mejora del modelo es significativa, se compara la diferencia entre las FMO con el valor χ^2 tabulado, para los grados de libertad correspondientes a la diferencia entre el número de parámetros de los modelos y el nivel de significación (p) elegido. Para la construcción de los modelos farmacostatísticos se ha requerido un cambio en FMO mayor a un valor de p menor de 0,05 (p<5%) que implica una mejora de FMO diferente en función del número de variables introducidas. A continuación se muestra las diferentes significaciones y los valores de mejora en la FMO asociadas:

- Una variable, mejora de FMO de 3,841 (χ^2 , $\alpha=0,05$, gl=1)
- Una variable, mejora de FMO de 6,635 (χ^2 , $\alpha=0,01$, gl=1)
- Una variable, mejora de FMO de 7,879 (χ^2 , $\alpha=0,005$, gl=1)

Las **gráficas de bondad de ajuste** (“Goodnes of fit plots”, GOF) corresponden a una serie de gráficos que permiten evaluar de una manera visual si el modelo farmacocinético proporciona un ajustado adecuado de los datos⁶⁸. En ellas, se evalúa de forma gráfica si el modelo poblacional es

capaz de reproducir la variabilidad de los datos observados de los cuales es originario, usualmente comparando los datos predichos por el modelo y su distribución frente a las observaciones reales.

A continuación, se indican los gráficos de bondad de ajuste que se han utilizado en esta memoria para realizar la selección del modelo farmacocinético.

- Concentración experimental (C_p) y concentración predicha individual (IPRE) frente al tiempo (t).
- Concentración experimental (C_p) frente a la concentración predicha poblacional (PRED) y la concentración predicha individual (IPRE).
- Residual poblacional (RES) frente a la concentración predicha poblacional (PRED) y el tiempo (t).
- Residual individual (IRES) frente a la concentración predicha poblacional (PRED) y el tiempo (t).
- Residual poblacional ponderado (WRES) frente a la concentración predicha poblacional (PRED) y el tiempo (t).
- Residual individual ponderado (IWRE) frente a la concentración predicha poblacional (PRED) y el tiempo (t).

Por ejemplo, en los gráficos en los que se representan las predicciones poblacionales (PRED) y las predicciones individuales (IPRED) frente a las observadas (C_p), los pares de valores representados deben agruparse de manera uniforme alrededor de la línea identidad. Además, la gráfica IPRED frente C_p debe ser más homogénea y presentar menor dispersión que la gráfica PRED frente C_p , ya que el primero incorpora los

diferentes términos de variabilidad interindividual necesario para el ajuste individual de los datos (IPRED).

4.8.8 Evaluación del modelo farmacocinético

Una vez finalizado el proceso de modelización se deben realizar una serie de comprobaciones que permiten evaluar la validez del modelo seleccionado, comprobando que el modelo final es adecuado y cumple con las expectativas propuestas.

La validez del modelo se puede evaluar midiendo su capacidad predictora empleando los mismos datos utilizados durante la modelización (evaluación interna) o bien utilizando datos distintos (evaluación externa). En esta Memoria se han empleado el método de validación interna de simulación/estimación con reemplazo "Bootstrap" y el método de validación externa con simulación mediante la exploración predictiva visual "Visual Predictive Check" (VPC).

El "**Bootstrap**" es un método estadístico intensivo que permite evaluar la incertidumbre en las estimaciones de parámetros mediante la estimación del error estándar, los intervalos de confianza y el sesgo. Esta metodología se realiza en tres pasos.

En primer lugar se generan diferentes conjuntos de datos, un mínimo de 200, basados en la distribución de los datos originales. Para cada nuevo conjunto de datos ("bootstrap data set") se selecciona aleatoriamente con reemplazo un individuo del archivo original, repitiendo

esta selección de individuos hasta obtener un conjunto de datos con el mismo número de individuos que los datos originales. A continuación se calculan los parámetros poblacionales para cada nuevo conjunto de datos (“bootstrap data set”) aplicando el modelo final, y posteriormente, calcular la mediana y los intervalos de confianza 95% para describir la distribución de dichos parámetros. Finalmente, se comparan los valores medios de los parámetros obtenidos mediante “bootstrap” con los obtenidos utilizando los datos originales. Se considera que el modelo es estable si el valor típico del parámetro poblacional (obtenido con los datos de origen) se encuentra dentro de los intervalos de confianza 95% estimados por “bootstrap”.

El “**Visual Predictive Check**” (VPC) consiste en evaluar gráficamente si el modelo poblacional es capaz de reproducir la variabilidad de los datos observados de los cuales es originario. Para generar esta figura se simulan los perfiles farmacocinéticos utilizando el modelo farmacocinético establecido y las mismas o similares características que los datos de origen (dosis, tiempo de muestreo, características nutricionales, etc.). Para cada valor de variable independiente (tiempo de toma de muestra), se calculan los percentiles 5 y 95% de la variable dependiente (concentraciones de fármaco) simulada, calculando el intervalo de predicción del 90% para cada tiempo. De esta forma, se representan los percentiles 5 y 95%, y en algunos casos también el 50%, de la distribución de las concentraciones de analito simuladas y se comparan con la distribución de las concentraciones observadas. Cuanta mayor es la similitud entre los datos obtenidos en las simulaciones y los procedentes de las observaciones mejor es el ajustado.

4.9 El AUC como métrica del valor añadido del aporte de taurina a los Preparados enterales

A partir de los datos experimentales de concentración plasmática de taurina y tiempo de toma de muestra, se han calculado los parámetros farmacocinéticos no compartimentales C_{max} , t_{max} y área bajo la curva (AUC) concentración plasmática de nutriente-tiempo.

El método de estimación escogido para el cálculo del área bajo la curva de concentraciones plasmáticas corresponde al método no compartimental trapezoidal. Éste consiste en calcular el AUC como la suma de las áreas de unos trapecios, definidos por los valores experimentales concentración plasmática vs tiempo, hasta el último punto experimental, y a partir de éste se calcula el área residual por extrapolación hasta el infinito.

$$AUC_0^t = \sum_0^t \frac{C_{n-1} + C_n}{2} \cdot (t_n - t_{n-1}) \quad \text{Ecuación 4.13}$$

En la administración de los preparados enterales en régimen de dosis única este cálculo se realiza desde tiempo igual a cero hasta tiempo igual a 4 horas (AUC_{0-4h}), y en la administración de los preparados en régimen de dosis múltiple se efectúa en el intervalo de 6 a 8 horas (AUC_{6-8h}).

El cálculo de los parámetros farmacocinéticos t_{max} , C_{max} y AUC se ha realizado mediante el programa informático WinNonlin® 5.0.1, y el análisis estadístico de los resultados se ha realizado con ayuda del

programa IBM SPSS Statistics 20.0, fijando la significación estadística p en 0,05.

Para el cálculo del valor añadido (VA) del aporte de taurina suministrado en los preparados enterales es importante conocer si las medias de los valores de AUC en cada condición ensayada siguen una distribución normal empleando, por ejemplo, la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov. En el caso de que la distribución de los valores de AUC sea normal ($p > 0,05$) se emplea la media aritmética de los valores individuales. En caso contrario, se realiza la transformación logarítmica de los valores individuales empleando la media geométrica.

Para el cálculo del valor añadido (VA) del aporte de taurina suministrado en los preparados enterales sobre los valores basales del aminoácido en cada estado nutricional (NN o DN) se ha estimado a partir del cociente entre la media aritmética o geométrica del AUC_{0-4h} tras la administración de los distintos preparados enterales en régimen de dosis única (VA_{DUNN} y VA_{DUDN} , Ecuación 4.14 y 4.15), o el AUC_{6-8h} cuando se administraron los preparados en un régimen de dosis múltiple (VA_{DMNN} y VA_{DMDN} , Ecuación 4.16 y 4.9), y el AUC obtenida en las mismas condiciones tras la administración de agua.

$$VA_{NNDU} = \frac{AUC_{0-4h}^{NNPE}}{AUC_{0-4h}^{NNAgua}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4.14}$$

$$VA_{DNDU} = \frac{AUC_{0-4h}^{DNPE}}{AUC_{0-4h}^{DNAgua}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4.15}$$

$$VA_{NNDM} = \frac{AUC_{6-8h}^{NNPE}}{AUC_{6-8h}^{NNAgua}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4.16}$$

$$VA_{DNDU} = \frac{AUC_{6-8h}^{DNPE}}{AUC_{6-8h}^{DNAgua}} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 4.17}$$

siendo AUC_{0-4h}^{NNPE} y AUC_{0-4h}^{DNPE} el AUC_{0-4h} obtenido en animales NN o DN respectivamente, tras la administración de una única dosis de los preparados enterales. AUC_{6-8h}^{NNPE} y AUC_{6-8h}^{DNPE} corresponde al AUC_{6-8h} obtenido en animales NN o DN respectivamente, tras la administración de los preparados enterales en régimen de dosis múltiple.

4.10 Métodos estadísticos

Para el análisis estadístico de los diferentes resultados obtenidos en la presente memoria, se han empleado los paquetes estadísticos S-Plus 6.1 e IBM SPSS Statystics 20.0.

Para el ensayo de linealidad del método analítico se ha utilizado el coeficiente de correlación (r), como criterio estadístico para medir la bondad del ajustado. Este criterio también se utiliza como criterio de selección de modelo.

La utilización de métodos paramétricos para la comparación de medias requiere dos condiciones previas. La primera es que las medias presenten distribución normal o de Gauss y que las varianzas sean homogéneas.

Por tal razón, previo a la aplicación de las pruebas estadísticas, se ha de contrastar la distribución de la variable mediante la prueba de Kolmogorov-Smirnov. Esta prueba compara la distribución acumulada de la muestra con la que se obtendría en el supuesto de que ésta siguiese la ley Normal. Este procedimiento se utiliza para contrastar la hipótesis nula de que una muestra procede de una población en la que la variable se distribuye según la ley Normal. Así, cuando la p del estadístico de Kolmogorov-Smirnov es superior a 0,05, se cumple la hipótesis nula (H_0), es decir, la distribución de la variable no difiere de la normalidad. Por el contrario, si se cumple la hipótesis alternativa (H_1), p es inferior a 0,05, la distribución de la variable difiere de la distribución normal y no se pueden utilizar pruebas paramétricas^{69, 70}.

El segundo requisito para la aplicación de pruebas paramétricas consiste en que las varianzas de las variables a comparar sean homogéneas para cualquier valor que tome la variable (homocedasticidad). Si existen diferencias en las varianzas de las variables a estudio, se dice que las varianzas son heterocedásticas y no se pueden utilizar pruebas paramétricas.

Existen varias pruebas para contrastar la distribución de las varianzas entre ellas la de Levene. Cuando esta prueba arroja un valor de p superior a 0,05 se cumple la hipótesis nula (H_0) y las desviaciones típicas o las varianzas son homogéneas, mientras que si p es inferior a 0,05, se cumple la hipótesis alternativa (H_1) y se considera que las varianzas no son homogéneas. Además, las observaciones son independientes, es decir, el

valor de una observación en un grupo no proporciona información sobre el valor de la observación en otro grupo.

En el campo de la investigación ocurre con frecuencia que la variable no siga una distribución normal y/o que las poblaciones presenten varianzas no homogéneas debido, por ejemplo, a que las muestras son pequeñas. En estos casos, se recurre a las pruebas no paramétricas en las que no se especifican las condiciones de normalidad en la distribución y homogeneidad de la población de donde se extrajo la muestra y nos permiten comparar grupos en los que las variables son sometidas a una escala ordinal.

4.10.1 Pruebas paramétricas

Cuando se confirma la distribución normal y se cumple la condición de homocedasticidad ($p > 0,05$) de la variable a estudio, se aplica la prueba *t de Student* bilateral que contrasta la presencia de diferencias entre dos medias fijando un nivel de confianza del 95% (IC95%). Cuando se comparan más de dos medias se utiliza el análisis de varianza (ANOVA) junto con pruebas de comparación múltiple a posteriori o Post hoc (Scheffe, Tukey, R-E-G-W F, etc.). El análisis de la varianza de un factor contrasta la hipótesis nula de que las K medias de una variable dependiente cuantitativa son iguales en K grupos independientes de casos definidos por una sola variable de agrupación⁷¹. El análisis de la varianza pretende determinar si realmente existe una variación sistemática debida a la variable de

agrupación (variación entre grupos), superior a la variación residual (variación asociada a cada observación individual o variación intragrupos).

4.10.2 Pruebas no paramétricas

La prueba de *U de Mann-Whitney* es la alternativa no paramétrica a la prueba *t de Student* para dos muestras independientes. Esta prueba contrasta si dos grupos independientes han sido tomados de una misma población. La hipótesis nula (H_0), consistirá en que las dos muestras proceden de una misma población, mientras que la confirmación de la hipótesis alternativa (H_1), significará que no proceden de la misma población. El procedimiento que emplea consiste en ordenar de menor a mayor los casos de ambas muestras como si se tratase de una sola muestra, asignando un rango a cada caso, con la norma de que si hay dos o más valores de la variable iguales, se asigna como rango el valor de la media de los rangos que tendrían si fueran diferentes. El estadístico de contraste U es la suma de los rangos de cada grupo. Para contrastar la H_0 se toma el de menor valor y se compara con los valores de U tabulados. Si el valor estimado es menor que el valor tabulado, se concluye que existen diferencias entre ambas medias^{69, 70}.

En el caso de más de dos muestras se puede recurrir al análisis de varianza no paramétrico como el análisis no paramétrico de Kruskal-Wallis. Esta prueba estadística es equivalente a la prueba de análisis de varianza cuando las variables a comparar no se ajustan a la normalidad. El estadístico de Kruskal-Wallis contrasta si la distribución de la variable

dependiente es la misma en los grupos. Los casos de los grupos se ordenan en series simples, sustituyendo cada observación por su rango, y se calcula la suma de los rangos para cada grupo⁶⁹.

4.10.3 Criterios de calidad de los ajustados

Mediante el programa de ajuste de datos se obtienen los valores de los parámetros que definen las ecuaciones representativas de los distintos modelos establecidos. Para la elección del modelo más idóneo, en cada caso, se utiliza la función mínima objetivo y las gráficas de bondad de ajuste, tal y como se detalla en el Epígrafe 4.8.7.

El cálculo de la FMO se obtiene mediante el programa Nonmem 7.0, y los gráficos que permiten obtener la bondad del ajuste se han construido utilizando el programa informático S-Plus 6.1 t y RStudio.

El coeficiente de variación (CV%) de un parámetro es la desviación estándar (DE) expresada como porcentaje respecto al valor del parámetro promedio estudiado (X):

$$CV\% = DE/x \cdot 100 \qquad \text{Ecuación 4.18}$$

Proporciona información sobre la certeza con la que se ha estimado un parámetro. El ajustado es tanto más fiable cuanto menor es el valor del coeficiente de variación⁶⁶.

5 RESULTADOS

5.1 Validación del método analítico

5.1.1 Análisis de linealidad

En el Cuadro 5-1 se muestran los valores de la pendiente y ordenada en el origen con sus respectivas desviaciones estándar, y el coeficiente de correlación de una de las curvas de calibración obtenida tras la cuantificación de taurina en las disoluciones patrón del aminoácido.

Con el fin de obtener las concentraciones plasmáticas de taurina en las muestras experimentales, las áreas de los picos cromatográficos obtenidos en las muestras de plasma extraídas tras la administración de las soluciones y preparados enterales ensayados se han interpolado en las rectas de calibración (Figura 5-1).

Ecuación de la recta $y = a * x + b$	DE pendiente	DE ordenada en el origen	r
$y = 35247 * x - 49907$	184	42851	0.9999

Cuadro 5-1. Valores de la pendiente (a) y ordenada en el origen (b) y sus respectivas desviaciones estándar (DE), así como del coeficiente de correlación obtenido en una recta de calibración de taurina (r).

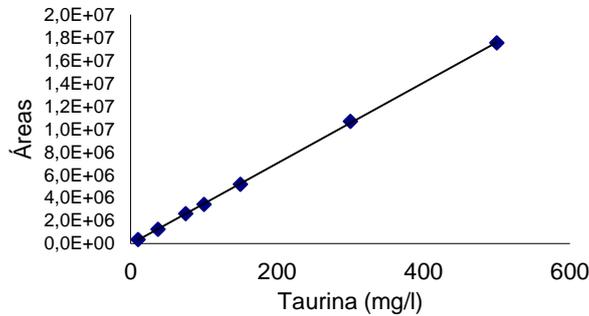


Figura 5-1 Ejemplo de recta de calibración de taurina

5.1.2 Ensayo de precisión y exactitud

En el Cuadro 5-2 se recogen los resultados obtenidos en la valoración de las soluciones patrón de taurina. Para cada condición, se han valorado cinco diluciones de la solución madre. En cada caso se indica el valor de la concentración promedio estimada de taurina, la desviación estándar (DE), el coeficiente de variación de cada media (CV%) y el error absoluto y relativo de dichos valores.

Ámbito de concentración (µg/ml)	Concentración de referencia (µg/ml)	Error absoluto	Error relativo %	CV (%)
500 a 1	500	9,6	1,9	1,50
	200	2,5	1,3	4,32
	100	5,0	5,0	3,28
	25	1,3	5,29	8,39
	1	0.03	8,1	9,6

Cuadro 5-2. Concentración de referencia, error absoluto relativo y coeficiente de variación obtenidos para cada uno de los patrones de taurina ensayados en un mismo día por triplicado. CV%: Coeficiente de variación.

5.1.3 Límite de detección y cuantificación

Los límites de detección y cuantificación se han determinado siguiendo el método descrito en el capítulo de Material y Métodos (Epígrafes 4.7.3 y 4.7.4). El límite de detección obtenido ha sido de 0,017 mg/l y el de cuantificación se estableció en 0,052 mg/l.

5.2 Ensayos de digestión “in vitro” de los preparados enterales

Las concentraciones de taurina contenidas en los diferentes preparados enterales expresadas como mg de aminoácido por ml de dieta enteral en cada fase del ensayo de digestión *in vitro*, se detallan en el Cuadro 5-3. Los valores indicados corresponden al valor medio de los replicados realizados (n=6 por cada preparado) y están acompañados de su correspondiente desviación estándar.

Condición de ensayo	Preparado de referencia	Preparado problema T-
	Isosource-ST®	Diet Plus®
	mg taurina/2,5 ml (M±DE)	mg taurina/2,5 ml (M±DE)
Sin digestión	0,010 ± 0,001	0,104 ± 0,001
pH= 1	0,129 ± 0,001	0,167 ± 0,025
pH= 7	0,224 ± 0,028	0,579 ± 0,065

Cuadro 5-3. Concentración media de taurina y desviación estándar (DE) de cada dieta empleada al finalizar cada una de las fases del ensayo de digestión.

5.3 Animales de experimentación. Evaluación del estado nutricional.

El número de animales seleccionados para el estudio fue de N=200. De ellos, 7 fueron excluidos por no cumplir los criterios de inclusión definidos. Los animales restantes, se distribuyeron de forma aleatoria en grupo dos grupos: Normonutridos (NN) y Desnutridos (DN). El número final de animales incluidos en el estudio fue de N=179. En la Figura 5-2 se muestran las pérdidas y la distribución de los animales en el estudio.

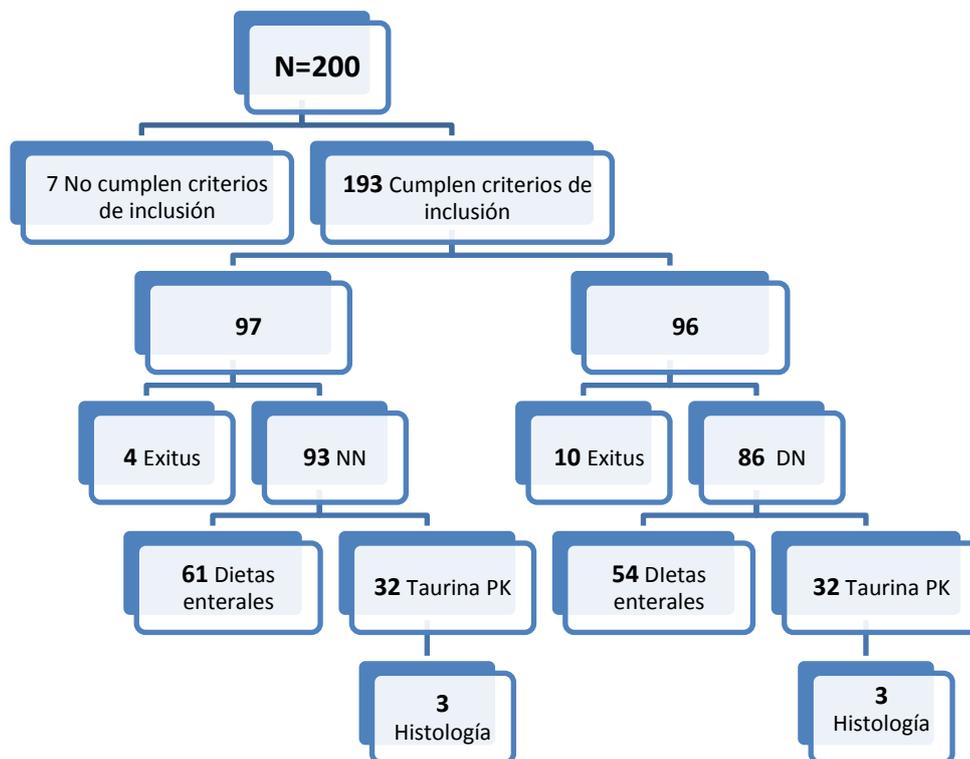


Figura 5-2 Distribución de los animales en el estudio. NN: normonutridos; DN: desnutridos; Exitus: animales que fallecen durante la intervención quirúrgica; PK: animales destinados al análisis farmacocinético; Histología: animales empleados en el análisis histológico del intestino delgado.

5.3.1 Parámetros biométricos y bioquímicos

5.3.1.1 Evolución del peso

La Figura 5-3 muestra la evolución temporal de los valores ponderales individuales de los animales NN y DN durante el periodo de adaptación. La evolución temporal del peso de los animales NN se describió mediante un incremento lineal del peso inicial, y el de los DN combinando un incremento lineal y una disminución exponencial⁶¹.

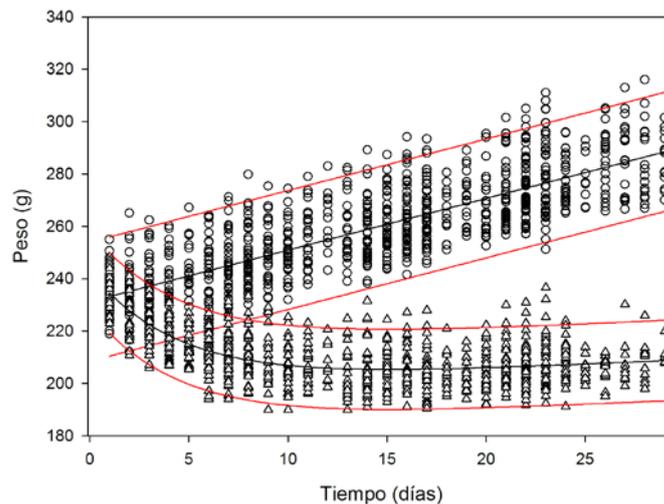


Figura 5-3. Evolución del peso de los animales NN (círculos, n=93) y DN (triángulos, n=86) durante el periodo de adaptación. Línea negra: Regresión de los puntos experimentales individuales. Línea roja: Intervalo de predicción del 95%. N=179.

El peso medio de los animales al iniciar el periodo de adaptación fue de $232,5 \pm 9,9$ g en el grupo NN (n=93), y de $235,8 \pm 6,43$ g en el grupo DN (n=86). Entre ambos grupos, NN y DN, al inicio del periodo de adaptación no se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

El peso medio de los animales DN al finalizar el periodo de adaptación ($210,9 \pm 15,3$ g) representó el 74,10% del peso que alcanzaron los animales NN en el mismo periodo ($284,1 \pm 16,5$ g) (Figura 5-3), siendo estas diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

5.3.1.2 Evolución de las concentraciones plasmáticas de albúmina y de colesterol

La Figura 5-4 representa la evolución de los niveles plasmáticos de **albúmina** durante el periodo de acondicionamiento de los animales. Asimismo, se muestra el ámbito de valores de la proteína plasmática que permiten realizar la gradación del estado de desnutrición de los animales (leve, moderada o severa).

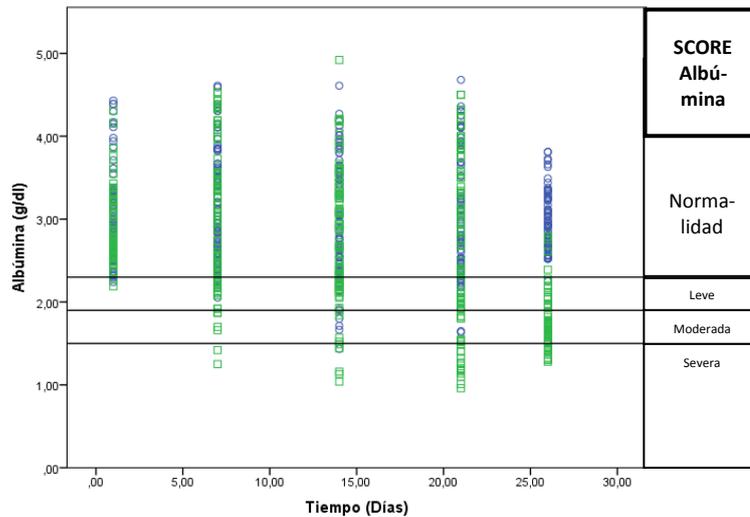


Figura 5-4. Niveles plasmáticos de albúmina sérica (g/dl) frente al tiempo. Animales NN: círculo azul; DN: cuadrado verde. Las líneas delimitan los ámbitos de concentración utilizados para realizar la asignación del grado de desnutrición alcanzado en los animales (normalidad $\geq 2,3$ g/dl, leve 1,9-2,3g/dl, moderada 1,5-1,89g/dl y severa: $< 1,5$ g/dl).

La concentración plasmática de albúmina de los animales al inicio del periodo de acondicionamiento fue de $2,86 \pm 0,67$ g/dl en el grupo NN, y de $2,90 \pm 0,59$ g/dl en el grupo DN. Entre ambos valores no se han observado diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$). No obstante, a medida que progresa el periodo de acondicionamiento, se observa que los niveles de albúmina sérica se mantienen en el grupo NN, y a partir del día 21 en el grupo DN se observa un descenso significativo ($p < 0,05$).

Los niveles de albúmina junto con los valores de peso obtenidos de los animales se utilizaron para establecer el grado de desnutrición individual, de acuerdo con el método de puntuación descrito en el capítulo de Materiales y Métodos (Epígrafe 4.2.1.3).

La evolución de los niveles plasmáticos de **colesterol** determinados durante el periodo de acondicionamiento de los animales se muestra en la Figura 5-5.

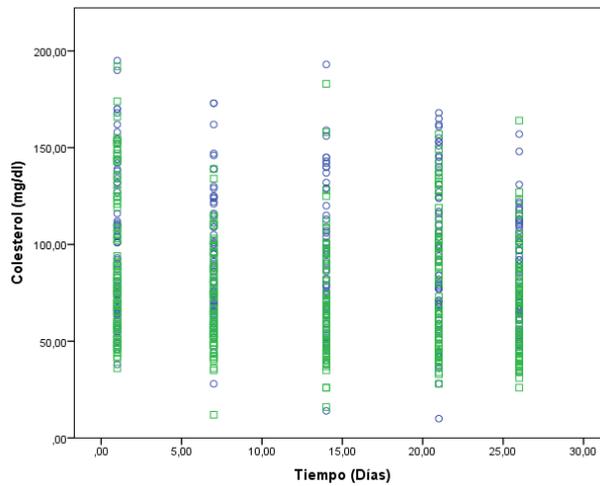


Figura 5-5. Niveles plasmáticos individuales de colesterol (mg/dl) frente al tiempo. Animales NN: círculo azul; animales DN: cuadrado verde.

Las concentraciones de colesterol total en sangre obtenidas en los animales el primer día del periodo de acondicionamiento en el grupo NN fueron de $98,70 \pm 39,16$ mg/dl y en el grupo DN de $93,01 \pm 39,20$ mg/dl. La prueba de Kruskal-Wallis no detectó diferencias estadísticamente significativas durante el periodo de acondicionamiento ($p > 0,05$).

5.3.2 Parámetros morfológicos

En los animales desnutridos se observó un tamaño corporal, longitud ungueal y densidad capilar disminuidos, así como mayor piloerección. En la Figura 5-6 se muestra una imagen representativa en la que se aprecian las diferencias macroscópicas analizadas.

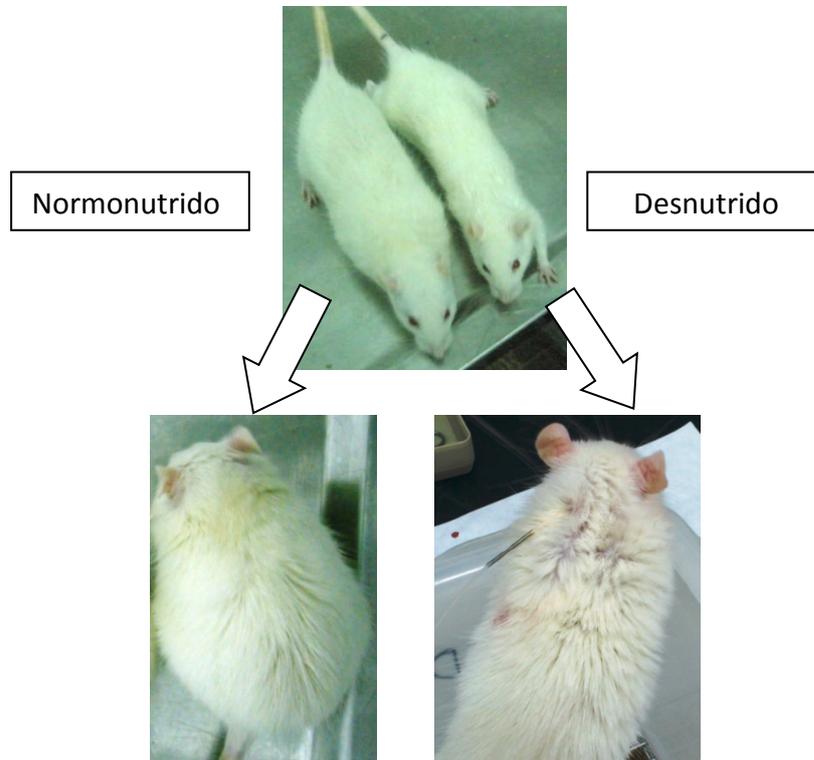


Figura 5-6. Imágenes de un animal NN (izquierda) y DN (derecha) procedentes de la misma camada obtenidas tras finalizar el periodo de acondicionamiento. De arriba abajo, se observa la diferencia de tamaño alcanzado, la piloerección y la pérdida de densidad capilar en la zona dorsal.

5.3.3 Valoración del grado de desnutrición

En nuestras condiciones experimentales, el 91,9% (n=79) de los animales del grupo DN desarrollaron una desnutrición calórico-proteica moderada o severa y el 8,1% (n=7) restante una desnutrición de carácter leve. Además, al finalizar el periodo de acondicionamiento ninguno de los animales del grupo DN se pudo considerar normonutrido (0 puntos). En la Figura 5-7 se muestra la distribución de los animales de acuerdo con el grado de desnutrición, para el total de animales incluido en el estudio

(parte superior) y de forma segregada (parte inferior) considerando por una parte los animales empleados en el estudio farmacocinético (izquierda) y por otra los empleados para evaluar las dietas enterales (derecha).

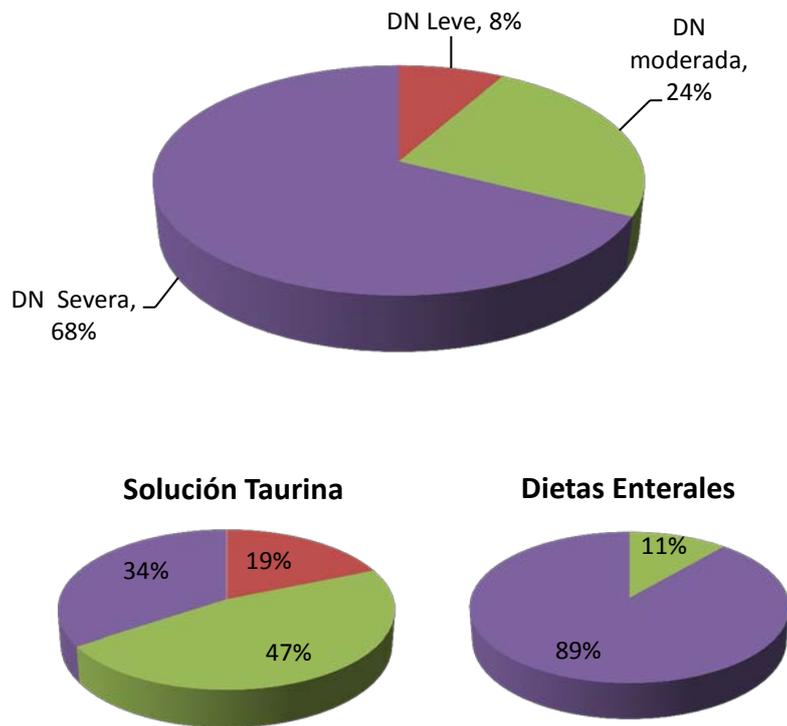


Figura 5-7. Porcentaje de animales del grupo DN que han alcanzado un grado de desnutrición leve (rojo), moderado (verde) o severo (morado) al finalizar el periodo de acondicionamiento.

5.4 Análisis histológico del intestino delgado

El estudio morfológico o estructural del tejido intestinal permitió evidenciar diferencias significativas entre los animales NN y DN. La longitud

y grosor del intestino en los animales NN fue superior que la de los animales DN. Para evidenciar estas variaciones se pesó el intestino delgado completo (NN= $10,92 \pm 0,95$ g y DN= $7,55 \pm 1,12$ g, $p < 0,05$), y el análisis estadístico realizado (t de Student) evidenció que las diferencias son estadísticamente significativas

Las capas muscular, submucosa y mucosa analizadas fueron de menor grosor y extensión en los animales DN que en los animales NN, siendo estas diferencias estadísticamente significativas en las zonas proximal y media ($p < 0,05$). El grosor de cada sección estructural del intestino delgado proximal fue entre 41,9 y 63,8% inferior en animales DN que en NN (muscular: NN= $0,43 \pm 0,04$ mm, DN= $0,18 \pm 0,04$ mm; submucosa: NN= $0,78 \pm 0,07$ mm, DN= $0,49 \pm 0,03$ mm). Las células secretoras que componen la capa submucosa fueron menos numerosas y de mayor tamaño en los animales DN que las de la zona homóloga en los animales NN (Figura 5-8).

La zona proximal presentó disminución, aplanamiento y acortamiento de las vellosidades del borde en cepillo e hipoplasia progresiva de las criptas. En la parte proximal o inicial del intestino, los villis, además de presentar menor tamaño ($2,63 \pm 1,63$ mm en NN respecto a $1,64 \pm 0,84$ mm en DN, $p < 0,05$), poseían un borde en cepillo con menor densidad de proyecciones digitiformes (Figura 5-9). Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas en la parte distal del intestino ($p > 0,05$).

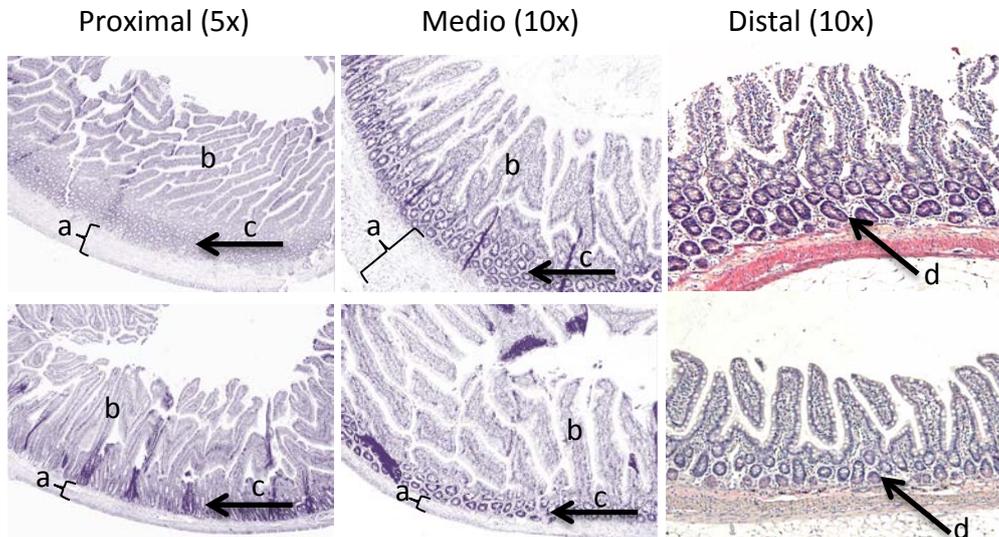


Figura 5-8. Secciones de intestino delgado proximal, medio y distal de animales NN (superior) y animales DN (inferior). En animales NN (superior) en los tramos proximal y distal se observa porción muscular (a) de mayor extensión que en animales DN (inferior), así como un mayor número de villis (b) y células secretoras (c). En la zona distal se observan ligeras diferencias en el número y tamaño de las células secretoras (d).

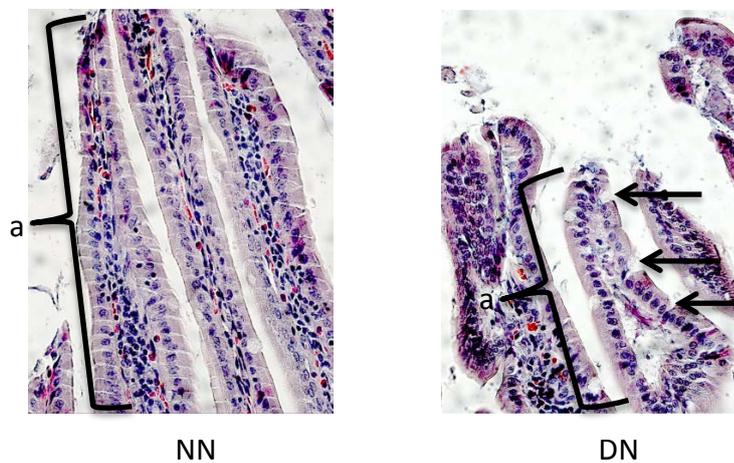


Figura 5-9 Microfotografía de 40 aumentos de un corte transversal de los villis de la primera porción del duodeno. En la parte izquierda (animal NN) se aprecian vellosidades regulares con un epitelio alto y estructurado; en la parte derecha (animales DN) las vellosidades muestran aplanamiento con un epitelio más bajo y desestructurado (flechas) , así como menor densidad celular.

5.5 Análisis farmacocinético compartimental

5.5.1 Curvas de concentración plasmática tiempo.

5.5.1.1 Administración intravenosa

En la Figura 5-10 se representan las concentraciones plasmáticas individuales de taurina frente al tiempo de muestreo, obtenidas tras la administración intravenosa de una dosis única de taurina de 1, 10 o 100 mg a los animales NN (grupo 1, 2 y 3) y DN (grupo 7, 8 y 9), respectivamente.

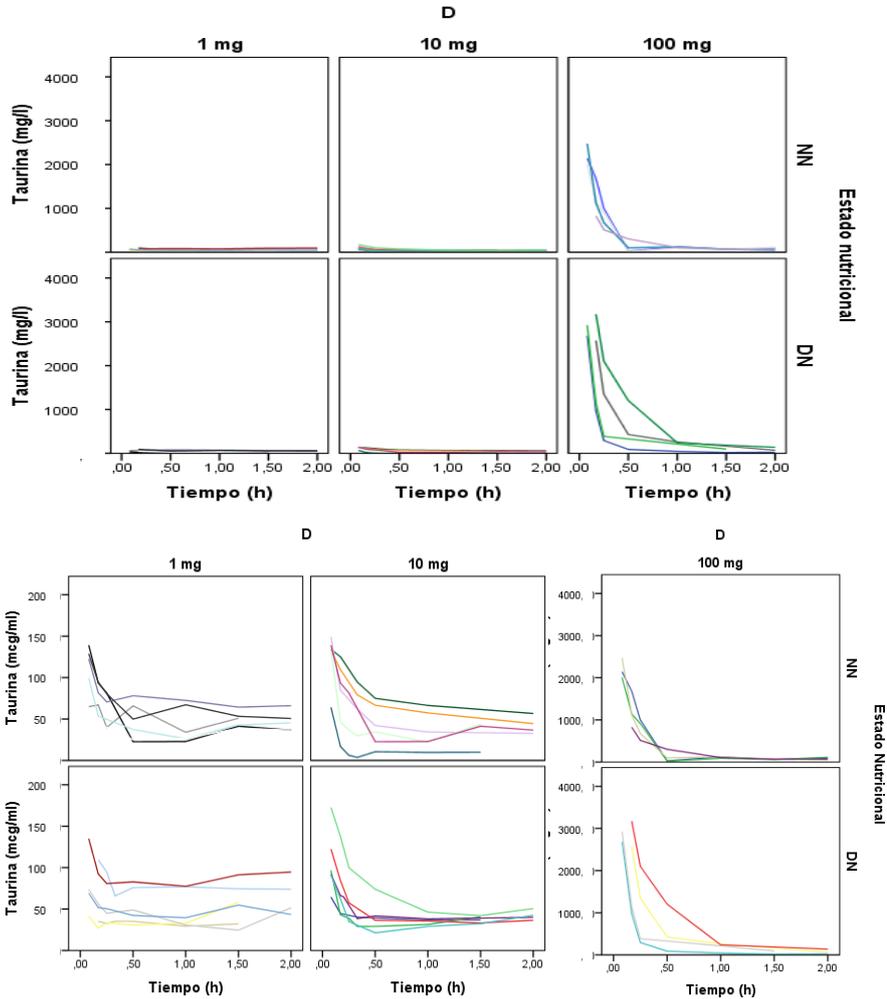


Figura 5-10: Concentraciones plasmáticas de taurina frente al tiempo tras la administración intravenosa de taurina. Superior: misma escala para las tres dosis; inferior: diferente escala para la dosis de 100 mg de taurina.

5.5.1.2 Administración oral

Las concentraciones plasmáticas individuales de taurina frente al tiempo de muestreo, obtenidas tras la administración oral de una dosis

única de taurina de 1, 10 o 100 mg a los animales NN (grupo 4, 5 y 6) y DN (grupo 10, 11 y 12), respectivamente, se muestran en la Figura 5-11.

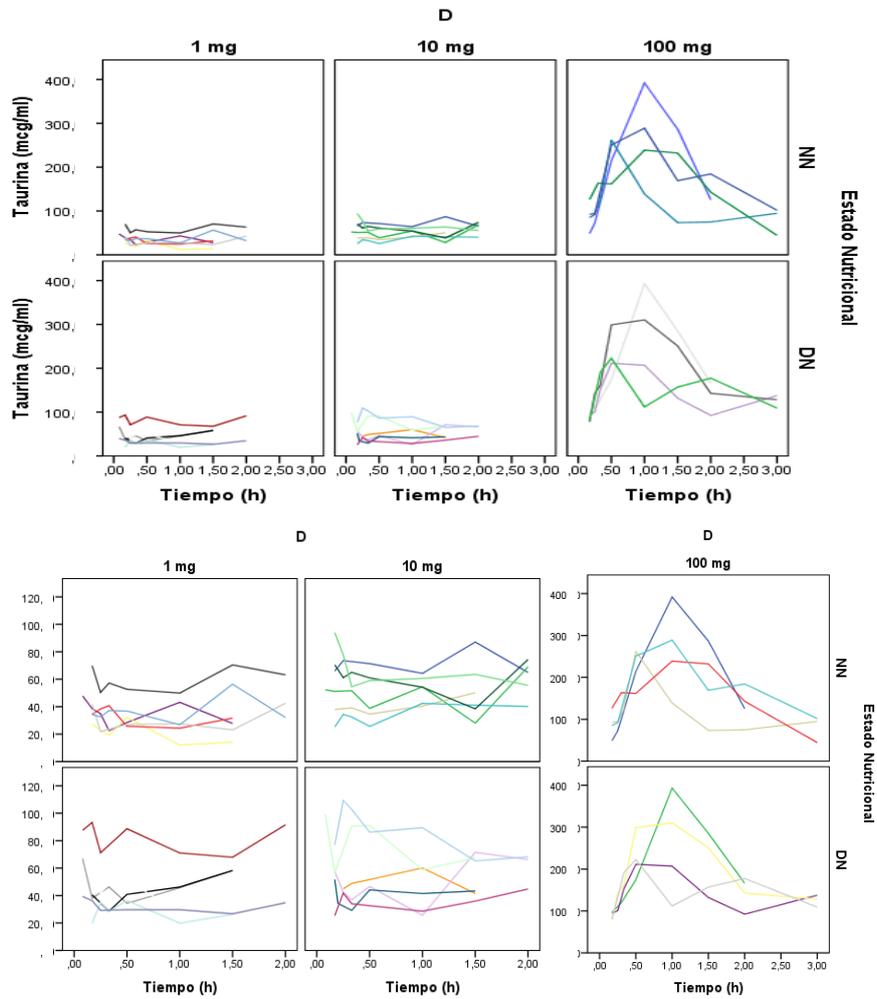


Figura 5-11. Concentraciones plasmáticas de taurina frente al tiempo tras la administración oral de taurina. Superior: misma escala para las tres dosis; inferior: diferente escala para la dosis de 100 mg de taurina.

Los resultados de la prueba de normalidad de Kolmogorov-Smirnov para los valores de concentración plasmática vs tiempo de cada grupo, aceptaron la hipótesis nula de normalidad en todos los casos ($p > 0,05$),

pudiendo realizarse el ajustado de los datos mediante métodos paramétricos. El análisis de varianza ANOVA realizado indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el nivel basal de taurina tiempo cero obtenido en animales NN ($50,97 \pm 14,54$ mg/l) y el valor basal obtenido en DN ($48,86 \pm 22,11$ mg/l) ($p > 0,05$).

5.5.2 Modelización de datos intravenosos

Los datos de concentración plasmática de taurina obtenidos para cada tiempo de toma de muestra tras la administración del aminoácido por vía intravenosa han permitido caracterizar la fase de disposición de la taurina.

Para implementar en los modelos los niveles endógenos de taurina basal se ha empleado el parámetro Q_0 , que representa la velocidad de incorporación de taurina en el torrente sanguíneo de forma endógena. Este parámetro tiene unidades de cantidad por unidad de tiempo (mg/h). En la Figura 5-12 se muestra un esquema de uno de los modelos utilizados.

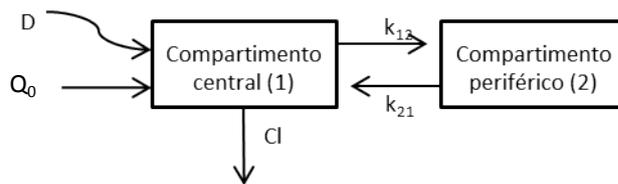


Figura 5-12 Ejemplo de un modelo bicompartimental tras la administración intravenosa del aminoácido. D: dosis administrada; Q_0 : velocidad de incorporación de taurina endógena de orden cero; Cl: aclaramiento, k_{21} y k_{12} : microconstantes de distribución entre los compartimentos central (1) y periférico (2).

5.5.2.1 Análisis empírico

En esta etapa de la modelización se ha realizado la selección del modelo estructural básico de forma independiente en los animales NN (Cuadro 5-4) o DN (Cuadro 5-5) y se ha evaluado en estas condiciones la no linealidad en el proceso de eliminación de la taurina. Posteriormente, se analizan los datos de forma conjunta (NN y DN).

Cuando se ha considerado diferentes valores de un mismo parámetro para los distintos grupos, éste se ha parametrizado mediante un factor empírico que multiplica al valor del parámetro para cada grupo. Este factor se ha denominado “F” seguido del parámetro farmacocinético y el grupo al cuál se refiere.

En el Cuadro 5-4 se muestra el número de parámetros de efecto fijo (N PPK), número de parámetros de efecto aleatorio (variabilidad interindividual y variabilidad residual, N VII), así como valores de la variabilidad residual (VR), coeficiente de variación (CV%) y FMO obtenidos tras el ajuste a los modelos mono y bicompartimental de los animales NN tras recibir una dosis de 1, 10 y 100 mg por vía intravenosa (grupos 1, 2, y 3). En el Cuadro 5-5 se muestran los modelos homólogos analizados en animales DN.

NN					
Modelo	Características	N PPK	N VII	VR (CV%)	FMO
14c	Monocompartimental	3	4	26,2	941
15c	Bicompartimental	5	6	21,5	889
28n	Bicompartimental, CI en función de la dosis (FCl ₁₀ y FCl ₁₀₀)	7	6	20,9 (20)	869

Cuadro 5-4 Características de los modelos mono y bicompartimentales ensayados en animales NN. FCl: factor que modifica el aclaramiento tras la administración de 10 (FCl₁₀) o 100 (FCl₁₀₀) mg de taurina.

DN					
Modelo	Características	N PPK	N VII	VR (CV%)	FMO
14d	Monocompartimental	3	4	39,4 (22,8)	931
15d	Bicompartimental	5	6	23,9 (23,8)	872
29	Bicompartimental, CI en función de la dosis (FCl ₁₀ y FCl ₁₀₀)	7	6	27,4	857

Cuadro 5-5 Características de los modelos mono y bicompartimentales ensayados en animales DN. FCl: factor que modifica el aclaramiento tras la administración de 10 (FCl₁₀) o 100 (FCl₁₀₀) mg de taurina.

En el Cuadro 5-6 se muestra el número de parámetros de efecto fijo (N PPK), número de parámetros de efecto aleatorio (N VII), así como valores de la variabilidad residual (VR), coeficiente de variación (CV%) y

FMO obtenidos tras el ajuste a los modelos mono y bicompartimental de los animales NN y DN tras recibir una dosis de 1, 10 y 100 mg por vía intravenosa (grupos 1, 2, 3, 7, 8, y 9). Asimismo, se muestra la diferencia de función mínima objetivo (Δ FMO) entre el modelo de referencia y el evaluado.

NN y DN						
Modelo	Características	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO	Δ FMO Modelo referencia
14	Monocompartimental	3	4	37,8 (18,8)	1936	
15	Bicompartimental	5	6	22,0 (21,1)	1788	-148 Modelo14
61	Bicompartimental, CI en función de la D (FCI ₁₀ y FCI ₁₀₀)	7	6	22,7 (22,4)	1740	-48 Modelo15

Cuadro 5-6 Modelos mono y bicompartimentales ensayados tras la administración intravenosa de taurina en animales NN y DN. Δ FMO Modelo de referencia: Variación en la FMO del modelo ensayado (número) respecto al modelo de referencia indicado (modeloX).

Una vez seleccionado el modelo estructural, se realizó el análisis de covariables. En la Figura 5-13 se muestra un diagrama de cajas de las variables albúmina plasmática y peso, y en la Figura 5-14 se representan los histogramas de frecuencias para cada variable. La prueba de Kolmogorov-Smirnov confirmó la normalidad de la distribución de ambos parámetros ($p > 0,05$).

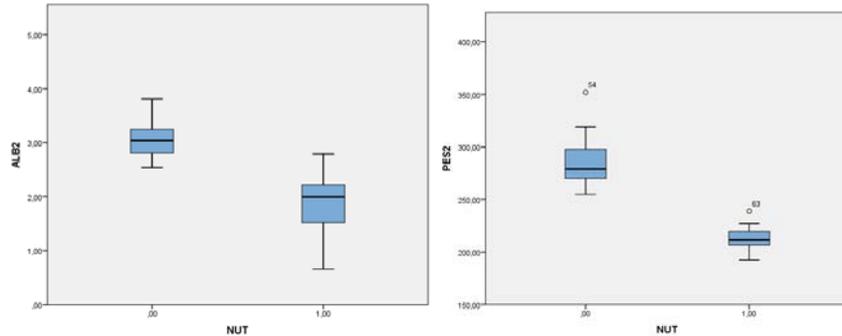


Figura 5-13 Diagrama de cajas del peso y albúmina sérica evaluados al finalizar el periodo de acondicionamiento. ALB2: concentración plasmática de albúmina (mg/dl); PES2: Peso (g); NUT: estado nutricional 0:NN, 1:DN. Puntos: Outliers o valor atípico.

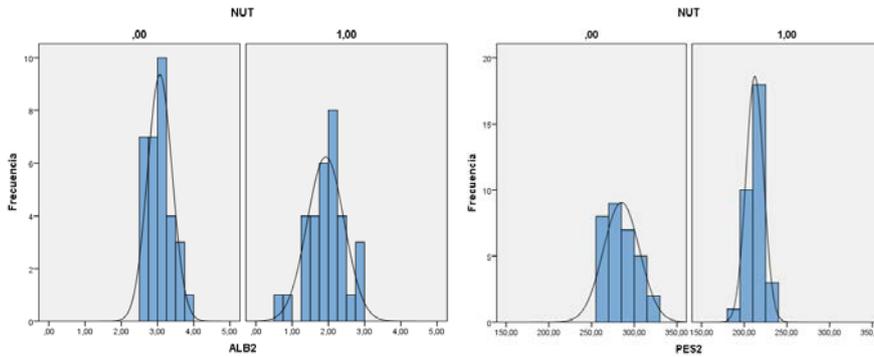


Figura 5-14 Histograma de frecuencias del peso y albúmina sérica evaluados al finalizar el periodo de acondicionamiento. ALB2: concentración plasmática de albúmina (mg/dl); PES2: Peso (g); NUT: estado nutricional 0:NN, 1:DN.

La representación gráfica de los parámetros farmacocinéticos individuales aclaramiento (Cl), volumen de distribución del compartimento central (Vc), constante de velocidad de formación de taurina endógena (Q₀), constante de velocidad de distribución de la taurina desde el compartimento central al compartimento periférico (K₁₂), constante de velocidad de retorno de taurina desde el compartimento periférico al compartimento central (K₂₁) proporcionados por el modelo estructural seleccionado (modelo 61) no mostró una correlación lineal, exponencial o

potencial significativa ($r < 0,09$, $p < 0,05$) con las variables biométricas o bioquímicas asociadas.

En el Cuadro 5-7 se detalla el número de parámetros de efecto fijo (N PPK), número de parámetros de efecto aleatorio (variabilidad interindividual y variabilidad residual, N VII), así como valores de la variabilidad residual (VR), coeficiente de variación (CV%) y FMO obtenidos tras el ajuste de algunos de los modelos empleados para evaluar la influencia del estado nutricional de los animales en los parámetros farmacocinéticos aclaramiento (Cl), volumen de distribución del compartimento central (Vc) y constante de velocidad de formación de taurina endógena (Q_0), así como modelos que permitieron evaluar la linealidad cinética en la fase de disposición del aminoácido. Asimismo, se muestra la diferencia de función mínima objetivo (Δ FMO) entre el modelo de referencia y el evaluado.

Animales NN y DN						
Modelo	Características	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO	ΔFMO Modelo referencia
15	Bicompartmental	5	6	22,0 (21,1)	1788	
61	Bicompartmental, Cl en función de la D (FCl ₁₀ y FCl ₁₀₀)	7	6	22,7 (22,4)	1740	-48 modelo15
16	Bicompartmental, Cl en función del estado nutricional (FCl _{DN})	6	6	24,1 (20,6)	1785	-3 modelo15
16vc	Bicompartmental, Vc en función del estado nutricional (FV _{C_{DN}})	6	6	21,7 (25,8)	1787	1 modelo15
96	Bicompartmental, Vc y Cl en función del estado nutricional (FCl _{DN} , FV _{C_{DN}})	7	6	22,3 (31,0)	1785	-2 modelo16VC
61b	Bicompartmental, Cl en función de la D (FCl₁₀ y FCl₁₀₀) y el estado nutricional (FCl_{DN})	8	6	20,0 (18,7)	1734	-6 modelo61
61bVC	Bicompartmental, Cl en función de la D (FCl ₁₀ y FCl ₁₀₀) y el estado nutricional (FCl _{DN}), Vc en función del estado nutricional	9	6	23,7 (19,7)	1734	0 modelo61b

Cuadro 5-7 Modelos ensayados tras la administración intravenosa de taurina en animales NN y DN. El parámetro utilizado para valorar el cambio en el parámetro farmacocinético (PPK) estudiado se representa con el término FPPK_{DN}. ΔFMO Modelo de referencia: Variación en la FMO del modelo ensayado (número) respecto al modelo de referencia indicado (modeloX).

De acuerdo con la FMO, la variabilidad residual (VR) y la variabilidad interindividual (VII) de los parámetros el modelo estructural que mejor describe los datos experimentales es el bicompartimental con aclaramiento no lineal y sensible al estado nutricional (modelo 61b). En el Cuadro 5-8 se muestran los parámetros farmacocinéticos del modelo seleccionado. El modelo 61b está constituido por una constante de velocidad de formación de taurina endógena (Q_0), aclaramiento (Cl), volumen de distribución del compartimento central (V_c), microconstantes de distribución entre el compartimento central (1) y periférico (2) de orden uno (K_{12} y K_{21}), y tres factores que modifican el aclaramiento en función de la dosis y el estado nutricional (DN). Además, en el Cuadro 5-9 se muestran los valores de AUC_{0-2h} obtenidos de acuerdo con el método trapezoidal para cada una de las dosis y condición nutricional ensayada.

61b: Modelo Bicompartimental intravenoso	
Parámetros	Valores (CV%)
Q ₀ (mg/h)	12,3 (20,0)
Cl (l/h)	0,28 (21,6)
V _c (l)	0,040 (13,6)
K ₁₂ (h ⁻¹)	1,7 (14,8)
K ₂₁ (h ⁻¹)	0,34 (33,6)
FCl ₁₀	1,43 (13,4)
FCl ₁₀₀	0,50 (15,7)
FCl _{DN}	0,94 (3,7)
VII (Variabilidad Interindividual)	
CV Q ₀	45,4 (51,5)
CVCl	16,3 (229,1)
CVV _c	59,8 (52,8)
CVK ₁₂	159,3 (50,8)
CVK ₂₁	2 (69,5)
VR (Variabilidad residual)	
VR	23,9 (18,7)
FMO	1734

Cuadro 5-8 Parámetros del modelo 61b obtenidos tras administración de taurina por vía intravenosa a los animales NN y DN a las dosis de 1, 10 y 100 mg.

Dosis (mg)	AUC _{0-2h} (mg*h/l)				$\frac{AUC_{DN}}{AUC_{NN}} \cdot 100$
	NN		DN		
	AUC media (DE)	AUC norm	AUC media (DE)	AUC norm	
1	3,7 (0,22)	1	4,4 (6,0)	1	118,9
10	27,0 (3,6)	7,3	31,3 (13,5)	7,1	115,9
100	674,0 (22,2)	182	997,1 (3,3)	226	147,9

Cuadro 5-9 Valores medios de área bajo la curva (AUC_{0-2h}), desviación estándar (DE), AUC_{0-2h} normalizadas para la dosis menor de las ensayadas (AUC norm) y cociente entre AUC obtenidas en animales NN (AUC_{NN})_{0-2h} y DN (AUC_{DN})_{0-2h}.

A continuación, se muestran las gráficas de bondad de ajuste (GOFP). La Figura 5-15 muestra las concentraciones plasmáticas de taurina en función del tiempo para los distintos grupos y las concentraciones individuales predichas por el modelo 61b para cada tiempo.

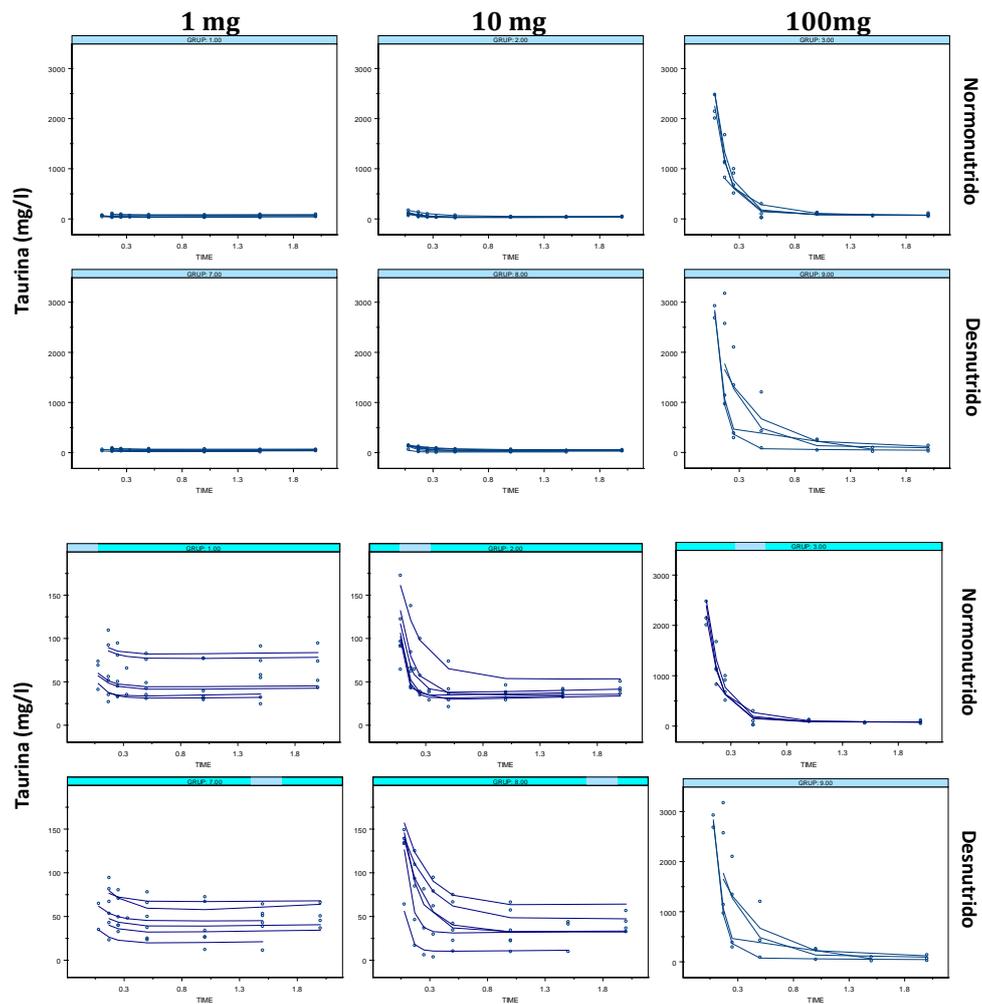


Figura 5-15 Representación gráfica de las concentraciones experimentales de taurina (mg/l, puntos) y de las concentraciones predichas individuales (mg/l, líneas) frente al tiempo (h) con la misma escala (figura superior) o con escala diferente para las concentraciones de 1 y 10 mg (figura inferior) tras la administración IV de taurina a las dosis de 1, 10 y 100 mg en animales NN y DN.

En la Figura 5-16 se muestran los valores de las concentraciones experimentales (Observed DV) frente a las concentraciones predichas individuales (IPRE DV) y poblacionales (Predicted DV) con la correspondiente línea identidad.

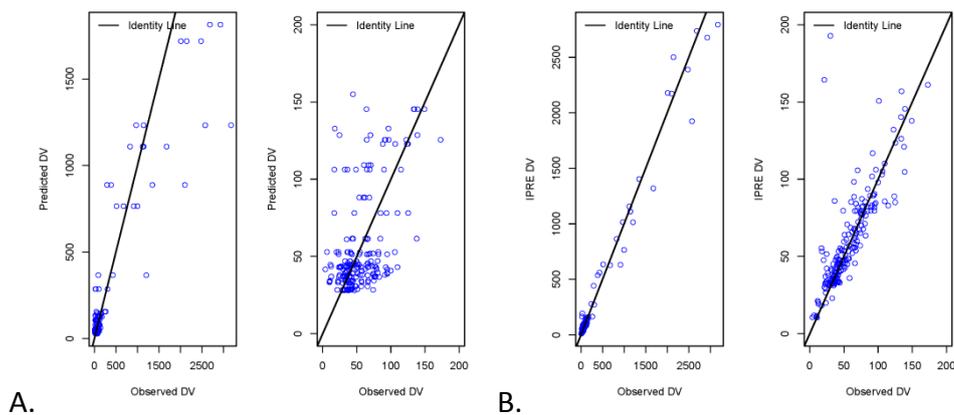


Figura 5-16 Representación gráfica de las concentraciones experimentales de taurina (Observed DV, mg/l) y las concentraciones predichas poblacionales (Predicted DV, “A”) y las concentraciones predichas individuales (IPRE DV, “B”) en el modelo 61b. Izquierda: todos los puntos, derecha: ampliación de la zona de mayor densidad de puntos. Línea negra: línea identidad.

En la Figura 5-17 se representan los residuales poblacionales (Residuals) y los residuales individuales (Individual Residuals) frente a las concentraciones poblacionales de taurina predichas por el modelo 61b (Predicted DV) y frente al tiempo (Time).

Se puede observar como las diferentes concentraciones experimentales obtenidas se ajustan a la concentración predicha poblacional, en general para todos los casos.

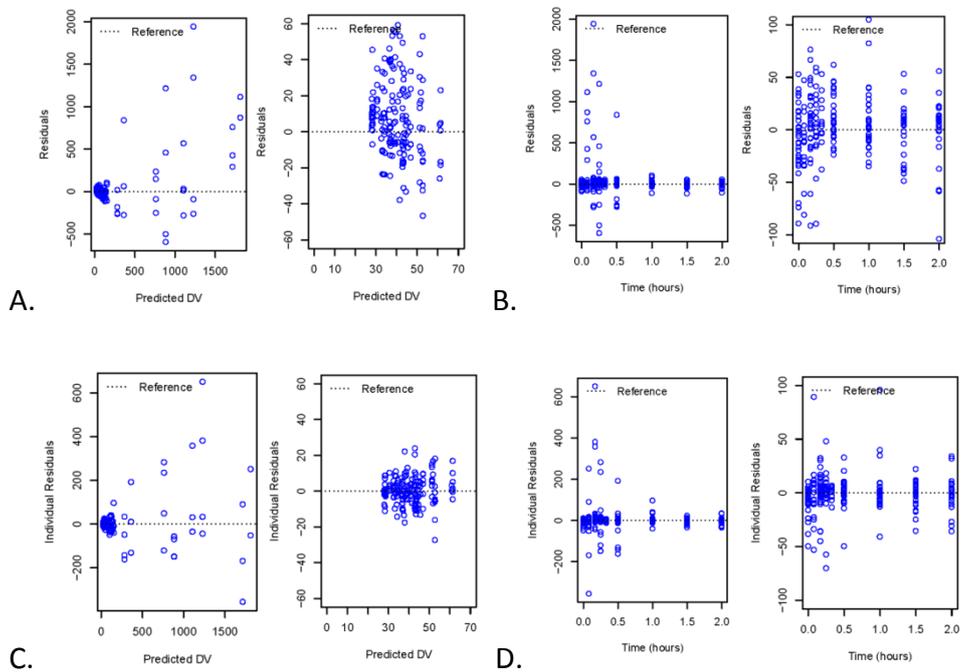


Figura 5-17 Representación gráfica de los residuales poblacionales (Residuals) frente a las concentraciones predichas (A) y el tiempo (B), y los residuales individuales (Individual Residuals) frente a las concentraciones predichas (C) y el tiempo (D) obtenidos tras el ajustado del modelo 61b. En la parte izquierda se representan todos los puntos, en la derecha aparece ampliada la zona de mayor densidad para apreciar la correlación. Línea negra: línea de referencia (reference).

En la Figura 5-18 se representan los residuales poblacionales e individuales ponderados (Weighted Residuals e Individual Weighted Residuals, respectivamente), junto con la línea identidad y la línea de tendencia “Smooth Spline”.

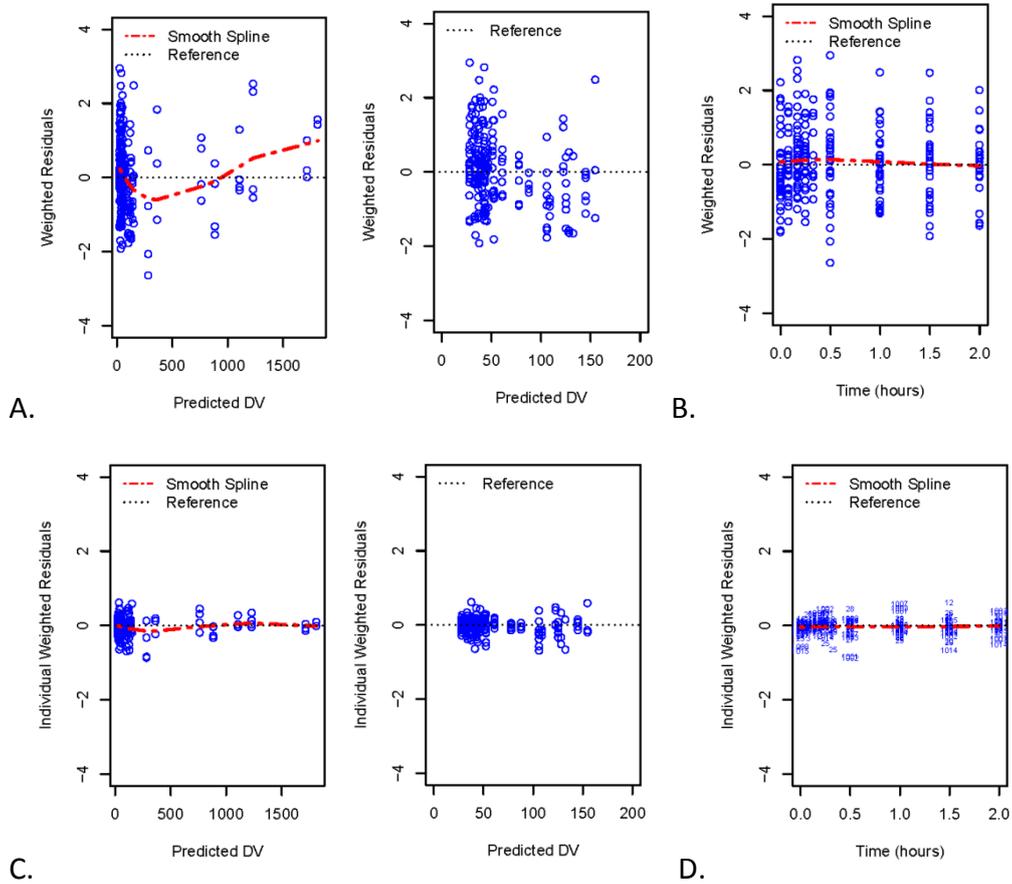


Figura 5-18 Representación gráfica de los residuales ponderados poblacionales (Weighted Residuals, superior) y residuales ponderados individuales (Individual Weighted Residuals, inferior) frente a la concentración predicha poblacional (A y C) y tiempo (B y D) obtenidos en el modelo 61b. En la parte izquierda las gráficas A y C se representan todos los puntos, en la derecha se representa ampliada la zona de mayor densidad para apreciar la correlación. Línea negra: línea de referencia (reference) Línea roja: línea de tendencia (Smooth spline).

5.5.2.2 Análisis mecanicista

Al igual que en la fase anterior, inicialmente se evaluaron los datos experimentales obtenidos para cada estado nutricional por separado. Se probaron diferentes modelos con aclaramiento no lineal combinando procesos de cinética lineal (filtración glomerular y reabsorción tubular pasiva) y cinética no lineal (secreción tubular activa y reabsorción tubular activa).

En el Cuadro 5-10 y el Cuadro 5-11 se muestran algunos de los modelos evaluados para los datos disponibles obtenidos en animales NN y DN respectivamente. En ellos, se describe el número de parámetros de efecto fijo (N PPK), número de parámetros de efecto aleatorio (N VII), así como los valores de la variabilidad residual (VR), coeficiente de variación (CV%) y FMO obtenidos tras el ajustado de los modelos indicados a los datos experimentales. En unos modelos la tasa de filtración glomerular (TFG) fue un parámetro a estimar y en otros se fijó su valor al referenciado en la bibliografía (0,86 ml/min x 100 g de peso equivalente a (0,00052 l/h/g)⁷². En ellos además de la filtración glomerular (TFG), se han implementado los procesos de secreción tubular activa (STA), y reabsorción tubular activa (RTA). Asimismo, se emplearon los parámetros farmacocinéticos velocidad máxima del proceso de secreción (VMs), constante de afinidad del proceso de secreción (KMs), velocidad máxima del proceso de reabsorción (VMr), y constante de afinidad del proceso de reabsorción (KMr) para describir la evolución en el tiempo de la concentración plasmática de taurina (CP, mg/l).

NN					
Modelo	Características	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO
84NNb	TFG fijada + STA + RTA TFG fijada, en función del peso $VEL=(0,00052 \cdot PesF+(VMs/(KMs+CP))-(VMr/(KMr+CP))) \cdot CP$	8	6	21,1	888
84NN	TFG + STA + RTA TFG estimada $VEL=(TFG+(VMs/(KMs+CP))-(VMr/(KMr+CP))) \cdot CP$	9	6	19,2	889
85NN	STA + RTA, TFG estimada $VEL=((VMs/(KMs+CP))-(VMr/(KMr+CP))) \cdot CP$	8	6	23,1	918
86NN	TFG + RTA, TFG estimada $VEL=(TFG-(VMr/(KMr+CP))) \cdot CP$	7	6	21,5	889

Cuadro 5-10 Modelos mecanicistas evaluados tras la administración intravenosa de taurina en animales NN. PesF: valor del peso final (g).

DN					
Modelo	Características	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO
84DNb	TFG fijada+ STA + RTA TFG fijada en función del peso $VEL=(0,00052 \cdot PesF+(VMs/(KMs+CP))-(VMr/(KMr+CP))) \cdot CP$	8	6	24,1	869
84DN	TFG + STA + RTA TFG estimada en función del peso $VEL=(TFG \cdot PesF+(VMs/(KMs+CP))-(VMr/(KMr+CP))) \cdot CP$	9	6	24,0	873
85DN	STA + RTA $VEL=((VMs/(KMs+CP))-(VMr/(KMr+CP))) \cdot CP$	8	6	32,1	889
86DN	TFG + RTA, TFG estimada $VEL=(TFG-(VMr/(KMr+CP))) \cdot CP$	7	6	29,4 (44,9)	956

Cuadro 5-11 Modelos mecanicistas evaluados tras la administración intravenosa de taurina en animales DN. PesF: valor del peso final (g). PesF: valor del peso final (g).

De los modelos probados utilizando la población NN y DN, con diferentes combinaciones de los mecanismos de eliminación, se muestran los que consiguieron unos parámetros satisfactorios y una convergencia aceptable desde el punto de vista fisiológico (Cuadro 5-12).

NN y DN					
Modelo	Características	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO
62c	TFG + STA + RTA TFG fijada, en función del peso	8	6	25,5 (22,7)	1772
	$VEL=(0,00052*PesF+(VMs/(KMs+CP))-(VMr/(KMr+CP)))*CP$				
75c	TFG + STA + RTA TFG estimada, en función del peso	9	6	22,5 (22,0)	1758
	$VEL=(TFG*PesF+(VMs/(KMs+CP))-(VMr/(KMr+CP)))*CP$				
73	TFG + STA + RTA TFG estimada	9	6	22,3 (20,4)	1757
	$VEL=(TFG+(VMs/(KMs+CP))-(VMr/(KMr+CP)))*CP$				
92	TFG + RTA TFG estimada	7	5	24,1	1791
	$VEL=(TFG-(VMr/(KMr+CP)))*CP$				
92b	TFG + RTA TFG estimada, en función del peso	7	5	24,4	1786
	$VEL=(TFG*PesF-(VMr/(KMr+CP)))*CP$				
79	STA + RTA $VEL=((VMs/(KMs+CP))-(VMr/(KMr+CP)))*CP$	8	6	22,7 (18,0)	1758

Cuadro 5-12 Modelos mecanicistas evaluados tras la administración intravenosa de taurina en animales NN y DN. PesF: valor del peso final (g). PesF: valor del peso final (g).

Entre los modelos ensayados se seleccionó el modelo 79. En las Figuras 5-19 a 5-22 se muestran los gráficos de bondad de ajuste correspondientes al modelo seleccionado.

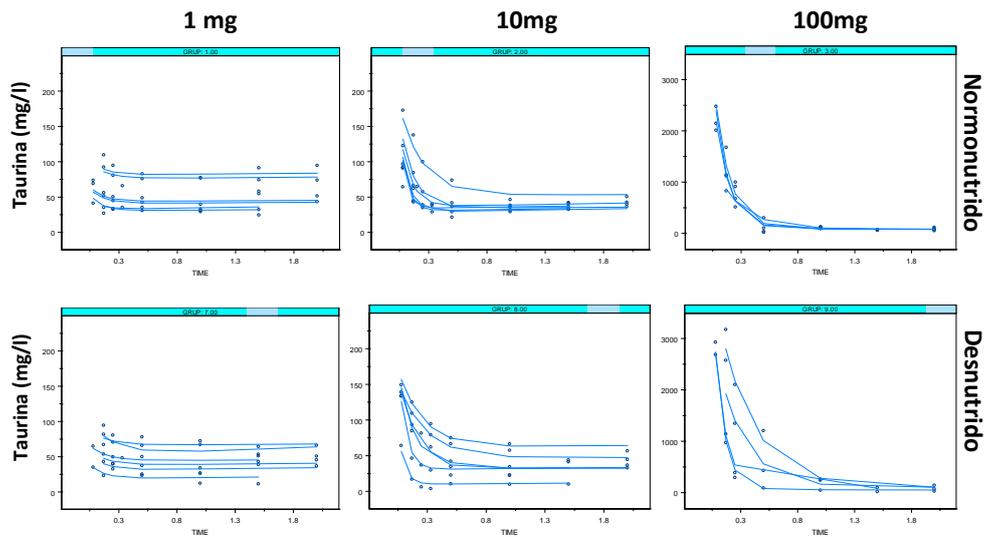


Figura 5-19 Representación gráfica de las concentraciones experimentales de taurina (mg/l, puntos) frente al tiempo (h) y de las concentraciones predichas individuales predichas por el modelo 79 (mg/l, líneas) frente al tiempo (h) tras la administración IV de 1, 10 y 100 mg. Parte superior: animales NN, parte inferior: animales DN. Escala diferente para la concentración de 100 mg.

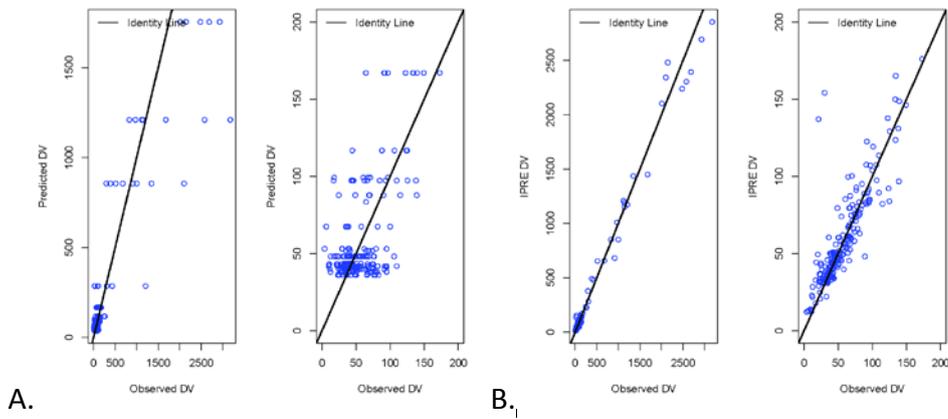


Figura 5-20 Representación gráfica de las concentraciones experimentales de taurina (Observed DV, mg/l) y las concentraciones predichas poblacionales (Predicted DV, "A") y las concentraciones predichas individuales (IPRE DV, "B") en el modelo 79. Izquierda: todos los puntos, derecha: ampliación de la zona de mayor densidad de puntos. Línea negra: línea identidad.

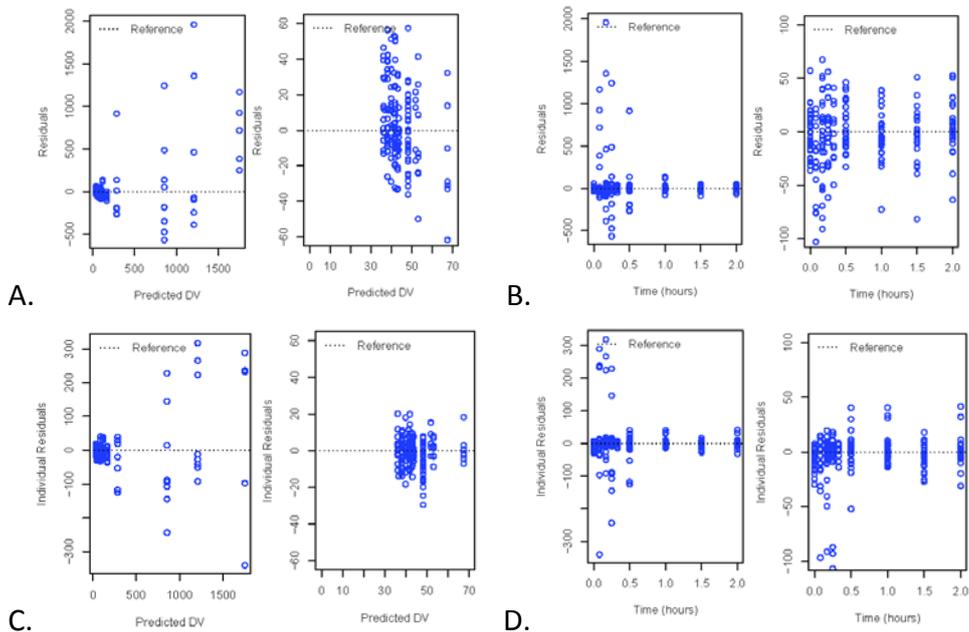


Figura 5-21 Representación gráfica de los residuos poblacionales (Residuals) frente a las concentraciones predichas (A) y el tiempo (B), y los residuos ponderados

(Weighted Residuals) frente a las concentraciones predichas (C) y el tiempo (D) obtenidos tras el ajustado del modelo 79. En la parte izquierda se representan todos los puntos, en la derecha aparece ampliada la zona de mayor densidad para apreciar la correlación. Línea negra: línea de referencia (reference). Línea roja: línea de tendencia (Smooth spline).

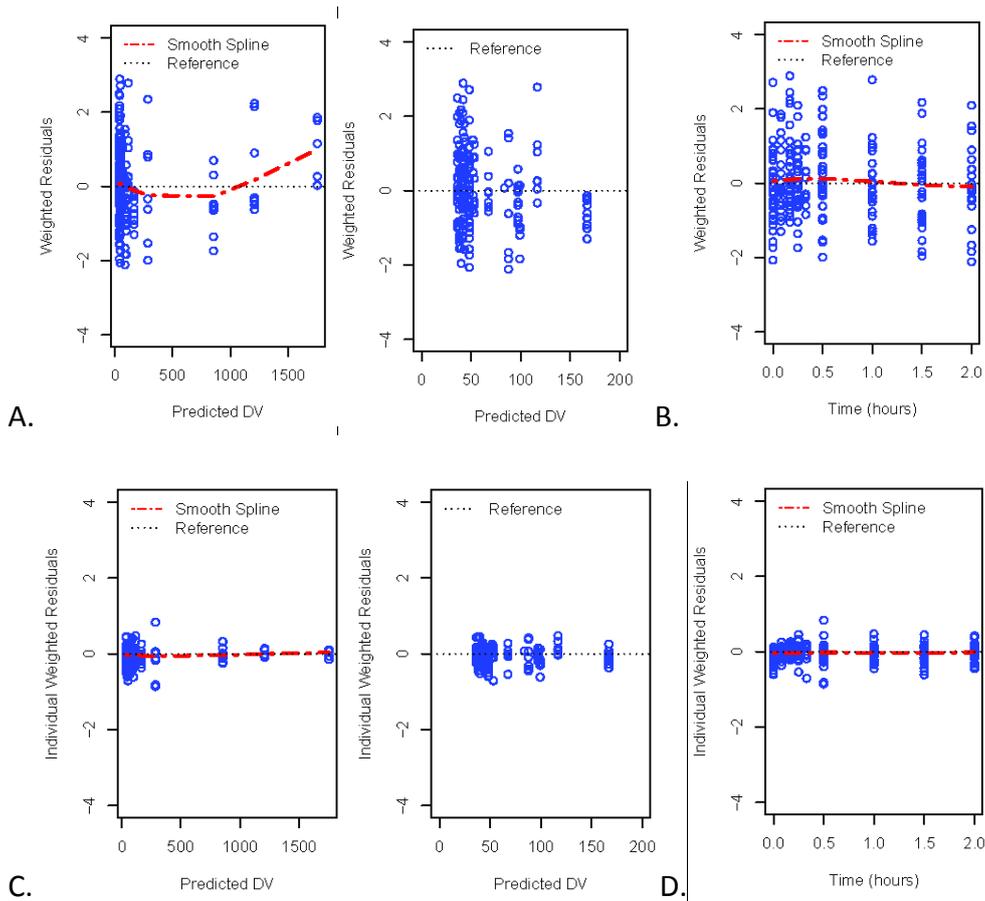


Figura 5-22 Representación gráfica de los residuales ponderados poblacionales (Weighted Residuals, superior) y residuales ponderados individuales (Individual Weighted Residuals, inferior) frente a la concentración predicha poblacional (A y C) y tiempo (B y D) obtenidos en el modelo 79. Gráficas A y C: Izquierda, todos los puntos, derecha: la zona de mayor densidad ampliada para apreciar la correlación. Línea negra: línea de referencia (reference) Línea roja: línea de tendencia (Smooth spline).

La influencia del estado nutricional de los animales en el proceso de disposición de la taurina se evaluó mediante el diseño de modelos en los que se utilizó un factor empírico (F) que permite calcular la magnitud del cambio en el parámetro evaluado que puede atribuirse al estado nutricional de los animales.

Así, tomando el modelo 79 como base, se diseñaron 14 modelos que incorporaron uno o varios factores que permitieran cuantificar los cambios en los parámetros farmacocinéticos (V_{ms} , K_{ms} , V_{mr} y/o K_{mr}) debidos al estado de desnutrición de los animales. En el Cuadro 5-13 se muestran los modelos evaluados, con el correspondiente número de parámetros de efecto fijo (N PPK), número de parámetros de efecto aleatorio (N VII); valores de la variabilidad residual (VR), coeficiente de variación (CV%) y función mínima objetivo (FMO).

Modelo	Factor	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO
79	-	8	6	22,7 (18,0)	1758
117	FVms _{DN}	9	6	22,4 (19,9)	1754
118	FVmr _{DN}	9	6	22,5 (17,3)	1755
119	FKms _{DN}	9	6	22,6 (17,7)	1757
120	FKmr _{DN}	9	6	22,6	1757
81	FVms _{DN} , Vmr _{DN}	10	6	23,9 (15,8)	1749
121	FVms _{DN} , FKms _{DN}	10	6	22,9	1765
122	FVms _{DN} , FKmr _{DN}	10	6	41,1	1797
123	FVmr _{DN} , FKms _{DN}	10	6	terminated	
124	FVmr _{DN} , FKmr _{DN}	10	6	20,4 (18,6)	1748
125	FKms _{DN} , FKmr _{DN}	10	6	21,0 (20,0)	1742
126	FVms _{DN} , FVmr _{DN} , FKms _{DN}	11	6	21,5	1741
127	FVms _{DN} , FVmr _{DN} , FKmr _{DN}	11	6	22,5	1743
128	FVmr _{DN} , FKms _{DN} , FKmr _{DN}	11	6	23,1	1742
129	FVms _{DN} , FKms _{DN} , FKmr _{DN}	11	6	23,1	1744
80b	FVms _{DN} , FVmr _{DN} , FKms _{DN} , FKmr _{DN}	12	6	21,2	1735

Cuadro 5-13 Modelos ensayados para evaluar la influencia del estado nutricional de los animales NN y DN en el proceso de disposición de la taurina.

Puesto que los valores de la FMO, variabilidad residual, variabilidad interindividual y de los coeficientes de variación de los parámetros estimados no permitieron realizar una discriminación de los modelos con una base estadística sólida, la selección del modelo se realizó tras la evaluación de la estabilidad mediante el procedimiento *bootstrap*.

Los resultados obtenidos tras realizar la técnica de *bootstrap* con los modelos anteriores permitieron seleccionar el modelo 117 como el modelo que mejor satisface los datos experimentales disponibles, ya que se obtuvo un 68,4% de minimizaciones con éxito y los valores de los parámetros farmacocinético estimados así como el de sus variabilidades estaban incluidos en el intervalo de confianza del 95% (IC 95%). En este modelo, el único parámetro que se modifica debido al estado nutricional de los animales es la capacidad del proceso de reabsorción tubular activa. Los valores de los parámetros proporcionados por el modelo se muestran en el Cuadro 5-14.

Parámetro farmacocinético	Base de datos original		Replicados Bootstrap		
	Estimación	CV%	Promedio ^a	CV%	IC 95%
Modelo farmacocinético estructural					
Q₀	13,7	36,0	15,3	27,2	9,16-24,5
V_c	0,0418	17,5	0,0418	18,3	0,03-0,06
K₁₂	2,61	44,8	2,50	36,0	0,56-4,21
K₂₁	0,730	48,1	0,960	80,1	0,20-4,13
V_{ms}	192	56,3	493	64,7	113-992
K_{ms}	399	110	660	91,1	109-2139
V_{mr}	16,9	457	540,9	166,9	0,88-3139
K_{mr}	96,1	190	1730,2	205,4	5,85-9900
FV_{ms}	0,906	15,1	0,94	11,4	0,72-1,16
Variabilidad interindividual					
VII_{Q0}	25,7	104	20,3	68,8	0,400-92,8
VII_{Vc}	50,6	52,7	49,3	5,48	0,141-92,8
VII_{K12}	120,4	38,7	269	29,2	0,400-425
VII_{K21}	93,4	293	440	84,9	0,400-883
VII_{Vms}	17,1	285	11,3	5,93	0,141-33,6
Variabilidad Residual					
σ	22,4	19,9	21,48	11,1	16,7-25,9

Cuadro 5-14 Parámetros farmacocinéticos de taurina obtenidos con la base de datos de animales NN y DN con el modelo 117. ^a Valor medio de la estimación de los parámetros de 684 réplicas bootstrap con minimización con éxito.

5.5.3 Modelización global de los datos

Una vez realizada la modelización de la fase de disposición se procedió a modelizar la fase de absorción del aminoácido. En primer lugar se realizó la modelización empírica y seguidamente mecanicista.

5.5.3.1 Análisis empírico

Se incorporan los datos de taurina obtenidos tras la administración oral (grupos 4, 5, 6, 10, 11 y 12) a los datos obtenidos tras la administración del aminoácido por vía intravenosa (grupos 1, 2, 3, 7, 8, y 9). En esta fase los parámetros farmacocinéticos de disposición se fijaron a los obtenidos en el modelo empírico anterior (modelo 61b) y se estimaron los parámetros característicos de la fase de absorción. Se probaron modelos de absorción lineal y no lineal tanto en datos obtenidos en animales NN como en los obtenidos en animales DN, así como modelos con estimación de la biodisponibilidad oral del aminoácido.

Los modelos farmacocinéticos en los que la biodisponibilidad oral fue iterada, obtuvieron como resultado una biodisponibilidad igual a la unidad, por lo que se asumió una biodisponibilidad oral completa.

Algunos de los modelos probados se muestran a continuación. En la primera aproximación se realizaron los ajustes separando los datos obtenidos por estado nutricional, para continuar con el análisis de los datos de forma conjunta. En los Cuadros 5-15 y 5-16 se resumen los modelos probados para animales NN y DN, respectivamente, mostrando el número de parámetros de efecto fijo (N PPK) y de parámetros de efecto aleatorio

(N VII); valores de la variabilidad residual (VR), coeficiente de variación (CV%) y función mínima objetivo (FMO).

NN, IV y Orales					
Modelo	Descripción	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO
132bNN1	Kap	1 (9)	2 (7)	24,8 (10,8)	2594
133NNc	FKap en función de la Dosis ($K_{ap_{D1}}$, $F_{Ka_{D10}}$ y $F_{Ka_{D100}}$)	3 (11)	2 (7)	24,9 (10,8)	2593
133bNN1	FKap en función de la Dosis ($K_{ap_{D1_D10}}$ y $F_{Ka_{D100}}$)	2 (10)	2 (7)	24,8 (10,9)	2594
133NNd	FKap en función de la Dosis ($K_{ap_{D10_D100}}$ y $F_{Ka_{D1}}$)	2 (10)	2 (7)	24,9	2593

Cuadro 5-15 Modelos empíricos evaluados tras la administración oral e intravenosa de taurina en animales NN. Kap: constante de velocidad de absorción aparente. FKap: factor que modifica a Kap.

DN, IV y Orales					
Modelo	Descripción	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO
132bDN1	Kap	1 (9)	2 (7)	24,0 (21,9)	2610
133DNc	FKap en función de la Dosis (Kap_{D1} , FKa_{D10} y FKa_{D100})	3 (11)	2 (7)	24,0	2606
133bDN1	FKap en función de la Dosis (Kap_{D1_D10} y FKa_{D100})	2 (10)	2 (7)	23,9 (11,7)	2606
133DNd	FKap en función de la Dosis (Kap_{D10_D100} y FKa_{D1})	2 (10)	2 (7)	24,1	2610

Cuadro 5-16 Modelos empíricos evaluados tras la administración oral e intravenosa de taurina en animales DN Kap: constante de velocidad de absorción aparente. FKap: factor que modifica a Kap.

De acuerdo con los valores de la FMO y de la variabilidad residual, en animales NN el modelo que mejor describe los datos es el más sencillo (modelo 132bNN1), en el que la constante aparente de velocidad de absorción (Kap) es independiente de dosis inicial administrada. En cambio en animales DN el modelo que mejor describe los datos es aquél en el que la Kap disminuye alrededor de un 50% al administrar la dosis más elevada (100 mg) respecto a la Kap que se obtiene en dosis inferiores (1 y 10 mg, modelo 133bDN1).

Posteriormente se realizaron los ajustes utilizando de forma conjunta los datos obtenidos en animales NN y DN. Los modelos evaluados se muestran a continuación (Cuadro 5-17).

NN y DN, IV y Oral					
Modelo	Factor	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO
132	-	1 (9)	2 (7)	24,7 (10,2)	3470
134	FKap _{DN}	2 (10)	2 (7)	27,7 (10,4)	3470
133	FKap ₁₀ FKap _{D100}	3 (11)	2 (7)	24,8 (9,9)	3467
135	FKap _{D10} FKap _{D100} FKap _{DN}	4 (12)	3 (7)	24,8 (10,0)	3467
139_1	FKap _{DND100}	2 (10)	2 (7)	24,7 (10,1)	3467

Cuadro 5-17 Modelos empíricos evaluados tras la administración oral e intravenosa de taurina en animales NN y DN. Kap: constante de velocidad de absorción aparente. FKap: factor que modifica a Kap.

En estos modelos se evidencia la tendencia observada en la modelización de datos obtenidos en animales DN, en los que la constante de absorción aparente Kap disminuye al administrar la D=100 mg de taurina. No obstante, la $\Delta FMO < 3,8$ indica que las diferencias no son estadísticamente significativas.

5.5.3.2 Análisis mecanicista

Se fijaron los parámetros farmacocinéticos de disposición a los obtenidos en el modelo 117 (administración de taurina por vía IV), y se realiza la modelización del proceso de absorción oral de acuerdo con una cinética de primer orden (proceso pasivo), cinética de Michaelis-Menten (proceso activo) o cinética combinada (primer orden y de Michaelis-Menten). En el primer paso se realizó de forma independiente para animales NN y DN.

El modelo que mejor describe los datos en animales NN como DN es el que caracteriza el proceso de absorción como pasivo. Como en ocasiones anteriores, en los Cuadros 5-18 y 5-19 se resumen los modelos empleados para animales NN y DN, respectivamente, mostrando el número de parámetros de efecto fijo (N PPK) y de parámetros de efecto aleatorio (N VII); valores de la variabilidad residual (VR), coeficiente de variación (CV%) y función mínima objetivo (FMO).

NN IV y Oral					
Modelo	Cinética de absorción	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO
150bNN	Pasiva	1 (10)	2 (7)	22,6 (11,8)	2608
151bNN	Activa	2(11)	3 (8)	22,9 (12,7)	2605
152bNN	Combinada, pasiva y activa	3 (12)	4 (9)	22,3	2605

Cuadro 5-18 Modelos mecanicistas evaluados tras la administración oral e intravenosa de taurina en animales NN.

DN IV y Oral					
Modelo	Cinética de absorción	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO
150bDN	Pasiva	1 (10)	2 (7)	22,1 (12,5)	2615
151bDN	Activa	2(11)	3 (8)	22,1 (13,0)	2615
152bDN	Combinada, pasiva y activa	3 (12)	4 (9)	22,1	2615

Cuadro 5-19 Modelos mecanicistas evaluados tras la administración oral e intravenosa de taurina en animales DN.

Algunos de los modelos probados con los datos de los animales NN y DN así como el número de parámetros, la variabilidad residual y la FMO se muestran en el Cuadro 5-20.

NN y DN, IV y Oral					
Modelo	Cinética de absorción	N PPK	N VII	VR (VC%)	FMO
150b	Pasiva	1 (10)	2 (7)	22,4 (10,0)	3471
151b	Activa	2(11)	3 (8)	22,2 (11,2)	3469
152b	Combinada, pasiva y activa	3 (12)	4 (9)	22,2	3469
153b	Pasiva, Ka diferente en DN (FKa_{DN})	2 (11)	2 (7)	22,4	3469

Cuadro 5-20 Modelos mecanicistas evaluados tras la administración oral e intravenosa de taurina en animales NN y DN.

En el Cuadro 5-21 se presentan los parámetros de efecto fijo y de efecto aleatorio obtenidos en el modelo seleccionado (modelo 150b). Las Figuras 5-23 a 5-26 reproducen las gráficas de bondad de ajuste del modelo seleccionado y en el Anexo 8.2 se muestra el archivo control.

Modelo 150b	
Parámetros	Valores (CV%)
Q_0 (mg/h)	13,70 (36,0) fix
V_c (l)	0,0416 (17,5) fix
K_{12} (h^{-1})	2,61 (44,8) fix
K_{21} (h^{-1})	0,73 (48,1) fix
V_{ms} ($mg/l \cdot h^{-1}$)	192,0 (56,3) fix
K_{ms} (mg/l)	399,0 (110,1) fix
V_{mr} ($mg/l \cdot h^{-1}$)	16,90 (457,4) fix
K_{mr} (mg/l)	96,10 (190,4) fix
$FV_{ms_{DN}}$	0,906 (15,1) fix
K_a (h^{-1})	1,19 (18,2)
VII (Variabilidad Interindividual)	
CVQ_0	25,7 (104,4) fix
CVV_c	50,6 (52,7) fix
CVK_{12}	120,4 (38,7) fix
CVK_{21}	93,4 (293,2) fix
CVV_{ms}	17,1 (284,9) fix
CVK_a	69,6 (42,3)
VR (Variabilidad residual)	
VR	22,36 (10,0)
FMO	3471,4

Cuadro 5-21 Características del modelo mecanicista 150b. Q_0 : velocidad de incorporación de taurina al torrente sanguíneo, V_c : volumen central, K_{12} y K_{21} : microconstantes de distribución entre el compartimento central (1) y periférico (2), V_{ms} y V_{mr} : velocidad máxima de secreción (V_{ms}) y reabsorción (V_{mr}) del proceso de eliminación, K_{ms} y K_{mr} : constante de afinidad de Michaelis Menten del proceso de secreción (K_{ms}) y de reabsorción (K_{mr}) del proceso de eliminación, FV_{ms} : factor que modifica la V_{ms} en estado de desnutrición, K_a : velocidad de absorción de orden uno.

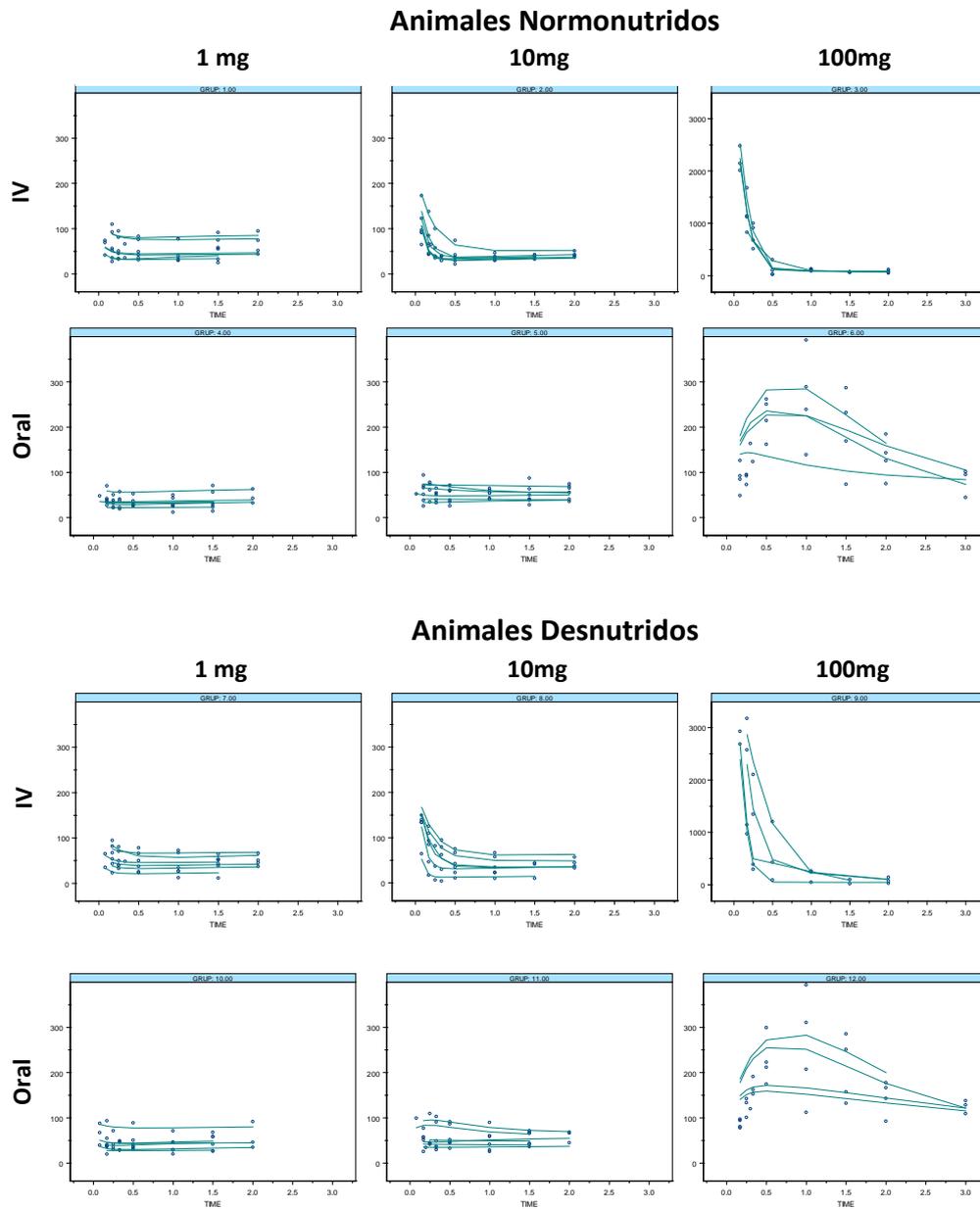
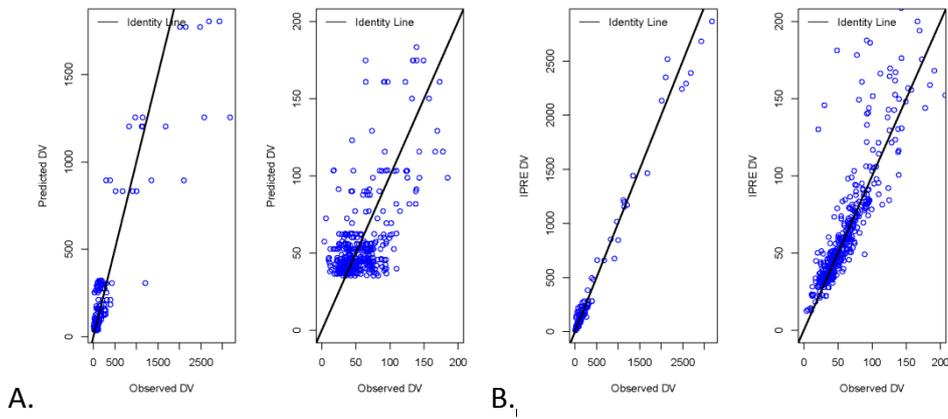
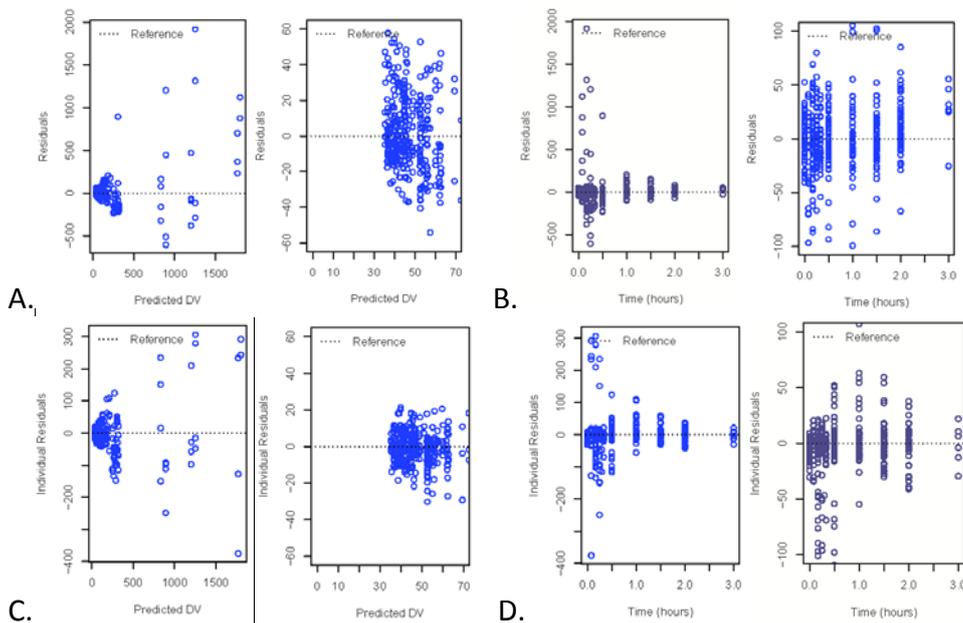


Figura 5-23 Representación gráfica de las concentraciones experimentales de taurina (mg/l, puntos) frente al tiempo (h) y de las concentraciones predichas individuales (mg/l, líneas) frente al tiempo (h) tras la administración IV y Oral de 1, 10 y 100 mg de taurina. Escala diferente para la concentraciones de 100 mg.



A. B.
Figura 5-24 Representación gráfica de las concentraciones experimentales de taurina (Observed DV, mg/l) y las concentraciones predichas poblacionales (Predicted DV, "A") y las concentraciones predichas individuales (IPRE DV, "B") en el modelo 150b. Izquierda: todos los puntos, derecha: ampliación de la zona de mayor densidad de puntos. Línea negra: línea identidad.



A. B. C. D.
Figura 5-25 Representación gráfica de los residuos poblacionales (Residuals) frente a las concentraciones predichas (A) y el tiempo (B), y los residuos individuales (Individual Residuals) frente a las concentraciones predichas (C) y el tiempo (D)

obtenidos tras el ajustado del modelo 150b. Izquierda: todos los puntos; Derecha: ampliación de la zona de mayor densidad. Línea negra: línea de referencia (reference).

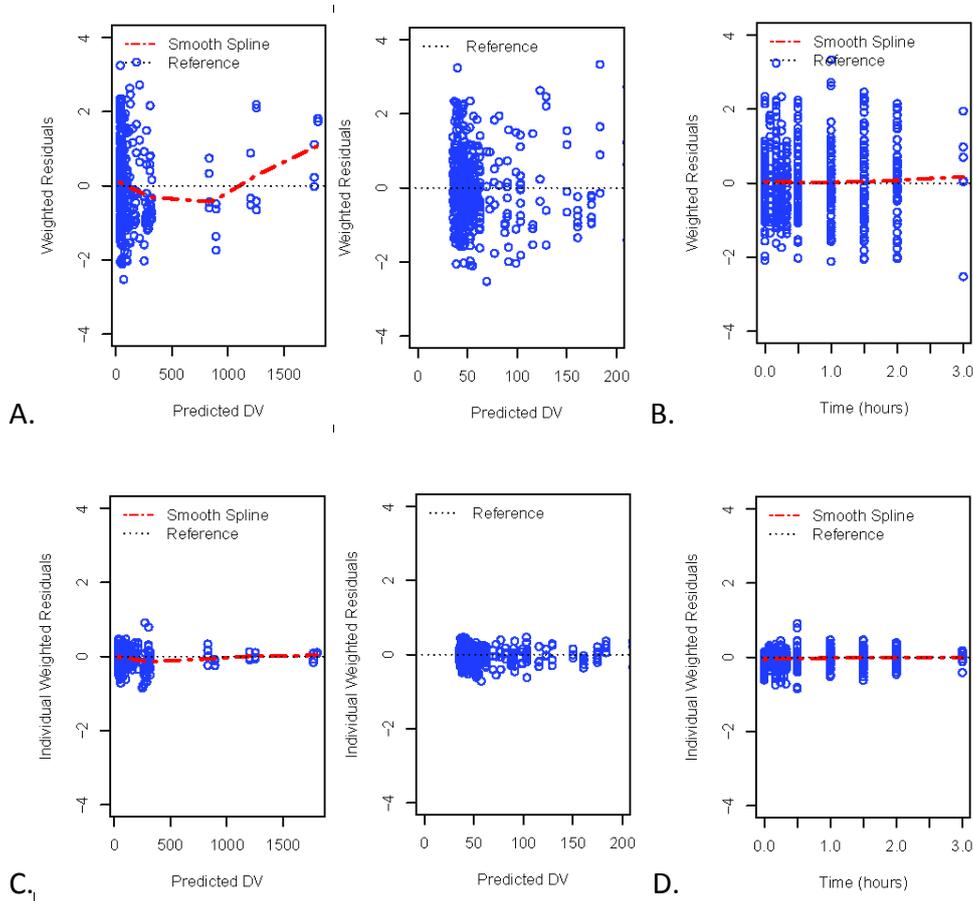


Figura 5-26 Representación gráfica de los residuales ponderados poblacionales (Weighted Residuals, superior) y residuales ponderados individuales (Individual Weighted Residuals, inferior) frente a la concentración predicha poblacional (A y C) y tiempo (B y D) obtenidos en el modelo final 150b. Gráficas A y C; parte izquierda: todos los puntos, parte derecha: ampliación de la zona de mayor densidad. Línea negra: línea de referencia (reference) Línea roja: línea de tendencia (Smooth spline).

La estabilidad del modelo final se ha evaluado mediante el método *bootstrap*. Los resultados se han resumido y se presentan en Cuadro 5-22.

Se han realizado 1000 replicados y se ha obtenido un ajustado satisfactorio del 81,1%.

Parámetro farmacocinético	Base de datos original		Replicados Bootstrap		
	Estimación	CV%	Promedio ^a	CV%	IC 95%
Modelo farmacocinético estructural					
Q₀	13,7	36,0	14,4	29,0	9,21-23,8
V_c	0,0416	17,5	0,0462	14,9	0,036-0,061
K₁₂	2,61	44,8	2,32	27,2	1,15-3,47
K₂₁	0,73	48,1	0,893	45,5	0,314-1,74
V_{ms}	192,0	56,3	331	89,5	78,1-1041
K_{ms}	399	110	780	121	75,8-3391
V_{mr}	16,9	457	89,1	228	0,268-786
K_{mr}	96,1	190	266	509	1,91-1808
FV_{ms}	0,906	15,1	0,950	6,51	0,823-1,06
K_a	1,19	18,2	0,969	23,4	0,575-1,45
Variabilidad interindividual					
VII_{Q0}	25,7	104	20,5	51,1	0,257-35,2
VII_{Vc}	50,6	52,7	66,4	28,7	31,9-98,5
VII_{K12}	120,4	38,7	101	37,1	55,3-156
VII_{K21}	93,4	293	109	118	0,934-326
VII_{Vms}	17,1	285	11,7	86,1	0,171-30,7
VII_{Ka}	69,6	42,3	29,7	108	0,600-82,1
Variabilidad Residual					
σ	22,4	10,0	21,5	6,50	18,8-24,2

Cuadro 5-22 Parámetros farmacocinéticos de taurina obtenidos con la base de datos original y aplicando el método de bootstrap al modelo 150b. ^a Valor medio de la estimación de los parámetros de 811 réplicas bootstrap con minimización con éxito.

Además se ha realizado una validación externa aplicando el modelo farmacocinético final seleccionado para predecir las concentraciones plasmáticas de taurina. A partir de los parámetros farmacocinéticos

poblacionales de taurina obtenidos en esta Memoria de tesis Doctoral se simularon valores de concentración plasmática-tiempo para una dosis de taurina equivalente a la administrada en los preparados enterales. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura 5-27.

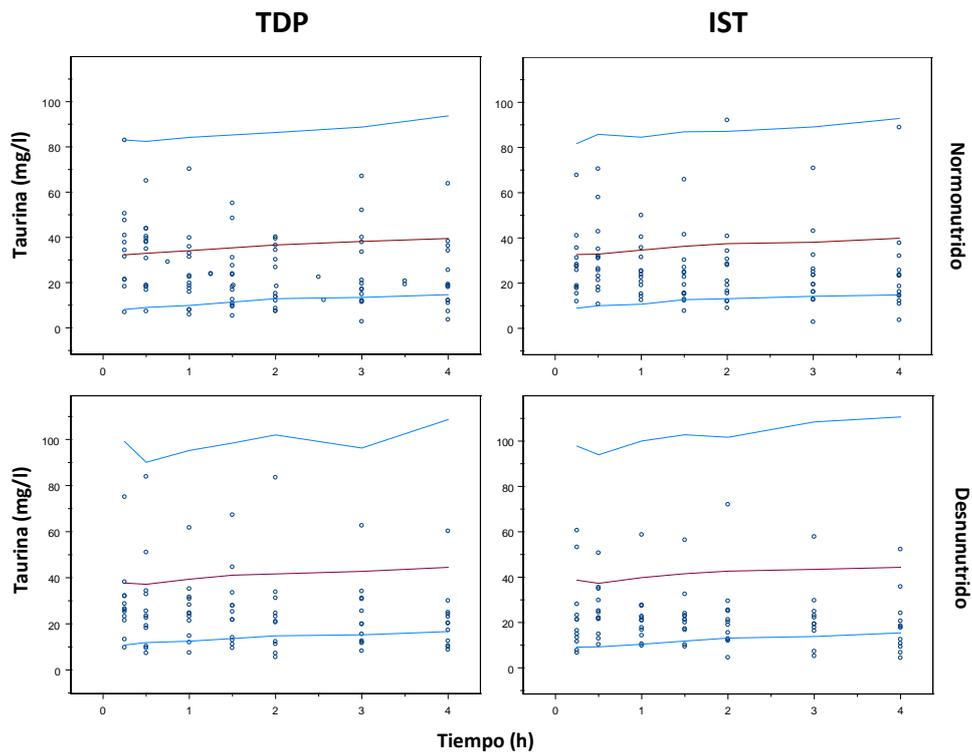


Figura 5-27. Valores experimentales de concentración plasmática tiempo tras la administración de los preparados enterales (puntos) así como la media (línea roja) y los intervalos de confianza del 95% (IC 95%, líneas azules) obtenidas tras la simulación de las concentraciones plasmáticas de 100 poblaciones utilizando el modelo farmacocinético poblacional seleccionado en la primera parte de esta Memoria.

En la Figura 5-28 se muestra el mismo ejercicio de simulación realizado al modificar el parámetro Q_0 , velocidad de incorporación de taurina endógena al torrente sanguíneo (mg/h). En este caso, este parámetro se fijó a un valor que representa el 50% del obtenido en el

modelo farmacocinético poblacional, ya que el valor medio de la concentración plasmática basal del aminoácido obtenida en los animales empleados para evaluar el aporte de taurina administrada en los preparados enterales fue inferior al valor obtenido en los animales empleados para el análisis farmacocinético de taurina administrada en solución.

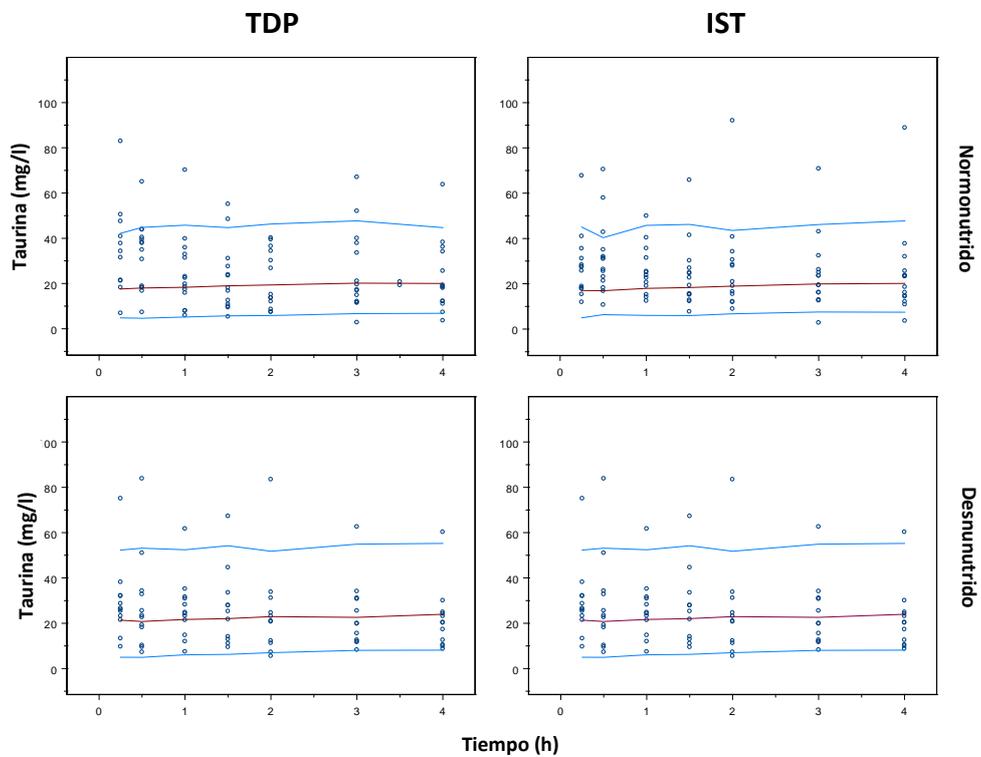


Figura 5-28 Valores experimentales de concentración plasmática tiempo obtenidos tras la administración de los preparados enterales (puntos) así como la media (línea roja) y los intervalos de confianza del 95% (IC 95%, líneas azules) obtenidas tras la simulación las concentraciones plasmáticas de 100 poblaciones a partir del modelo farmacocinético poblacional de taurina seleccionado en la primera parte de esta Memoria.

5.6 Preparados enterales: Curvas concentración plasmática de taurina vs tiempo

5.6.1 Administración de dosis única

En la Figura 5-29 se representan las concentraciones plasmáticas individuales de taurina expresadas en mg/l frente al tiempo de muestreo obtenidas tras la administración de agua, de la dieta T-Diet Plus® (TDP, problema) y de la dieta Isosource-ST® (IST, referencia) a los animales NN y DN.

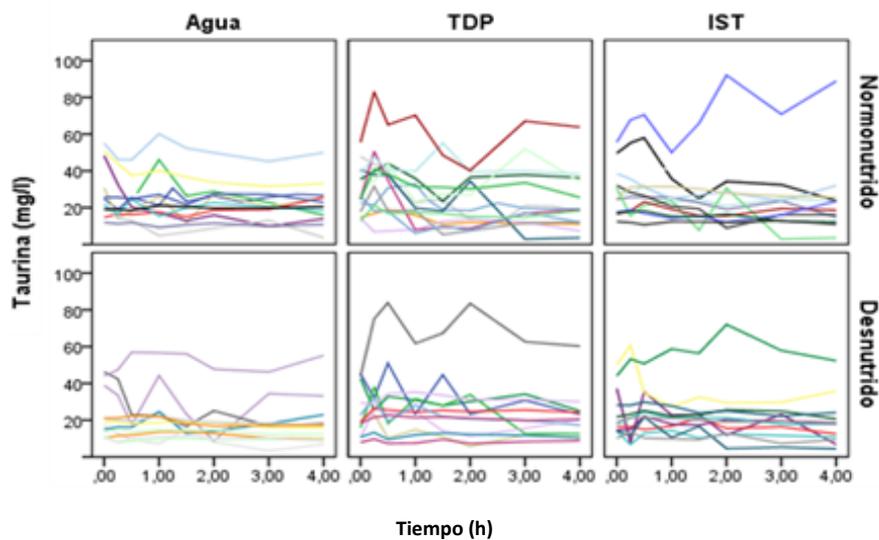


Figura 5-29. Concentraciones plasmáticas individuales de taurina frente a los tiempos de toma de muestra obtenidas tras la administración de agua y las dietas TDP e IST a los animales NN y DN en régimen de dosis única.

La concentración plasmática basal de taurina obtenida en animales NN y DN fue de $30,23 \pm 13,49$ mg/l (CV%= 44,92%, IC90%: 26,6 - 33,8) y $23,29 \pm 12,83$ (CV%= 55,09%, IC90%: 19,8 - 27,0) respectivamente.

La prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov realizada con las concentraciones plasmáticas basales de taurina obtenidas en animales NN y DN determinó que la distribución de estos valores no es normal, por lo que para realizar el análisis estadístico se empleó la prueba de comparación no paramétrica U de Mann Whitney. Esta prueba estadística indicó que existen diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$).

En la Figura 5-30 se representan los diagramas de cajas con el valor de las medianas de las concentraciones plasmáticas de taurina obtenidas para cada tiempo de toma de muestra en cada una de las condiciones ensayadas. Como puede apreciarse, el valor de la mediana de las concentraciones plasmáticas del aminoácido sufre pequeñas oscilaciones durante el tiempo de toma de muestras y en todos los casos la dispersión de los valores es elevada.

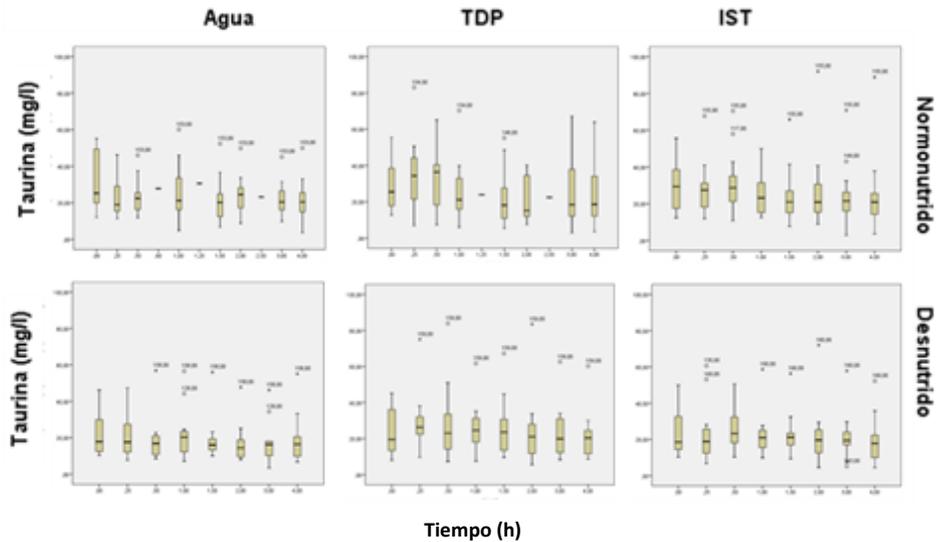


Figura 5-30. Diagrama de cajas de la concentración plasmática de taurina versus tiempo, obtenidas tras la administración de agua y las dietas TDP e IST a los animales NN y DN en régimen de dosis única. Puntos: Outlier o valor atípico seleccionado por el programa SPSS.

En la Figura 5-31 se exponen los valores medios de las concentraciones plasmáticas de taurina obtenidas a los diferentes tiempos de muestreo tras la administración de los preparados enterales ensayados y de agua en los grupos NN y DN. En la figura también se muestra el intervalo de confianza 95% y se puede observar que en ambos estados nutricionales la variabilidad de las concentraciones plasmáticas es elevada. En estado de NN la evolución de la concentración plasmática media de taurina tras la administración de los preparados enterales se solapa con la evolución de las concentraciones plasmáticas del aminoácido en el grupo control (administración de agua); en cambio, en estado de DN, la evolución temporal de la concentración plasmática media de taurina tras la administración de los preparados enterales son ligeramente superiores a los obtenidos tras la administración de agua. Además, en estado de DN, los

niveles plasmáticos obtenidos tras la administración del preparado T-Diet Plus® son ligeramente superiores a los obtenidos tras la administración del preparado Isosource-ST®.

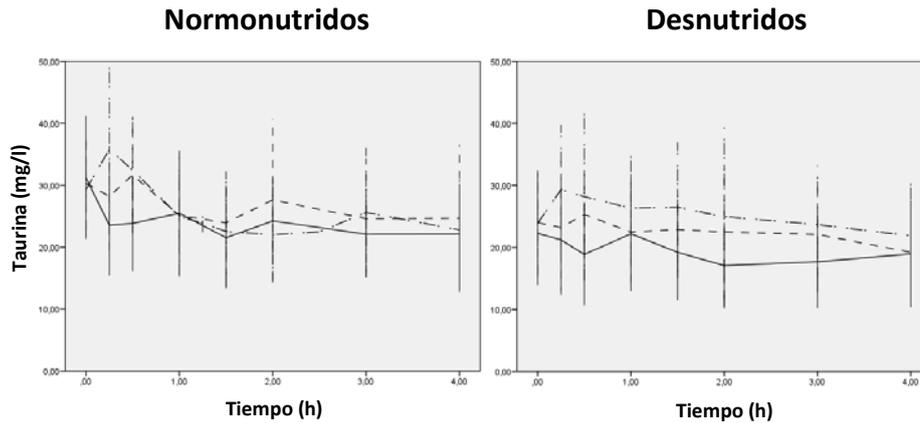


Figura 5-31 Evolución temporal de la concentración plasmática media de taurina e intervalos de confianza 95% tras la administración de agua (línea sólida) y las dietas TDP (línea y puntos) e IST (línea discontinua) en régimen de dosis única a los animales NN y DN.

Para destacar las diferencias atribuidas al estado nutricional, en la Figura 5-32 se muestra la representación gráfica de la concentración plasmática media de taurina (mg/l) obtenida para cada tiempo (h) de obtención de muestra tras la administración de agua y las dietas T-Diet Plus® e Isosource-ST® en régimen de dosis única a los animales NN y DN. En esta figura se observa que tanto tras la administración de agua como tras la administración de las dietas enterales los niveles plasmáticos de taurina obtenidos en animales NN son ligeramente superiores a los obtenidos en los animales DN.

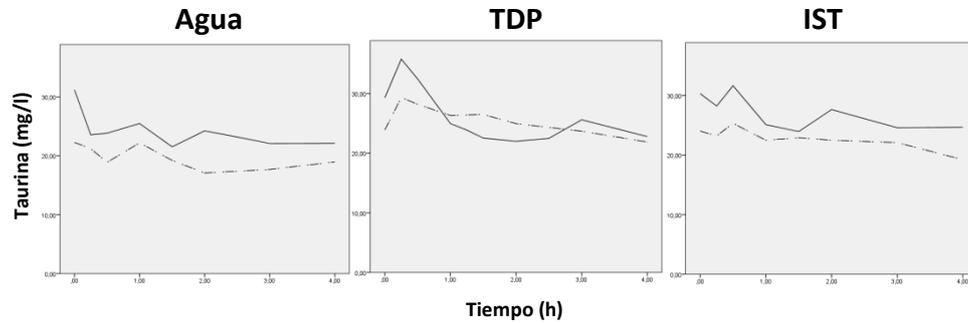


Figura 5-32. Evolución temporal de la concentración plasmática media de taurina (mg/l) obtenida tras la administración de agua, TDP e IST en régimen de dosis única a los animales NN (línea sólida) y DN (línea y puntos).

Puesto que la evolución de la concentración plasmática de taurina con el tiempo tras la administración de los preparados es similar a la obtenida en el grupo control (administración de agua, Figura 5-31), se realizó, en cada grupo ensayado, un análisis de varianza no paramétrico de Kruskal Wallis con el objeto de evaluar si la modificación de las concentración plasmática de taurina observada tras la administración de los preparados enterales presenta diferencias estadísticamente significativas estadística con la concentración plasmática basal del aminoácido. En todos los casos, la prueba realizada indicó que no existen diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

5.6.2 Administración de dosis múltiples

La administración de taurina en régimen de dosis múltiple (DM) ha comportado la administración de una dosis cada dos horas en un total de cuatro dosis por animal y condición.

En la Figura 5-33 se representan las concentraciones plasmáticas individuales de taurina (mg/l), frente al tiempo de muestreo (h) en cada una de las con condiciones de ensayo.

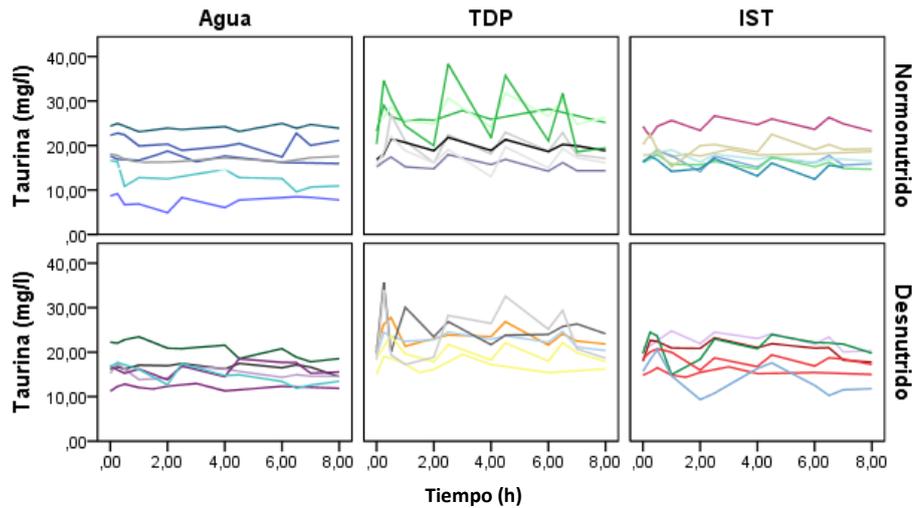


Figura 5-33. Concentraciones plasmáticas individuales de taurina frente a los tiempos de toma de muestra obtenidas tras la administración de agua y las dietas TDP e IST a los animales NN y DN en régimen de dosis múltiple.

La concentración plasmática basal de taurina obtenida en animales NN y DN fue de $18,31 \pm 4,01$ mg/l (CV%= 21,09%, IC90%: 16,8 - 19,8) y $17,71 \pm 2,75$ (CV%= 15,53%, IC90%: 16,6 - 18,8) respectivamente. La prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov realizada determinó que la distribución de estos valores es normal y la prueba estadística t de Student indicó que las diferencias entre ambos valores no son estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

En la Figura 5-34 se representan los diagramas de cajas de la concentración plasmática de taurina obtenida para cada tiempo de toma

de muestra en las condiciones ensayadas. Como se aprecia en la figura, en régimen de dosis múltiple el valor de la mediana de la concentración plasmática del aminoácido se incrementa ligeramente tras la administración de los preparados enterales y la dispersión de los valores es inferior a la obtenida tras la administración del aminoácido en régimen de dosis única.

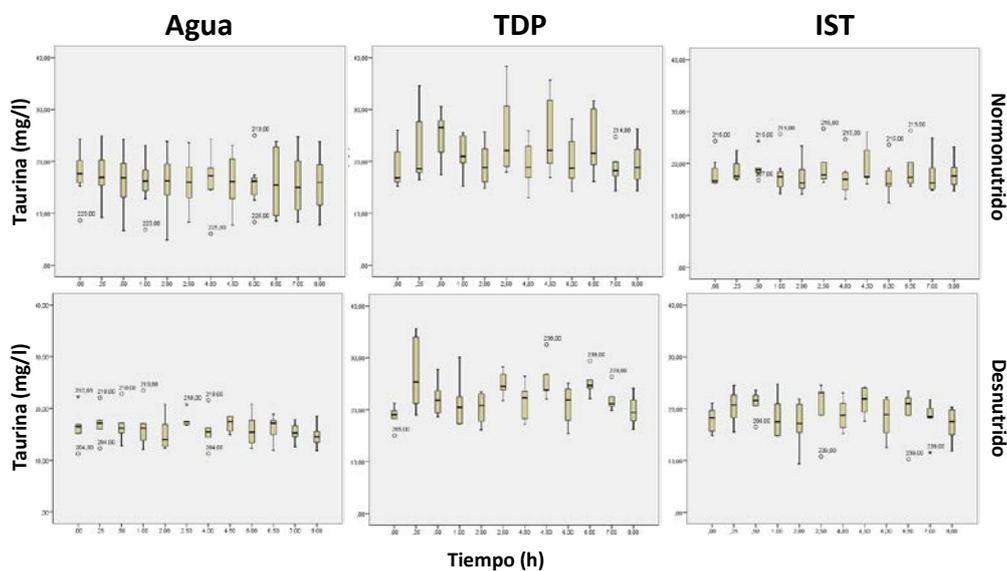


Figura 5-34. Diagrama de cajas de la concentración plasmática de taurina (mg/l) versus tiempo (h) obtenida tras la administración de agua y las dietas TDP e IST a animales NN y DN en régimen de dosis múltiple. Puntos: Outlier o valor atípico seleccionado por el programa SPSS.

En la Figura 5-35 se exponen los valores medios de la concentración plasmática de taurina para cada tiempo de toma de muestra obtenidos tras la administración de los preparados enterales ensayados y de agua en régimen de dosis múltiple a los animales NN y DN. Tanto en animales NN como DN los valores medios de concentración plasmática de taurina tras la

administración de agua son inferiores a los obtenidos tras la administración de los preparados enterales, y a su vez, los valores registrados tras la administración del preparado enriquecido, T-Diet Plus®, son superiores a los obtenidos tras la administración del preparado no enriquecido, Isosource-ST®.

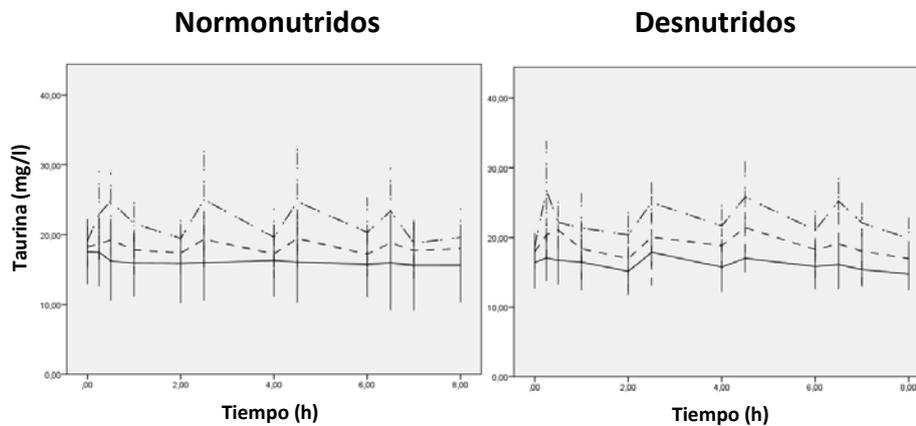


Figura 5-35. Concentración plasmática media de taurina e intervalo de confianza 95% frente al tiempo obtenida tras la administración de agua (línea sólida) y las dietas T-Diet Plus® (línea y puntos) e Isosource-ST® (línea discontinua) en régimen de dosis múltiple a los animales NN y DN, respectivamente.

En la Figura 5-36 se muestra la representación gráfica de la concentración plasmática media de taurina (mg/l) obtenida para cada tiempo (h) de toma de muestra tras la administración de agua y las dietas T-Diet Plus® e Isosource-ST® en régimen de dosis múltiple a los animales NN y DN. Como se puede observar, en las tres condiciones ensayadas los niveles plasmáticos de taurina obtenidos en los dos estados nutricionales se solapan, aunque existe un ligero incremento de las concentraciones plasmáticas del aminoácido cuando se administran las dietas enterales en estado de DN.

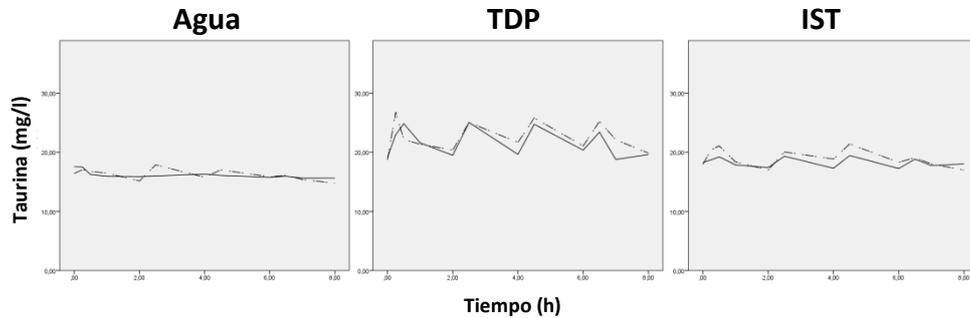


Figura 5-36. Concentración plasmática media de taurina (mg/l) frente al tiempo (h) obtenida tras la administración de agua y las dietas TDP e IST en régimen de dosis múltiple a los animales NN (línea sólida) y DN (línea discontinua).

Con el fin de evaluar si el incremento de las concentraciones plasmáticas de taurina obtenido tras la administración de los preparados enterales tiene significación estadística se realizó, para cada grupo ensayado, un análisis de varianza paramétrico ANOVA seguido de la prueba de comparación múltiple Ryan-Einot-Gabriel-Welsch (R-E-G-W). Únicamente se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre la concentración basal y la concentración de aminoácido obtenida a las 0,25 horas tras la administración del preparado T-Diet Plus® a los animales DN ($p < 0,05$).

5.6.3 Análisis farmacocinético no compartimental

El análisis matemático de los pares de valores concentración plasmática-tiempo se ha realizado mediante el método no compartimental.

Dosis única

A partir de los pares de valores de concentración plasmática de taurina-tiempo obtenidos tras la administración de agua, de la dieta T-Diet Plus® y de la dieta Isosource-ST® en régimen de dosis única a los animales NN y DN (Figura 5-29), se calculó el valor individual de los parámetros farmacocinéticos tmax, Cmax y AUC_{0-4h} (Cuadros 5-23 a 5-25). El cálculo de tmax y Cmax se ha realizado en todos los casos excluyendo la concentración plasmática basal de taurina.

Agua, Dosis única							
NN				DN			
ID	tmax	Cmax	AUC _{0-4h}	ID	tmax	Cmax	AUC _{0-4h}
101	1,25	30,58	99,28	126	1,50	15,48	32,82
102	1,00	46,06	115,52	127	1,00	24,60	70,72
103	2,00	27,22	86,82	128	1,00	44,23	111,11
104	0,25	32,52	65,58	129	0,25	42,39	89,12
105	0,25	43,95	143,17	141	1,50	13,75	47,06
106	4,00	25,62	74,14	144	1,50	10,08	37,71
107	0,50	24,52	80,34	156	1,50	11,23	39,93
138	0,25	14,07	38,26	158	0,50	56,91	204,64
147	1,00	21,15	79,65	165	0,25	18,90	70,36
150	0,50	11,85	42,65	168	1,00	21,96	76,91
153	1,00	60,10	199,42	171	0,50	22,36	74,83
161	2,00	27,56	102,70	174	0,25	14,89	54,75
Media	1,17	30,43	93,96	Media	0,90	24,73	75,83
DE	1,08	13,77	44,20	DE	0,53	15,00	46,65
CV%	92,3%	45,3%	47,04	CV%	58,9%	60,7%	61,51
IC90%	0,6-1,7	23,3-37,6	71,0-116,9	IC90%	0,6-1,2	17,0-32,5	51,6-100,0

Cuadro 5-23. Valores de tmax (h), Cmax (mg/ml) y AUC_{0-4h} (mg•h•l⁻¹) obtenidos tras la administración de agua en régimen de dosis única para cada animal (ID) NN o DN. DE: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación; IC90%: Intervalo de confianza 90%.

TDP, Dosis única							
NN				DN			
ID	tmax	Cmax	AUC _{0-4h}	ID	tmax	Cmax	AUC _{0-4h}
108	0,50	39,52	92,89	130	3,00	34,13	122,56
109	1,00	32,93	89,80	131	0,50	51,03	126,48
110	0,50	43,96	143,96	132	0,25	38,18	92,38
111	0,50	18,90	52,55	133	0,25	23,24	46,29
112	2,00	13,76	42,66	142	0,25	26,13	70,19
113	0,50	37,86	78,16	145	0,25	9,71	32,76
114	3,00	52,03	143,88	157	0,25	13,31	46,91
115	0,25	50,57	70,23	159	0,50	83,88	275,63
116	0,25	31,54	52,29	166	0,25	26,58	99,55
139	0,25	18,28	51,61	169	0,25	32,20	87,30
148	1,50	55,14	168,13	172	1,00	35,22	127,72
151	0,25	21,24	65,77	175	0,50	22,65	83,58
154	0,25	82,97	240,56				
162	0,25	40,94	127,97				
Media	0,78	38,55	101,46	Media	0,60	33,02	100,95
DE	0,83	18,40	56,74	DE	0,79	19,47	63,54
CV%	106,4%	47,7%	55,93	CV%	131,7%	59,0%	62,95
IC90%	0,4-1,2	28,8-47,3	74,6-128,3	IC90%	0,2-1,0	22,9-43,1	68,0-133,9

Cuadro 5-24. Valores de tmax (h), Cmax (mg/ml) y AUC_{0-4h} (mg•h•l⁻¹) obtenidos tras la administración de la dieta TDP en régimen de dosis única para cada animal (ID) NN o DN. DE: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación; IC90%: Intervalo de confianza 90%.

IST, Dosis única							
NN				DN			
ID	tmax	Cmax	AUC	ID	tmax	Cmax	AUC
117	0,50	57,96	142,08	134	0,50	35,48	78,27
118	0,50	32,04	98,39	135	0,25	60,65	134,14
119	0,50	35,06	76,48	136	1,5	21,18	64,95
120	0,25	25,78	88,54	137	1	14,31	46,91
121	2,00	30,60	59,02	143	0,5	21,71	37,21
122	0,25	28,35	71,92	146	0,25	13,35	39,67
123	0,25	35,57	112,36	160	2	72,05	233,40
124	0,50	23,14	73,03	164	0,5	22,13	75,31
125	4,00	23,46	64,93	167	0,5	24,47	80,43
140	0,50	18,22	59,67	170	2	25,54	94,78
149	3,00	43,06	164,67	173	0,5	29,8	100,61
152	3,00	12,96	48,29	176	0,5	21,49	78,58
155	2,00	92,07	292,57				
163	1,00	31,45	113,64				
Media	1,30	34,98	104,68	Media	0,83	30,18	88,69
DE	1,26	19,73	63,54	DE	0,64	19,47	53,09
CV%	96,9%	56,4%	60,69	CV%	77,1	64,5%	59,87
IC90%	0,7-1,9	25,6-44,3	74,6-134,8	IC90%	0,5-1,2	20,8-39,5	61,2-116,2

Cuadro 5-25. Valores de tmax (h), Cmax (mg/ml) y AUC_{0-4h} (mg•h•l⁻¹) obtenidos tras la administración de la dieta IST en régimen de dosis única para cada animal (ID) NN o DN. DE: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación; IC90%: Intervalo de confianza 90%.

La prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov determinó que los valores medios de tmax, Cmax y AUC_{0-4h} obtenidos tras la administración de los preparados en régimen de dosis única no siguen una distribución normal. Por ello, las pruebas de comparación múltiple se realizaron con los datos Cmax y AUC_{0-4h} logotransformados.

En las Figuras 5-37 y 5-38 se representan los diagramas de cajas de los valores de tmax y Cmax obtenidos tras la administración de agua, T-Diet Plus® e Isosource-ST® en régimen de dosis única a los animales NN y DN. En

las figuras se pone de manifiesto que los valores de tmax y Cmax obtenidos en las diferentes condiciones ensayadas son similares y en todos los casos la variabilidad es elevada.

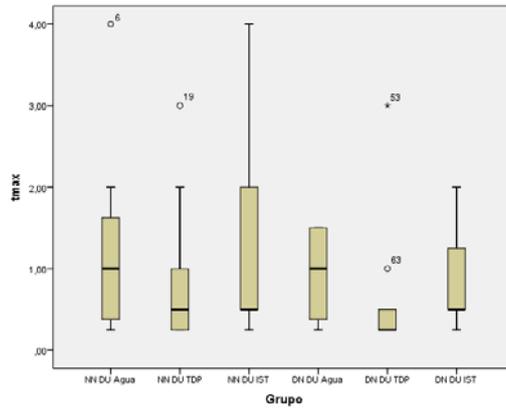


Figura 5-37. Diagrama de cajas de tmax (h) tras la administración de agua, T-Diet Plus® (TDP) e Isosource-ST® (IST) en régimen de dosis única (DU) a los animales NN y DN. Puntos: Outlier o valor atípico seleccionado por el programa SPSS.

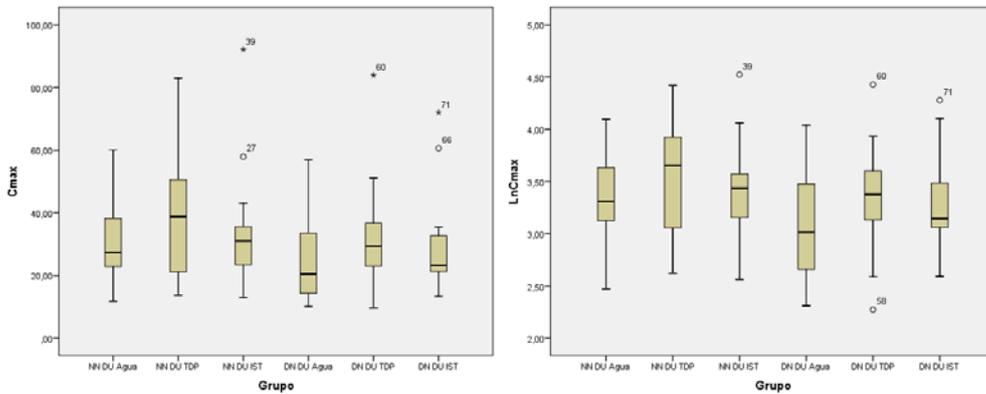


Figura 5-38. Diagrama de cajas de Cmax (mg/l, izquierda) y LnCmax (derecha) tras la administración de agua, T-Diet Plus® (TDP) e Isosource-ST® (IST) en régimen de dosis única (DU) a los animales NN o DN. Puntos: Outlier o valor atípico seleccionado por el programa SPSS.

En el Cuadro 5-26 se muestra el valor de la media geométrica del AUC_{0-4h} de taurina, obtenida tras la administración de una única dosis de agua a los animales NN (Agua NN DU) y DN (Agua DN DU); de la dieta T-Diet Plus® a los animales NN (TDP NN DU) y DN (TDP DN DU) y de la dieta Isosource-ST® a los animales NN (IST NN DU) y DN (IST DN DU). Como puede apreciarse, el valor de la media geométrica del AUC_{0-4h} de taurina tras la administración de los preparados es ligeramente superior al obtenido tras la administración de agua. Pese a ello, las diferencias observadas tanto en animales NN como DN no son estadísticamente significativas.

Grupo	n	AUC_{0-4h} (mg·h·l ⁻¹)			
		Media	DE	CV%	IC90%
Agua NN DU	12	4,43	0,46	10,38	4,21-4,68
TDP NN DU	14	4,49	0,52	11,58	4,24-4,73
IST NN DU	14	4,53	0,48	10,60	4,30-4,76
Agua DN DU	12	4,20	0,57	13,57	3,39-4,46
TDP DN DU	12	4,46	0,51	11,44	4,17-4,76
IST DN DU	12	4,36	0,51	11,70	4,09-4,62

Cuadro 5-26. Media geométrica, desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV%) e intervalo de confianza 90% (IC90%) del AUC_{0-4h} de taurina obtenida tras la administración de una única dosis de agua o de los preparados enterales. n: número de animales.

En la Figura 5-39 se muestra el diagrama de cajas de los valores del AUC_{0-4h} obtenidos en las condiciones ensayadas. Se puede apreciar que la mediana de los $\ln AUC_{0-4h}$ tras la administración de agua o las dietas enterales en animales NN es prácticamente idéntica, y en animales DN el valor tras la administración de agua es ligeramente inferior.

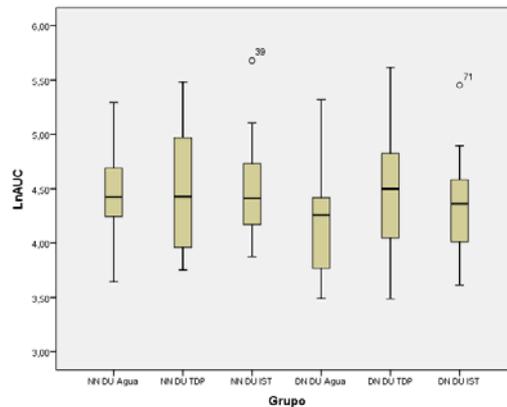


Figura 5-39. Diagrama de cajas de los \ln de AUC_{0-4h} ($\ln AUC$) tras la administración de agua, T-Diet Plus® (TDP) e Isosource-ST® (IST) en régimen de dosis única (DU) en animales NN o DN. Puntos: Outlier o valor atípico seleccionado por el programa SPSS.

La prueba estadística de Kruskal-Wallis no detectó diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros t_{max} o C_{max} ($p > 0,05$). El análisis de las varianzas y las pruebas de comparación múltiple realizadas con los $\ln AUC_{0-4h}$ tampoco detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p > 0,05$).

Dosis múltiple

Los valores individuales de los parámetros farmacocinéticos no compartimentales t_{max} , C_{max} y AUC_{6-8h} obtenidos en animales NN y DN

tras la administración de agua, de la dieta T-Diet Plus® y de la dieta Isosource-ST® en régimen de dosis múltiple se muestran en los Cuadros 5-27 a 5-29. Para el registro de tmax en régimen de dosis múltiple se anotó el valor de tiempo transcurrido desde la última administración.

Agua, Dosis múltiple									
NN					DN				
ID	n	tmax	Cmax	AUC _{6-8h}	ID	n	tmax	Cmax	AUC _{6-8h}
201	2	2,00	17,63	32,15	204	3	2,00	15,42	24,18
207	2	2,00	14,65	21,40	210	2	2,00	24,17	37,31
213	3	2,00	24,98	48,66	222	3	0,50	21,90	32,43
216	4	2,00	17,23	34,19	228	2	2,00	23,94	29,30
219	3	0,50	15,25	26,40	234	3	0,50	19,40	32,48
225	4	0,50	8,29	16,48	237	3	0,50	17,59	25,47
231	4	0,50	20,45	41,32					
Media		1,36	16,93	31,51	Media		1,25	20,40	30,19
DE		0,80	5,17	11,20	DE		0,82	3,54	4,90
CV%		58,8%	30,55	35,53	CV%		65,6%	17,35	16,23
IC90%		0,77-1,95	12,1-21,7	21,2-41,9	IC90%		0,57-1,93	13,5-20,2	25,0-35,5

Cuadro 5-27. Valores de tmax (h), Cmax (mg/ml) y AUC_{6-8h} (mg•h•l⁻¹) obtenidos tras la administración de agua en régimen de dosis múltiple para cada animal (ID) NN o DN. n: número dosis administradas tras el que se alcanza el tmax y Cmax; DE: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación.

TDP, Dosis múltiple									
NN					DN				
ID	n	tmax	Cmax	AUC _{6-8h}	ID	n	tmax	Cmax	AUC _{6-8h}
202	3	2,00	28,21	53,35	205	2	1,00	17,23	31,63
208	1	0,50	22,97	38,06	211	3	0,50	26,84	45,25
214	3	0,50	31,77	53,41	223	4	0,50	23,68	43,93
217	2	0,50	21,33	39,12	229	1	1,00	24,00	50,71
220	2	0,50	16,89	29,57	235	1	0,50	22,07	39,41
226	1	0,50	19,69	34,41	238	3	0,50	32,57	45,84
232	2	0,50	35,71	44,77					
Media		0,71	25,22	41,81	Media		0,67	24,40	42,79
DE		0,57	6,86	9,15	DE		0,26	5,10	6,56
CV%		80,3%	27,18	21,89	CV%		38,8%	20,92	15,33
IC90%		0,30-1,13	18,9-31,6	33,3-50,3	IC90%		0,45-0,88	19,0-29,8	35,9-49,7

Cuadro 5-28. Valores de tmax (h), Cmax (mg/ml) y AUC_{6-8h} (mg•h•l⁻¹) obtenidos tras la administración de la dieta TDP en régimen de dosis múltiple para cada animal (ID) NN o DN. n: número dosis administradas tras el que se alcanza el tmax y Cmax; DE: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación.

IST, Dosis múltiple									
NN					DN				
ID	n	tmax	Cmax	AUC _{6-8h}	ID	n	tmax	Cmax	AUC _{6-8h}
203	2	1,00	18,13	36,80	206	2	1,00	12,32	30,41
209	3	0,50	17,26	32,55	212	2	,50	21,57	42,37
215	2	0,50	25,98	49,32	224	2	,50	17,47	38,26
218	2	0,50	17,50	33,45	230	3	,50	16,28	42,83
221	3	0,50	17,37	30,38	236	3	,50	18,49	36,05
227	2	0,50	16,04	30,34	239	3	,50	14,92	22,83
233	3	0,50	22,50	38,84					
Media		0,57	19,25	35,95	Media		0,58	16,84	35,46
DE		0,19	3,60	6,68	DE		0,20	3,16	7,69
CV%		33,3%	18,72	18,59	CV%		34,5%	18,76	21,68
IC90%		0,43-0,71	15,9-22,6	29,7-42,1	IC90%		0,41-0,75	16,7-24,1	27,4-43,5

Cuadro 5-29. Valores de tmax (h), Cmax (mg/ml) y AUC_{6-8h} (mg•h•l⁻¹) obtenidos tras la administración de la dieta TDP en régimen de dosis múltiple para cada animal (ID) NN o DN. n: número dosis administradas tras el que se alcanza el tmax y Cmax; DE: desviación estándar; CV%: coeficiente de variación.

La prueba estadística de Kolmogorov-Smirnov determinó que los valores medios de t_{max} y C_{max} obtenidos tras la administración de los preparados en régimen de dosis múltiple no siguen una distribución normal ($p < 0,05$), mientras que los valores medios de AUC_{6-8h} siguen una distribución normal ($p > 0,05$).

En la Figura 5-40 se representan los diagramas de cajas de la C_{max} obtenida tras la administración de agua, T-Diet Plus® e Isosource-ST® en régimen de dosis múltiple a los animales NN y DN. En la figura se observa que en animales NN los valores más elevados de C_{max} se obtienen tras la administración del preparado enriquecido T-Diet Plus®. En animales DN, el C_{max} obtenido tras la administración de los preparados enterales es ligeramente superior al obtenido tras la administración de agua. A su vez, el C_{max} obtenido tras la administración del preparado enriquecido T-Diet Plus® es mayor al valor obtenido tras la administración del preparado no enriquecido Isosource-ST®.

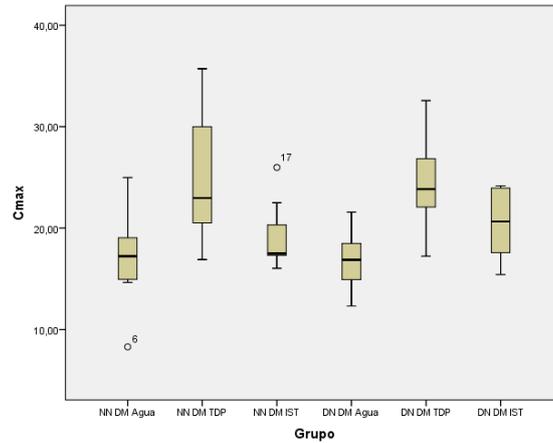


Figura 5-40. Diagrama de cajas de Cmax (mg/l) tras la administración de agua, T-Diet Plus® (TDP) e Isosource-ST® (IST) en régimen de dosis múltiple en animales NN o DN. Puntos: Outlier o valor atípico seleccionado por el programa SPSS.

En el Cuadro 5-30 se muestra la media aritmética del AUC_{6-8h} de taurina obtenido tras la administración de agua a los animales NN (Agua NN DM) y DN (Agua DN DM); de la dieta T-Diet Plus® a los animales NN (TDP NN DM) y DN (TDP DN DM) y de la dieta Isosource-ST® a los animales NN (IST NN DM) y DN (IST DN DM) en régimen de dosis múltiple. El valor medio del AUC_{6-8h} de taurina obtenido tras la administración de los preparados es superior al valor obtenido tras la administración de agua. Además, este incremento es superior tras la administración del preparado enriquecido T-Diet Plus®.

AUC_{6-8h} (mg·h·l⁻¹)					
Grupo	n	Media	DE	CV%	IC90%
Agua NN DM	7	31,51	11,20	35,53	21,2-41,9
TDP NN DM	7	41,81	9,15	21,89	33,3-50,3
IST NN DM	7	35,95	6,68	18,59	29,8-42,1
Agua DN DM	6	30,19	4,90	16,23	25,1-35,3
TDP DN DM	6	42,79	6,56	15,33	35,9-49,7
IST DN DM	6	35,46	7,69	21,68	27,4-43,5

Cuadro 5-30. Media aritmética, desviación estándar (DE), coeficiente de variación (CV%) e intervalo de confianza 90% (IC90%) del AUC_{6-8h} de taurina obtenida tras la administración de dosis múltiples de agua o de los preparados enterales. n: número de animales.

En Figura 5-41 se muestra el diagrama de cajas del AUC_{6-8h} de taurina obtenida en las condiciones ensayadas. Se puede observar que la mediana del AUC_{6-8h} en animales NN únicamente experimenta un incremento tras la administración del preparado enriquecido T-Diet Plus®. En cambio, en animales DN se puede apreciar que el valor de la mediana del AUC_{6-8h} tras la administración de las dietas enterales es superior al obtenido tras la administración de agua, aunque es más notable para preparado enteral T-Diet Plus®.

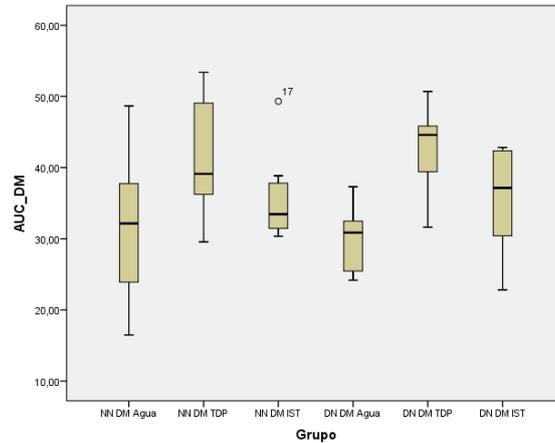


Figura 5-41. Diagrama de cajas de AUC_{6-8h} (AUC_{DM} , $mg \cdot h \cdot l^{-1}$) tras la administración de agua, T-Diet Plus® (TDP) e Isosource-ST® (IST) en régimen de dosis múltiple (DM) en animales NN o DN. Puntos: Outlier o valor atípico seleccionado por el programa SPSS.

Los parámetros farmacocinéticos t_{max} , C_{max} y AUC_{6-8h} se sometieron a un análisis de varianza el cual puso de manifiesto que no existen diferencias estadísticamente significativas entre el C_{max} y el t_{max} entre los diferentes grupos ensayados. El análisis de varianza realizado con los valores del AUC_{6-8h} detectaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$). El análisis de comparación múltiple reveló diferencias estadísticamente significativas entre el AUC_{6-8h} obtenido en el grupo DN tras la administración de agua y el grupo DN tras la administración del preparado enteral T-Diet Plus® ($p < 0,05$).

5.7 Valor añadido del aporte de taurina por el preparado enteral

En el Cuadro 5-31 se detalla la relación de AUC obtenida tras la administración de los preparados enterales T-Diet Plus® (TDP) e Isosource-ST® (IST) y tras la administración de agua en régimen de dosis única (AUC_{0-4h}) y régimen de dosis múltiple (AUC_{6-8h}) en cada estado nutricional (NN y DN).

En animales NN el AUC_{0-4h} no se modifica significativamente tras la administración de los preparados enterales en régimen de dosis única. Sin embargo, en animales DN, el AUC_{0-4h} es mayor tras la administración de las dietas enterales, destacando el preparado enriquecido T-Diet Plus®.

Tras la administración de los preparados en régimen de dosis múltiple se evidencia que el valor añadido de los preparados enterales no está asociado al estado nutricional de los animales. La comparación del AUC_{6-8h} obtenida tras la administración de ambos preparados y el AUC_{6-8h} obtenida tras la administración de agua, confirma la tendencia observada en los animales DN cuando se administran los preparados en régimen de dosis única.

Estado nutricional	Dosis única (DU)		Dosis múltiple (DM)		
	$\frac{AUC_{TDP}}{AUC_{Control}} \cdot 100$	$\frac{AUC_{IST}}{AUC_{Control}} \cdot 100$	$\frac{AUC_{TDP}}{AUC_{Control}} \cdot 100$	$\frac{AUC_{IST}}{AUC_{Control}} \cdot 100$	
NN	Media	104,34%	108,5 %	132,7%	114,1 %
	IC 90%	(75; 146)	(78; 152)	(110; 156)	(91;137)
DN	Media	130,7%	117,3 %	141,7 %	117,4 %
	IC 90%	(92; 185)	(83,166)	(116; 168)	(91; 144)

Cuadro 5-31. Valores medios e intervalo de confianza 90% (IC90%) de los cocientes de AUC indicados.

6 DISCUSIÓN

La desnutrición se ha asociado con variaciones en la absorción y distribución de fármacos debido a las alteraciones que se producen en las membranas absorbentes, la unión a proteínas, en el metabolismo hepático y/o en la eliminación renal^{1, 73}. Por ello, es lógico plantear científicamente hipótesis que confirmen si estas alteraciones pueden modificar la absorción, distribución, metabolismo y excreción de nutrientes esenciales, o los condicionalmente esenciales como la taurina, que permiten el correcto funcionamiento de los procesos biológicos en el organismo^{16, 19, 74, 75}.

En humanos sanos, los requerimientos alimenticios se cubren habitualmente con la ingesta de una dieta equilibrada. Sin embargo, en determinados estados patológicos o cuando de forma continuada se ingiere una dieta no equilibrada, los requerimientos alimenticios varían y se requiere un mayor aporte exógeno de nutrientes. Existen pocos estudios que evalúen la influencia de la desnutrición sobre la farmacocinética de fármacos⁷⁶, siendo aún menor el número de aquéllos que evalúan la influencia de esta condición sobre la farmacocinética de nutrientes⁷⁷.

El objetivo de este estudio es evaluar el impacto de la desnutrición calórico-proteica sobre los parámetros farmacocinéticos y la biodisponibilidad de la taurina, administrada por vía oral e intravenosa, en solución libre e incorporada a preparados de nutrición enteral clínica en animales normonutridos y desnutridos.

Se ha propuesto la utilización de este aminoácido en nutrición enteral clínica porque niveles bajos de taurina se han asociado con degeneración retiniana, retraso en el crecimiento, y cardiomiopatías. Igualmente se plantea su uso para el tratamiento de enfermedades oculares, cardiovasculares o hepáticas, así como en otras situaciones tales como hipercolesterolemia, diabetes, enfermedad de Alzheimer, fibrosis quística y alcoholismo⁷⁸⁻⁸⁰. Sin embargo, son escasos los trabajos que demuestren su biodisponibilidad ya que no se ha demostrado hasta ahora el valor añadido que representa la ingesta extra de este aminoácido en condiciones de normalidad/enfermedad o normonutrición/desnutrición de manera que su aporte a los preparados de nutrición enteral en adultos persiste en el empirismo⁴¹. Esta situación ha posicionado a la taurina en un perfil nutricional, tal que hay autores que afirman que la taurina es necesaria en edades tempranas para estimular el desarrollo, pero no existe evidencia científica concluyente que demuestre que sea esencial a partir de los tres meses de vida, por lo que el suplementar con este aminoácido las dietas destinadas a cubrir las necesidades de individuos de mayor edad parece ser irrelevante. Aun así, la totalidad de dietas infantiles comercializadas en Europa están suplementadas con este aminoácido⁹.

La fiabilidad de la información obtenida a partir de la determinación analítica de la concentración del analito en una matriz biológica es un aspecto de máxima importancia para realizar la monitorización de fármacos y nutrientes. Por este motivo, la técnica analítica utilizada, previamente publicada⁶⁴, se ha adecuado para su utilización con los

equipos analíticos disponibles en nuestro laboratorio, resultando ser preciso, exacto, robusto y reproducible.

En el presente estudio la taurina, en solución por vía oral y por vía intravenosa, se administra a los animales de experimentación a diferentes concentraciones, con el objetivo de detectar no linealidad en una o más de las fases ADME (Absorción, Distribución, Metabolismo y Excreción). Asimismo, se determina si el estado de desnutrición modifica el comportamiento farmacocinético de la taurina. Este fase previa se ha llevado a cabo para evaluar los niveles plasmáticos de taurina proporcionados por dos preparados de nutrición enteral, utilizados en clínica, con la diferencia de que uno de ellos (T-Diet Plus®) está enriquecido con taurina y el otro no. La administración a los animales de experimentación normonutridos y desnutridos pretende evaluar la repercusión del estado nutricional de los animales en el aprovechamiento por vía oral de taurina en las diferentes formas en las que se presenta en los mismos. Este aspecto justifica la necesidad de conocer la cantidad total de taurina que contienen los preparados enterales de estudio y los ensayos de digestión *in vitro* realizados con estos preparados. Estos ensayos se diseñaron de tal forma que se pudiera conocer la cantidad de taurina disponible para su absorción, al inicio y final del proceso digestivo, y así evaluar el rendimiento de la absorción intestinal del aminoácido, ya que se trata de un proceso que está condicionado por diversos factores fisiológicos, entre ellos la eficiencia de la digestión de los nutrientes⁵⁶.

Los resultados obtenidos en esta fase confirman que el preparado T-Diet Plus® está suplementado con taurina, puesto que antes y después del proceso de digestión las cantidades del aminoácido son mayores a las obtenidas con el preparado Isosource-ST®. Estas diferencias son máximas sin digestión (del orden de 10 veces, $p < 0,01$), lo que corrobora que el preparado enteral problema incluye mayor cantidad del aminoácido en forma libre. Tras la primera fase de digestión (estomacal) las concentraciones en ambos preparados son prácticamente idénticas ($p > 0,05$), y al finalizar la fase digestión intestinal la cantidad de taurina que contiene el preparado problema es 2,6 veces superior a la que contiene el preparado de referencia. Estos resultados confirman que el aporte de taurina en el preparado enriquecido es mayor que en el no enriquecido. Además, estas variaciones en la concentración del aminoácido tras el proceso de digestión indica que el aporte de la taurina en el preparado T-Diet Plus® es mayoritariamente en forma libre, puesto que la concentración del aminoácido no varía excesivamente tras la digestión. En cambio, la taurina contenida en el preparado no enriquecido Isosource-ST® está mayoritariamente en forma conjugada (glúcidos, polipéptidos⁸¹), puesto que la cantidad de taurina en forma libre obtenida antes el proceso de digestión es mucho menor que la obtenida una vez finalizado.

6.1 Modelo animal

La especie animal utilizada en este estudio ha sido la rata albina macho de la raza Wistar. Ésta presenta similitud anatómico-fisiológica con el

hombre en cuanto al proceso de absorción intestinal se refiere⁸². Es un animal de pequeño tamaño que es fácil de manipular, presenta elevada capacidad prolfica, y además nuestro grupo de investigación posee una vasta experiencia en la manipulación de este roedor. Sin embargo, presenta algunos inconvenientes que también se deben evaluar, entre ellos, poseer un pequeño volumen sanguíneo, ritmos biológicos muy rápidos y hábitos nocturnos.

Entre los animales seleccionados se excluyeron 7 por poseer un peso inferior (n=1) o superior (n=6) al establecido (220 y 255 g). Asimismo, en el desarrollo del estudio se tuvieron pérdidas por fallecimiento durante la intervención quirúrgica de implantación de la cánula en la vena yugular de 4 animales NN y 10 DN. El número de fallecimientos en el grupo DN (n=10) fue mayor que en el NN (n=4), probablemente debido a que el estado de desnutrición retrasa la cicatrización y dificulta la recuperación de los animales tras las intervenciones quirúrgicas, de forma que el organismo desnutrido es más sensible a la cirugía y al estrés desarrollado. En este estudio, la tasa de supervivencia tras la intervención quirúrgica en animales del grupo NN ha sido del 95,9% y en el grupo DN del 89,6%. Estos datos son semejantes en humanos, en los que el estado de desnutrición es un factor que incrementa la morbilidad y mortalidad de los pacientes sometidos a cirugía⁸³⁻⁸⁵.

En clínica, los diferentes métodos de **evaluación del estado nutricional** se basan en la realización de un test subjetivo que realiza el paciente, y la determinación de marcadores biométricos y bioquímicos²¹⁻²⁶,

⁸⁶⁻⁸⁸ para establecer una puntuación que proporciona una visión global del estado nutricional del paciente⁸⁹.

En este estudio, se han empleado los valores analíticos de los biomarcadores peso y albúmina sérica (“signos”). Además, se realizaron controles subjetivos (“síntomas”), realizados por el experimentador, (piloerección, movimientos anormales o repetitivos, fragilidad ungueal) que solo en casos excepcionales se tuvieron en cuenta para justificar la exclusión de animales en el estudio. En este escenario, los marcadores de elección fueron el peso del animal (biométrico), y el colesterol y la albúmina plasmáticos (bioquímicos).

El peso, así como su evolución en el tiempo, es un biomarcador ampliamente utilizado en las valoraciones nutricionales en clínica, bien de forma directa en forma de peso actual y su evolución en las últimas semanas, o de forma indirecta en el parámetro índice de masa corporal (IMC). En este estudio, los animales seleccionados tienen un peso y edad similar ya que fueron seleccionados de acuerdo con los criterios de inclusión indicados anteriormente. Este hecho, sumado a la complejidad para establecer un sistema de medida de la longitud de los animales, determinó que se utilizase la evolución temporal del peso de los animales como parámetro representativo del estado nutricional.

El peso de los animales se registró diariamente durante el periodo de acondicionamiento puesto que en este tiempo se pueden apreciar variaciones significativas (Figura 5-3). En el protocolo se estableció que el animal se debe pesar en ayunas para provocar un refuerzo positivo al

estímulo de ser manipulado, ya que tras el contacto con el investigador, el animal recibe una “recompensa” que se corresponde con el alimento que recibe diariamente. De esta forma, al finalizar la primera semana del periodo de adaptación se consigue que el estrés del animal, provocado por la manipulación y toma de muestras sanguíneas, se reduzca a la vez que se facilita la labor del investigador y mejoran las condiciones de estabulado de la rata.

La concentración de albúmina plasmática es un parámetro ampliamente utilizado como biomarcador de desnutrición en seres humanos^{22, 23, 61}, aunque por su prolongada semivida (20-21 días) no se considera una medida extremadamente sensible a las alteraciones agudas atribuidas al estado nutricional^{9, 88}. Debido a la alta variabilidad de este parámetro, sensible a las condiciones de mantenimiento y estabulado de los animales, se ha manejado su valor medio en la población objeto de estudio. La albúmina se determinó cada 7 días, periodicidad suficiente para describir su evolución durante el ensayo y para no alterar el hematocrito por modificación de la volemia del animal. La duración del periodo de acondicionamiento de los animales fue de $24,6 \pm 2,5$ días, atendiendo al valor de la semivida biológica de la albúmina⁹⁰.

Existen otros biomarcadores como la prealbúmina o la proteína ligada al retinol de menor semivida biológica, que pueden ser empleados en la evaluación del estado nutricional; sin embargo, su determinación requiere procedimientos complejos y de cuantificación costosa que nos hicieron desestimar su utilización. Cabe destacar la posibilidad de que los

niveles de albúmina estén alterados por la existencia de otras alteraciones fisiológicas o patológicas, independientes de la desnutrición, lo que limita en ocasiones su utilización como marcador del estado nutricional. Puesto que los animales incluidos en el estudio proceden del estabulario de la Facultad de Farmacia, donde son criados con los correspondientes controles de calidad y seguridad, la ausencia de patologías previas en los animales queda garantizada por lo que los cambios que se producen en la concentración de la albúmina plasmática pueden atribuirse a las deficiencias nutricionales.

Tras determinar el valor medio de los tres biomarcadores (peso, albúmina y colesterol total) en animales sanos y observar su evolución temporal, se consideró oportuno su seguimiento o trazabilidad. Sin embargo, la utilización del colesterol en sangre como biomarcador de desnutrición no se consolidó debido a que su elevada variabilidad no permitió poner de manifiesto diferencias estadísticamente significativas entre los valores observados en animales NN y DN. En la Figura 5-5 se puede observar cómo al finalizar el periodo de acondicionamiento, los niveles plasmáticos de colesterol de animales NN y DN se solapan. Los resultados obtenidos en este estudio corroboran los descritos en la bibliografía⁹¹, indicando que el colesterol es un biomarcador poco sensible al estado nutricional, y por tanto, con escaso valor predictivo. Por todo ello, la gradación del estado nutricional se estableció con ayuda de los valores de peso y albúmina plasmática (Cuadro 4-3)⁶¹. Se asignó el doble de puntuación al peso del animal que a la concentración plasmática de

albúmina, debido a que es un parámetro validado en los métodos de valoración del estado nutricional consultados^{21-26, 86-88}.

La distribución porcentual del grado de desnutrición en animales del grupo DN es, mayoritariamente, severa (68%) hecho que confirma la validez del modelo utilizado; con desnutrición moderada fue del 24% y con desnutrición leve fue tan solo del 8%. En consecuencia, el 92% de los animales empleados en este estudio presentaban desnutrición moderada o severa.

6.2 Diseño experimental

En pequeños mamíferos, como el empleado en esta Tesis Doctoral, los vasos periféricos son de pequeño calibre y difícil localización. Por ello, al retirar sangre por aspiración con jeringa, se colapsan con facilidad y no es posible obtener la muestra. Asimismo, la administración a través de estos vasos está limitada por su flujo y es compleja de manipular. Por ello, para la toma de muestras múltiples se recomienda la instalación de vías permanentes en vasos de mayor calibre. En este trabajo se ha empleado la técnica de canulación permanente de la vena yugular que puede utilizarse transcurridas entre 16 y 24 horas desde la operación. Este procedimiento, permite además la toma de muestras de forma sencilla y sin causar ningún trauma al animal, que permanece consciente y en libertad controlada durante la realización de la experiencia.

Los estudios farmacocinéticos requieren, sobre todo en las primeras fases del ensayo, un amplio muestreo, para definir la fase de disposición rápida (fase α) en el caso de la administración intravenosa y la fase de absorción en el caso de la administración oral. Esto puede producir alteraciones en la volemia de los animales y en caso de que se produzca, la estabilidad fisiológica del animal está comprometida produciendo una alteración de los parámetros farmacocinéticos de la sustancia que se ensaya.

El volumen sanguíneo medio en rata es de 60 ml/kg. En animales de experimentación se establece que el volumen sanguíneo extraído no debe superar el 10% del volumen sanguíneo total para evitar un descenso agudo del hematocrito por lo que la volemia debe ser mantenida con solución salina al 0,9% ⁶². En suma, se han tomado hasta un máximo de 12 muestras de 0,10 ml cada una, de modo que el volumen total extraído ha sido de 1,2 ml que no supera el máximo recomendado⁶².

Otro aspecto importante en los estudios farmacocinéticos es establecer adecuadamente el periodo y los tiempos de toma de muestras. En nuestras condiciones experimentales, tras la administración intravenosa de taurina se han recogido 7 muestras durante 2 horas y 8 tras un total de 3 horas. Este tiempo ha sido suficiente para obtener una adecuada descripción de la fase terminal (fase β), puesto que a tiempos posteriores a las 2 horas los niveles plasmáticos de taurina se sitúan en los valores que adoptan los niveles basales del aminoácido en el animal.

El tiempo de muestreo de 2 horas también se mantuvo en los ensayos realizados tras la administración oral del aminoácido en solución, con la excepción de la administración de la dosis de 100 mg, en la que el periodo de toma de muestras se prolongó durante 3 horas, puesto que a las 2 horas post-administración los niveles plasmáticos de taurina no habían recuperado el nivel basal.

El periodo de recogida de muestra se prolongó durante un total de 4 horas cuando se administraron los preparados enterales en dosis única por vía oral, ya que junto con la taurina en forma libre y conjugada, se administran otros nutrientes que pueden modificar el proceso de absorción del aminoácido (fibra, proteínas, azúcares...). Tras observar el comportamiento del aminoácido en dosis única, en régimen de dosis múltiple se estableció la administración de 4 tomas de los preparados enterales o de agua cada 2 horas puesto que transcurrido ese periodo los niveles plasmáticos del aminoácido retornaban al nivel basal.

Se administró 1 ml por vía oral e intravenosa de las soluciones acuosas de taurina a las concentraciones de 1, 10 o 100 mg/ml. Se han ensayado diferentes dosis para poner en evidencia, en caso de existir, la pérdida de linealidad en la farmacocinética del aminoácido. Entre éstas, se ha seleccionado la dosis de 1 mg con el fin de aproximar la dosis de taurina a la empleada en la administración de los preparados enterales y las dosis superiores, de 10 y 100 mg, para evidenciar la pérdida de linealidad en la farmacocinética del aminoácido. Otros estudios realizados con taurina han utilizado dosis similares e incluso superiores a las utilizadas en este estudio.

Así, Ghandforoush-Sattari y col ⁹² en un estudio farmacocinético de taurina en humanos administran 200 mg del aminoácido por vía intravenosa o 1 g por vía oral. Otros autores realizan la administración de 800 mg/kg por vía intraperitoneal en rata con el objetivo de demostrar el efecto de este aminoácido como antídoto en intoxicaciones por paracetamol así como evaluar el efecto hepatoprotector de la taurina debido a la reducción del estrés oxidativo y normalización de la síntesis del glutatión^{93, 94}. Por otra parte, las dosis de 10 y 100 mg podrían describir los valores medios de ingesta diaria de taurina de un individuo con alto consumo de carne, pescado y marisco⁹⁵.

Se ha administrado un volumen de 2,5 ml de los preparados enterales en régimen de dosis única y en régimen de dosis múltiple debido a que es el volumen máximo que admite el estómago de los animales utilizados. La cantidad de taurina que contiene este volumen tras el proceso de digestión *in vitro* es de $0,22 \pm 0,03$ mg para el preparado enteral Isosource-ST® y de $0,58 \pm 0,07$ mg para el preparado T-Diet Plus® ; es decir, 2,5 veces más.

6.3 Análisis morfológico del intestino

El análisis morfológico del intestino delgado de los animales se ha realizado mediante la observación microscópica de los cortes histológicos realizados en muestras de intestino delgado de seis animales que habían sido utilizados en el estudio farmacocinético, ya que la implantación de la cánula y la administración por vía intravenosa del aminoácido no altera la

morfología del tracto gastrointestinal. Esta decisión se consideró oportuna para reducir el número de animales de estudio, siguiendo las tres R recomendadas en experimentación animal (Reemplazar, Reducir y Refinar). Está bien documentado que en la desnutrición calórico-proteica se desarrollan alteraciones gastrointestinales morfológicas y funcionales. Entre ellas, el intestino pierde peso y su pared se adelgaza a expensas de la mucosa intestinal, por lo que esta última es delgada y con disminución, aplanamiento y acortamiento de las vellosidades del borde en cepillo y con hipoplasia progresiva de las criptas⁷³.

Las alteraciones morfológicas observadas en este trabajo en los diferentes tramos intestinales concuerdan con las descritas por otros autores en humanos y animales de experimentación⁷³.

Algunos autores han demostrado que el ayuno prolongado o la desnutrición tienen efectos dramáticos sobre la estructura de la mucosa intestinal y el transporte de sustancias a través de esta barrera. La atrofia en la mucosa inducida por la desnutrición aumenta la permeabilidad a determinadas sustancias y reduce la absorción de algunos nutrientes, aunque esta última puede ser normalizada por diferentes mecanismos regulatorios, entre ellos, incrementar la expresión génica de transportadores, desarrollar modificaciones en el gradiente electroquímico o cambios en la proporción de células maduras/células inmaduras^{17, 96}.

Tal y como se especifica en el Epígrafe 5.4, se detectaron diferencias estadísticamente significativas en la longitud, grosor y peso del intestino delgado de las ratas, siendo menor en animales DN. Asimismo, las

diferencias morfológicas observadas entre los segmentos intestinales procedentes de animales NN y DN fueron mayores en el tramo proximal del mismo.

6.4 *Análisis farmacocinético compartimental*

El objetivo final del análisis farmacocinético poblacional es determinar el modelo farmacocinético más simple que describe aceptablemente el curso temporal de los valores plasmáticos del analito (perfiles cinéticos) y que además ese modelo sea clínicamente adecuado e interpretable.

6.4.1 Modelización de los datos intravenosos

A diferencia de los xenobióticos, la taurina es un aminoácido endógeno, cuya concentración plasmática depende tanto de la síntesis endógena como del aporte externo. Además, se ha descrito que el metabolismo de numerosas moléculas endógenas se modifica por los ritmos circadianos y de vigilia/sueño así como al variar la temperatura del entorno y los niveles de estrés. Teniendo en cuenta estos aspectos y tras evaluar que tras la administración de agua (Figura 5-29) la concentración de aminoácido no presenta variaciones significativas a lo largo del día, se consideró oportuno incorporar en el modelo un parámetro que permitiera caracterizar la concentración basal de taurina y a su vez deslindar este valor del incremento de concentración del aminoácido debido a la

administración exógena de taurina. Este parámetro se ha definido como si se tratara de una velocidad de entrada de aminoácido al organismo constante (Q_0), ya que se asume que la concentración plasmática basal de taurina es el resultado del balance de los procesos de síntesis y degradación del aminoácido en el organismo. Para incorporar a los modelos los niveles endógenos basales de taurina se ha empleado la rutina ADVAN 6 TOL 5 desde los modelos más sencillos, puesto que esta subrutina permite realizar el estudio utilizando ecuaciones diferenciales⁶⁷.

Se implementaron **modelos empíricos** utilizando los modelos farmacocinéticos lineales y no lineales mono y bicompartimental. En los Cuadros 5-4 y 5-5 se muestra algunos de los modelos desarrollados. De acuerdo con la función mínimo objetiva (FMO) y la variabilidad residual (VR), el modelo que mejor describe los datos concentración plasmática-tiempo tras administración de taurina por vía intravenosa es el bicompartimental con eliminación no lineal (aclaramiento en función de la dosis de taurina administrada), tanto en animales NN como DN, con un descenso de la FMO de 20 y 15 unidades, respectivamente, respecto al modelo de eliminación lineal ($p < 0,005$).

Esta tendencia se confirmó con el análisis realizado de forma simultánea con los datos experimentales obtenidos en los animales NN y DN, donde el modelo bicompartimental con eliminación no lineal es el que mejor describe los datos (Cuadro 5-6). Este resultado puede justificarse desde un punto de vista fisiológico, puesto que la taurina se almacena en el líquido intracelular actuando como regulador osmótico y su grado de

eliminación renal experimenta grandes fluctuaciones según las necesidades corporales del aminoácido³⁸.

En esta etapa también se analizaron las variables peso, concentración de albúmina plasmática, estado nutricional (NN o DN) y grado de desnutrición (NN en caso de animales normonutridos, DN leve, DN moderada o DN severa) como covariables predictoras de los parámetros farmacocinéticos de la taurina. Pese a que el peso y la concentración de albúmina plasmática toman valores significativamente inferiores en los animales desnutridos (Figuras 5-13 y 5-14, $p < 0,05$), los modelos ensayados no permitieron poner de manifiesto su capacidad de covariable predictora sobre los parámetros farmacocinéticos evaluados. Los gráficos exploratorios realizados, que enfrentan estas variables frente a los parámetros farmacocinéticos individuales Cl , V_c , Q_0 , K_{12} , K_{21} (Post hoc) no revelaron correlación lineal, exponencial o potencial (datos no mostrados). El hecho de que el peso y la albúmina plasmática no sean covariables predictoras de los parámetros farmacocinéticos de la taurina puede atribuirse a que la magnitud de cambio que se ha producido en estos parámetros, debido a la restricción calórico proteica a la que se ha sometido a los animales, es insuficiente ya que únicamente 34% de los animales incluidos en el estudio farmacocinético poblacional de taurina sufrieron desnutrición severa.

Por las razones indicadas, para cuantificar en adelante los cambios en el proceso de eliminación de la taurina, se utilizó un factor (desnutrido o no, F_{DN}) que permite calcular la magnitud del cambio del parámetro

evaluado debido al estado nutricional de los animales. Con este factor, se analiza la influencia de la desnutrición en los parámetros Q_0 , Cl , V_c , K_{21} y K_{12} (Cuadro 5-7).

De acuerdo con la FMO, la variabilidad residual (VR) y la variabilidad interindividual (VII) de los parámetros, el modelo estructural que mejor describe los datos experimentales es el bicompartimental con eliminación no lineal y dependiente del estado nutricional (modelo 61b, Cuadros 5-7 y 5-8). En los modelos ensayados, el parámetro farmacocinético Q_0 (estrechamente relacionado con el nivel basal de taurina), no está influenciado por el estado nutricional, hecho que concuerda con el análisis de varianza (ANOVA) realizado, en el que no se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre el nivel basal de taurina obtenido en animales NN ($50,97 \pm 14,54$ mg/l) y DN ($48,86 \pm 22,11$ mg/l) ($p > 0,05$).

El área bajo la curva (AUC_{0-2h}) mostró un incremento no proporcional a la dosis administrada; de hecho se obtuvo el mayor incremento de AUC para la mayor de las dosis ensayadas tanto en animales NN como DN (Cuadro 5-9). Este resultado, confirma de nuevo que el proceso de eliminación de la taurina es no lineal. Además los valores de AUC_{0-2h} tras la administración intravenosa de taurina a las dosis empleadas en animales DN confirmaron que la cantidad de taurina en sangre es mayor que en NN (entre un 15,9 y un 47,9%). Este hecho podría estar relacionado con la hipótesis de que en estados carenciales, tras la administración de taurina el organismo intenta rellenar los depósitos corporales limitando su eliminación lo que prolongaría la estancia del aminoácido en plasma⁷⁴.

Los gráficos de bondad de ajuste indican que el modelo seleccionado satisface los datos experimentales obtenidos. Así, en la Figura 5-15 se observa una superposición de las concentraciones experimentales con los valores predichos individuales en función del tiempo, mostrando una buena capacidad predictiva del modelo. En la Figura 5-16 se observa una correlación satisfactoria entre los valores de concentración de taurina (Predicted DV) y los valores de concentración predichos, tanto poblacionales (Predicted DV) como individuales (IPRE DV).

La representación de los residuales poblacionales (Residuals) frente a la concentración plasmática poblacional predicha (Predicted DV, Figura 5-17, A) presenta distribución aleatoria. Los valores de los residuales poblacionales frente a los tiempos experimentales (Time, Figura 5-17, B) informan de una variación mayor de éstos en los tiempos de toma de muestra próximos a la administración, puesto que una pequeña proporción de puntos (alrededor del 6%) se desvía de la línea identidad. En la figura ampliada se observa que la mayoría de puntos se distribuye de forma aleatoria alrededor de la línea de referencia. Cuando se efectúa la ponderación de los mismos (Figura 5-18, A y B) se observa una distribución más homogénea tanto cuando se representan enfrentados a la concentración plasmática poblacional predicha como cuando se representan frente al tiempo, con unos valores comprendidos entre ± 3 . Lo mismo ocurre con los residuales individuales (Individual Residuals, Figura 5-17, C y D) que muestran mayor dispersión pero con distribución aleatoria, y al representar los valores ponderados de los mismos (Individual Weighted

Residuals, Figura 5-18, C y D) se observa una buena correlación y ausencia de sesgo, quedando los valores comprendidos entre ± 1 .

En la etapa de **análisis mecanicista** de datos intravenosos se evaluaron diferentes modelos con aclaramiento que combina procesos lineales (filtración glomerular, TFG), con procesos no lineales (reabsorción tubular pasiva y activa y secreción tubular activa, STA). Los resultados obtenidos en algunos modelos reveló mensajes de sobreparametrización sin obtención de la matriz de varianza /covarianza. Por ello, además de probar modelos en los que la tasa de filtración glomerular era un parámetro a iterar, se consideró adecuado evaluar los mismos modelos fijando la tasa de filtración glomerular al valor descrito en la bibliografía (0,00052 l/h/g)⁷², reduciendo así el número de parámetros farmacocinéticos que debía estimar el modelo.

En los Cuadros 5-10 y 5-11 se recogen los modelos analizados en animales NN o DN. En animales NN el modelo que mejor converge es aquél en el que el proceso de eliminación está compuesto por filtración glomerular y reabsorción tubular activa, dando al primer parámetro libertad para su estimación. En cambio, en animales DN el modelo que mejor describe los datos es el de mayor complejidad, compuesto por filtración glomerular, secreción activa y reabsorción activa, estando la filtración glomerular fijada al valor descrito en la bibliografía⁷². Puesto que el modelo seleccionado en animales NN y DN implica un mecanismo de eliminación distinto para cada estado nutricional, se procedió a realizar el

estudio utilizando la base de datos completa (administración del aminoácido por vía intravenosa).

En el Cuadro 5-12 se muestran, entre los modelos probados, los que convergieron con unos parámetros satisfactorios desde un punto de vista fisiológico. Por ejemplo, no se consideraron aceptables cuando los valores de alguno de los parámetros estimados tomaban valores extremos; por ejemplo valores para la tasa de filtración glomerular inferiores a 10^{-10} l/h o valores de la constante de Michaelis Menten (K_m) superiores a 10^6 mg/l. En el primer caso el parámetro sería despreciable, y por tanto, en el modelo se podría prescindir del proceso de filtración glomerular. En el segundo caso, el valor obtenido carece de sentido por estar sobredimensionado, indicando que el transportador posee una afinidad ínfima por el sustrato y que las concentraciones obtenidas en las condiciones experimentales están lejos de la saturación del sistema enzimático por lo que el proceso se podría evaluar cinéticamente como un proceso pasivo. Muchos de los modelos evaluados no convergieron de forma satisfactoria (Run Terminated). El valor de la tasa de filtración glomerular en los modelos que fue estimada (modelos 73 y 75c) fue de un orden de magnitud despreciable (10^{-6} - 10^{-7} l/h), lo que indica que el proceso de filtración glomerular de la taurina a las dosis ensayadas es minoritario frente a los procesos de secreción y reabsorción tubular activa (modelo 79). Por ello, se seleccionó el modelo 79, en el que la fase de eliminación del aminoácido se caracteriza porque el proceso de excreción renal del aminoácido es el balance de los procesos de secreción y reabsorción activa del aminoácido. Asimismo, al comparar este modelo con el de referencia 62c que posee el

mismo número de parámetros farmacocinéticos (NPPK=8), se corrobora que el modelo seleccionado presenta una mejor bondad de ajuste (el valor de la FMO se reduce 14 unidades ($p < 0,0005$)).

El modelo seleccionado indica que el mecanismo de excreción renal de la taurina es un proceso activo, resultado que en principio parece contradictorio, ya que la taurina es una molécula de tamaño pequeño. Sin embargo, los datos aportados en la bibliografía consultada, entre ellos, la elevada fluctuación que en función de la ingesta y del estado fisiológico experimenta su concentración en orina, así como su importante papel en la regulación de numerosos procesos corporales, no parece descartar que el proceso de eliminación mayoritario sea la secreción activa³⁵. Además, para este aminoácido se ha descrito que su eliminación renal es función de la presencia de iones sodio y cloruro, sugiriendo que en el proceso de eliminación renal de la taurina está implicado un sistema de cotransporte de capacidad limitada⁷⁴.

En el modelo seleccionado se incluye un proceso de reabsorción tubular activa. Este proceso está descrito en la literatura y se atribuye al transportador TauT, capaz de regular la excreción del aminoácido aumentando o disminuyendo la fracción reabsorbida atendiendo a las necesidades del organismo^{74, 97}. De acuerdo con esta descripción, la reabsorción renal activa del aminoácido sería más lucrativa en estados carenciales o de desnutrición.

Por último, en esta fase se evaluó la influencia del estado nutricional sobre los parámetros farmacocinéticos que caracterizan el

modelo seleccionado (modelo 79, Cuadro 5-13). Los modelos probados han permitido poner de manifiesto que el estado nutricional conlleva alteraciones en el proceso de excreción renal del aminoácido, pero con la modelización farmacocinética realizada es difícil determinar qué parámetro o parámetros farmacocinéticos son los más afectados. Matemáticamente se han obtenido varios modelos que a pesar de que convergen de forma satisfactoria son de controvertida significación fisiológica. Así, los modelos 117, 125 y 126 en los que se evaluó la influencia del estado nutricional sobre la capacidad del proceso de secreción tubular activa (Modelo 117, V_{ms}), la afinidad de los transportadores de secreción y reabsorción tubular activa (modelo 125, K_{ms} y K_{mr}) o la capacidad de los transportadores de secreción y reabsorción tubular así como la afinidad por el transportador de secreción tubular (modelo 126, V_{ms} , V_{mr} y K_{mr}) son los modelos que ofrecen valores de FMO y VR que presentan diferencias estadísticamente significativas respecto el modelo de referencia (modelo 79, secreción y reabsorción activa sin alteración en los parámetros farmacocinéticos debida al estado nutricional), y además presentan un significado fisiológico aceptable.

La selección objetiva del modelo se realizó después de evaluar la estabilidad de los modelos anteriormente indicados mediante la técnica de remuestreo *bootstrap*. Este procedimiento considera que la estabilidad del modelo es adecuada si el porcentaje de iteraciones que permiten estimar los parámetros farmacocinéticos es superior a un 65%, siendo más estable el modelo que obtiene un mayor porcentaje de convergencias con éxito⁶⁷.

El modelo 117, en el que la capacidad del proceso de secreción tubular activa (V_{ms}) disminuye en estado de desnutrición, alcanzó un 68,4% de terminaciones con éxito, y los valores medios de los parámetros farmacocinéticos así como sus variabilidades quedaron englobados en el percentil 95%. Los otros dos modelos, el 125 (afinidad de los transportadores de secreción y reabsorción tubular activa K_{ms} y K_{mr} en función del estado nutricional) y el 126 (capacidad de los transportadores de secreción y reabsorción tubular así como la afinidad por el transportador de secreción tubular V_{ms} , V_{mr} y K_{mr} en función del estado nutricional, respectivamente) no fueron estables, ya que únicamente finalizaron con éxito un 41,6 y un 3,6%, respectivamente, de las iteraciones realizadas. Estos resultados permiten concluir que la fase de disposición de la taurina se describe adecuadamente con el modelo bicompartimental caracterizado por un proceso de distribución pasiva desde el compartimento central al compartimento periférico y de retorno del compartimento periférico al central y un proceso de excreción renal compuesto, a su vez, por los procesos de reabsorción y secreción activa, en la que la capacidad de éste último proceso (V_{ms}) disminuye un 9,4% en estado de desnutrición (Cuadro 5-14).

6.4.2 Modelización global de los datos

Una vez caracterizada la fase de disposición del aminoácido se procedió a evaluar la **fase de absorción**. Se fijaron los parámetros farmacocinéticos de disposición obtenidos en el análisis empírico de los

datos obtenidos tras administración de la taurina por vía intravenosa (61b) y se describió el proceso de absorción del aminoácido.

Entre los diferentes modelos ensayados y atendiendo a los valores de la FMO y la variabilidad residual, en la **modelización empírica** de los datos obtenidos tras la administración oral de taurina a los animales NN no se observan diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 5-15). Por ello, se seleccionó el modelo más sencillo en el que el proceso de absorción de la taurina en animales NN es lineal. En cambio el modelo empírico que mejor satisface los datos experimentales obtenidos en animales DN indica que la constante de velocidad de absorción aparente de la taurina disminuye alrededor de un 50% al administrar la dosis mayor de las ensayadas (100 mg) respecto al valor de la constante de velocidad de absorción aparente cuando se administra el aminoácido a las dosis inferiores (1 y 10 mg, Cuadro 5-16, modelo 133bDN1). Este comportamiento indica la presencia de al menos un proceso no lineal (absorción o secreción intestinal) en la incorporación del aminoácido al organismo.

Por otra parte, conviene destacar que en los modelos en los que se evalúa la dependencia del proceso de absorción con la dosis administrada, tanto en NN como en DN, la constante de velocidad de absorción del aminoácido a la dosis de 1 mg toma valores que oscilan entre $6 \cdot 10^{-5}$ y $5 \cdot 10^{-7} \text{ h}^{-1}$, probablemente debido a que la concentración plasmática de taurina tras administrar por vía oral 1 mg del aminoácido experimenta una oscilación respecto a la concentración basal de aminoácido tan ligera que

dificulta la convergencia de los modelos y la caracterización de la no linealidad en el proceso de absorción. Teniendo en cuenta que los niveles plasmáticos de taurina no varían en exceso al incrementar la cantidad de la molécula ingerida en la dieta⁷⁴, no es de extrañar que en este estudio los niveles plasmáticos del aminoácido obtenidos tras la administración de las dosis de 1 y 10 mg no se incrementen por encima del nivel basal de forma significativa y únicamente lo hagan cuando se administra la dosis más elevada de las ensayadas (100 mg).

Por último el ajustado global realizado de forma simultánea en el conjunto de la población NN y DN presenta la misma tendencia observada en animales DN, en los que la constante de absorción aparente K_{ap} disminuye al administrar la dosis de 100 mg de taurina (133DNd, Cuadro 5-17). No obstante, los parámetros estadísticos utilizados para realizar la selección del modelo no mostraban diferencias estadísticamente significativas con los obtenidos en el modelo de absorción lineal.

Por consiguiente, los datos aportados en esta Memoria de Tesis Doctoral indican que el proceso de absorción de taurina se describe mediante una cinética de primer orden y en estado de desnutrición la constante de velocidad que rige el proceso tiene un valor equivalente al obtenido en NN (Cuadro 5-17, $\Delta FMO=3,2$). Pese a las modificaciones anatomo-fisiológicas observadas en este estudio y a que se identifica una tendencia que indica que la absorción de taurina es menor en animales DN que NN, las diferencias observadas no son estadísticamente significativas ($p>0,05$).

Este hecho está en concordancia con algunos estudios desarrollados en pacientes afectados de anorexia nerviosa, en la que acontece una importante restricción en la ingesta de alimentos que conlleva a desnutrición severa, sin que se altere la absorción intestinal o la función pancreática⁹⁸.

Al segregar a los animales por estado nutricional, **el análisis mecanicista** concluye que el mecanismo que mejor describe la cinética de absorción del aminoácido en ambos estados nutricionales es la difusión pasiva, ya que no se observa una mejora en la FMO estadísticamente significativa cuando se aumenta la complejidad del modelo y se incluyen procesos de absorción activa (Cuadros 5-18 y 5-19).

Los resultados obtenidos en esta fase con el conjunto de datos (NN y DN, Cuadro 5-20) corroboran los obtenidos en la etapa anterior, siendo la cinética de primer orden la que mejor describe el mecanismo de absorción del aminoácido (Modelo 150b). Además, el modelo en el que se evaluó la influencia del estado nutricional en el proceso de absorción de la taurina (153b) no reveló diferencias estadísticamente significativas ($\Delta FMO < 3,8$) respecto al modelo de referencia (modelo 150b), por lo que con los datos disponibles se puede afirmar que el grado de desnutrición alcanzado en los animales no altera la fase de absorción de la taurina. En el Cuadro 5-21 se muestran los parámetros, variabilidades (VII y VR), coeficiente de variación (CV%) y FMO obtenidos para el modelo seleccionado.

Los gráficos de bondad de ajuste (Figuras 5-23 a 5-26), y la estabilidad del modelo determinada mediante la técnica de remuestreo

aleatorio *bootstrap* (Cuadro 5-22) indican que el modelo seleccionado es satisfactorio. El análisis *bootstrap* se realizó dejando libertad para la estimación de todos los parámetros farmacocinéticos del modelo 150b alcanzando en estas condiciones un 81% de minimizaciones con éxito. En resumen, los datos experimentales obtenidos tras la administración oral de las dosis ensayadas de taurina aportados en esta Tesis Doctoral no permiten evidenciar el mecanismo no lineal de absorción descrito en la bibliografía⁹⁹. En ella se afirma que el mecanismo de absorción de la taurina se describe mediante una cinética combinada de absorción pasiva y absorción activa mediada por transportadores, como el PAT1 o TauT⁹⁹. El TauT, transportador de alta afinidad y baja capacidad, se encuentra en el borde en cepillo de los enterocitos encargados de la absorción de nutrientes en el intestino. Es probable que el proceso de absorción activa de la taurina no se haya podido poner de manifiesto con los datos experimentales obtenidos en este trabajo debido a que por su baja capacidad en las condiciones de ensayo se encuentre saturado¹⁰⁰.

La actividad de este transportador parece ser mayor en animales más jóvenes que en los adultos, debido a que en éstos el sistema enzimático encargado de su síntesis es más inmaduro, por lo que la desnutrición que en el adulto parece no alterar el transporte del aminoácido, podría ocasionar alteraciones más apreciables en sujetos en desarrollo o en adultos con un estado nutricional más deteriorado⁹.

En la representación de los valores de concentración de taurina observados frente a los predichos (Figura 5-24) la recta de regresión (línea

roja) se desvía ligeramente de la línea identidad (línea negra). En la Figura 6-1 se representa de nuevo esta figura sustituyendo los puntos por el identificador de cada animal empleado.

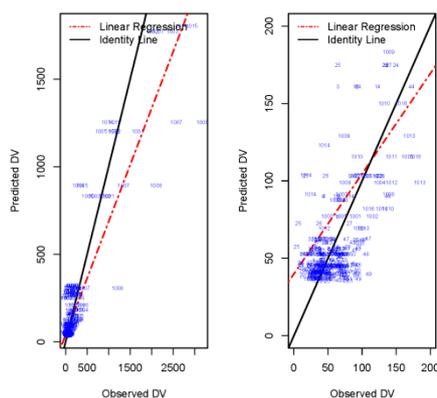


Figura 6-1. Representación de las concentraciones predichas por el modelo final (150b) frente a las concentraciones observadas.

Los animales con identificador igual o superior a 1000 unidades son los que recibieron la dosis de 100 mg por vía oral o intravenosa, NN y DN. (Figura 6.1, izquierda). La desviación de la línea de regresión infraestima ligeramente los valores de mayor concentración, probablemente debido a la gran variabilidad obtenida en este grupo de población y al menor número de animales en los grupos que recibieron la dosis elevada. La desviación de la línea se atribuye al mayor peso en la regresión de los puntos de alto valor, desviando ligeramente la línea identidad. Sin embargo, cuando se observa la figura ampliada para el ámbito de valores de concentración inferior se observa que los puntos se distribuyen de forma equilibrada en torno a la línea identidad (Figura 6-1, derecha). Esta

observación se anula en el resto de gráficas de bondad de ajuste en las que se utilizan los residuales ponderados. Por consiguiente, se puede afirmar que la bondad de ajuste indica que el modelo seleccionado es satisfactorio.

El modelo indica que la capacidad de eliminación del aminoácido se reduce alrededor de un 10% en animales DN respecto animales NN, y que esta reducción se produce en la capacidad del transportador de secreción (Vms). Este hecho concuerda con lo observado en la bibliografía, en la que en estados carenciales o de bajo aporte de taurina, se reduce la cantidad excretada por orina para regular y mantener la reserva corporal del aminoácido^{9,97}.

6.5 Simulación de datos: Validación externa.

Con objeto de validar el modelo farmacocinético obtenido para la taurina en esta Memoria y comprender el grado de predicción de las concentraciones plasmáticas de aminoácido, se ha simulado una población que recibe una dosis de taurina igual a la administrada con los preparados enterales, y se ha realizado un análisis de validación externa utilizando el método de análisis predictivo visual (Visual predictive check, Figura 5-27 y Figura 5-28).

Los resultados muestran que las concentraciones plasmáticas predichas con el modelo seleccionado para las dosis de taurina de 0,22 o 0,58 mg están sobreestimadas, observando que los valores medios predichos por el modelo están muy próximos a los valores de la

concentración plasmática basal de taurina obtenida en los animales a los que se les administró la taurina en solución libre ($50,97 \pm 14,54$ mg/l y $48,86 \pm 22,11$ mg/l en animales NN y DN, respectivamente). Estos valores difieren significativamente de las concentraciones plasmáticas basales determinadas en los animales a los que se les administró las dietas enterales ($26,12 \pm 12,50$ mg/l en animales NN y de $21,49 \pm 10,89$ mg/l en animales DN), quizá debido a que los estudios se realizaron de forma secuencial y entre uno y otro periodo se renovó la colonia del animalario de la Facultad de Farmacia. Por esta razón, se repitió el ejercicio de simulación utilizando un valor de Q_0 (constante de velocidad de formación de taurina endógena en plasma, mg/h) equivalente al 50% del valor del parámetro obtenido en el modelo farmacocinético seleccionado (Figura 5-28). En este caso, la línea que representa el percentil 50% de las concentraciones plasmáticas predichas sigue con bastante exactitud la tendencia central de los puntos experimentales quedando excluidos del intervalo de confianza 95% un número de valores experimentales del mismo orden en los dos ejercicios de simulación. Este resultado pone de relieve la importancia de disponer de un valor de concentración plasmática basal del aminoácido que se ajuste al valor real de la población objeto de estudio, al menos cuando se trata de conocer los cambios de concentración plasmática de aminoácido que se producen tras la administración de dosis de aminoácido inferiores a 1 mg.

Otro aspecto a considerar es el hecho de que los valores de concentración plasmática predichos, al igual que los experimentales, no presentan diferencias significativas respecto de la concentración

plasmática basal. Este resultado parece indicar que la administración de la cantidad de taurina que contienen las dietas enterales no es capaz de modificar la concentración basal del aminoácido como tampoco lo ha sido tras la administración del aminoácido por vía oral en solución acuosa a las dosis de 1 y 10 mg.

6.6 Preparados enterales

La magnitud de la absorción de taurina tras la administración de los preparados enterales en régimen de dosis única se ha realizado mediante el cálculo del área bajo la curva de concentración plasmática tiempo desde tiempo igual a cero hasta tiempo igual a 4 horas (AUC_{0-4h}). El intervalo seleccionado cuando el preparado se administra en régimen de dosis múltiple fue de 6 a 8 horas (AUC_{6-8h}), puesto que ya había transcurrido un tiempo superior a cuatro valores de la semivida biológica del aminoácido en la especie animal estudiada (en rata $t_{1/2} \leq 1,30$ horas). El valor de este parámetro es similar al obtenido en un estudio realizado con 8 humanos sanos tras la administración oral de 4 g de taurina, en la que la $t_{1/2}$ se estableció en $1,0 \pm 0,3$ horas⁹².

Como paso previo al cálculo de los parámetros farmacocinéticos no compartimentales t_{max} , C_{max} y AUC, se exploraron las **curvas de concentración plasmática de taurina** obtenidas en los tiempos de muestreo.

La concentración plasmática basal del aminoácido obtenida en el grupo de animales a los que se les administran los preparados enterales en régimen de dosis única presenta diferencias estadísticamente significativas entre animales DN y NN, siendo menor el valor obtenido en los primeros. Este hecho concuerda con lo observado en otros estudios, en los que los niveles corporales de taurina en estados carenciales son menores a los obtenidos cuando se aporta una alimentación variada y adecuada³⁸.

Tanto en condiciones de NN como de DN, se observa que los niveles plasmáticos de taurina tras la administración de los preparados enterales no difieren significativamente del perfil que se obtiene tras la administración de agua ($p>0,05$, Figura 5-31). En animales NN, los perfiles llegan a solaparse, mientras que en estado de DN se observa una ligera superioridad de los preparados enterales respecto al agua, sobretodo del preparado enriquecido T-Diet Plus[®]. Al estudiar la influencia del estado nutricional sobre los perfiles plasmáticos del aminoácido, se observa una gran similitud entre animales NN y DN tras la administración tanto de agua como de las dietas enterales, con la puntualización de que los niveles plasmáticos medios en los animales NN son superiores a los obtenidos en animales DN (Figura 5-32).

Los valores medios de concentración plasmática tras la administración del agua y los preparados enterales, en régimen de dosis múltiple, presentaron menor variabilidad. A diferencia de los animales incluidos en el régimen de administración de una dosis única, las concentraciones plasmáticas basales de taurina determinadas en los

animales NN y DN no presentaron diferencias estadísticamente significativas, pese a que mostraron un valor ligeramente superior en animales NN.

Como se observa en la Figura 5-35 los preparados enterales proporcionan niveles plasmáticos de taurina superiores a los del agua tanto en NN como en DN, obteniendo el mayor incremento tras la administración de T-Diet Plus®, lo que evidencia la potencial superioridad del suplemento de la dietas con taurina cuando se administra en estados carenciales de forma continuada.

6.6.1 Análisis farmacocinético

En condición de NN y DN, la administración de una **dosis única** de dieta enteral no produce un cambio significativo en los valores de t_{max} y C_{max} respecto a la administración de agua. Se observa que tanto en NN como en DN el t_{max} tiende a ser menor tras la administración del preparado T-Diet Plus® (Figura 5-37). Sin embargo, la elevada variabilidad de los valores obtenidos dificulta la interpretación de estos resultados. Los valores de C_{max} en animales DN son ligeramente inferiores a los obtenidos en animales NN, y en ambos estados nutricionales, el menor valor de C_{max} se alcanza tras la administración de agua, seguido por el obtenido tras la administración del preparado no enriquecido Isosource-ST®, y tras la administración del preparado enriquecido T-Diet Plus® (Figura 5-38). Estos valores de C_{max} se correlacionan con la cantidad de taurina que contienen las dietas enterales.

Los valores de AUC obtenidos tras la administración de los preparados enterales en régimen de dosis única no permiten cuantificar el valor añadido del aminoácido incorporado a los preparados (Cuadro 5-26), sugiriendo además, que el enriquecimiento de taurina realizado en la formulación TDiet Plus® no refleja un comportamiento distinto al obtenido tras la administración de la dieta no enriquecida.

El ligero aumento observado en las AUC obtenidas tras la administración de los preparados enterales puede atribuirse a la disminución que experimenta el aclaramiento de la taurina en estado de desnutrición, ya que el modelo farmacocinético poblacional de la taurina obtenido en esta Memoria determina que la Velocidad máxima del transportador de secreción (V_{ms}) en estado de desnutrición se reduce alrededor de un 10%.

Los valores medios de t_{max} , C_{max} y AUC_{6-8h} tras la administración de los preparados en régimen de **dosis múltiple** presentaron menor variabilidad que los obtenidos en régimen de administración de dosis única, lo que facilitó la interpretación de los resultados.

Los valores de t_{max} obtenidos en animales NN y DN tras la administración de agua fueron mayores que los obtenidos tras la administración de los preparados enterales (Cuadro 5-27, Cuadro 5-28 y Cuadro 5-29). Asimismo, los valores de C_{max} tras a administración de los preparados en régimen de dosis múltiples siguen una tendencia similar a la observada tras la administración de agua y las dietas enterales en dosis única, en la que el valor de C_{max} es mayor tras la administración de las

dietas enterales que tras la administración de agua, y a su vez, mayor tras la administración del preparado enriquecido T-Diet Plus® que tras la administración del preparado no enriquecido Isosource-ST®.

Puesto que no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los parámetros farmacocinéticos obtenidos en animales NN y los obtenidos en animales DN se realizó un análisis univariante, sin tener en cuenta el estado nutricional de los animales. Este análisis, puso de manifiesto que el Cmax obtenido tras la administración de agua se diferencia del obtenido tras la administración de T-Diet Plus® ($p < 0,05$) y confirma que en las condiciones ensayadas el estado nutricional de los animales no condiciona los parámetros farmacocinéticos estudiados.

La administración de la dieta enriquecida T-Diet Plus® en régimen de dosis múltiple produce una exposición del aminoácido mayor que la obtenida tras la administración de la dieta no enriquecida tanto en animales NN como DN (Cuadro 5-30), evidenciando un mayor aprovechamiento del preparado enriquecido con taurina en estado de DN. Este resultado refuerza y justifica el hecho de que para el tratamiento de pacientes con carencias nutricionales moderadas o severas se seleccionen en primera línea de tratamiento preparados enterales enriquecidos administrados en regímenes de dosis múltiple y se reserven los preparados no enriquecidos para situaciones carenciales más leves.

En el estudio realizado no se evidencia el **valor añadido** de la dieta enteral en estado de NN en régimen de dosis única y el mayor cambio se ha obtenido tras la administración del preparado T-Diet Plus® (régimen de

dosis múltiple, incremento del 32,7% en NN, 41,7% en DN y tras la administración de la dieta Isosource-ST®, régimen de dosis múltiple, el incremento fue del 14,1% en NN, 17,4% en DN). Sin embargo, los resultados obtenidos indican que la mayor exposición al aminoácido tras la administración de los preparados no es proporcional a la cantidad de taurina que contienen. Es posible que la capacidad homeostática del organismo para mantener los valores de concentración plasmática de taurina dentro del ámbito de la normalidad contribuya a que no se observen diferencias mayores, por lo que si se confirmara esta hipótesis la importancia del parámetro AUC como único criterio para la selección de los preparados enterales es limitada. En nuestra opinión, creemos que los estudios encaminados a cuantificar el valor añadido de las fórmulas enterales, enriquecidas o no con un nutriente, deben contemplar además del perfil cinético del nutriente en plasma sanguíneo la cuantificación de la sustancia objeto de ensayo en órganos y tejidos donde se acumule del nutriente las cantidades de aminoácido en tejidos. Únicamente a partir de la información global se podría explicar de forma más fehaciente las diferencias que se desarrollan en el sistema biológico derivadas del estado de nutrición y condicionan la exposición del organismo a los nutrientes administrados.

6.7 Limitaciones del estudio

El modelo de desnutrición empleado en este estudio está basado en los biomarcadores peso y albúmina plasmática⁶¹. El marcador bioquímico

albúmina puede experimentar fluctuaciones entre poblaciones, y por ello es necesario establecer los valores de normalidad en los animales que constituyen la población de estudio. En esta Memoria, se ha observado que los niveles plasmáticos de albúmina de los animales utilizados para el estudio de las dietas enterales son significativamente menores ($p < 0,05$) que obtenidos en los animales empleados para el estudio farmacocinético de taurina en solución, tanto en estado de NN como de DN. En consecuencia, a la mayoría (89%) de animales DN que han formado parte de la evaluación de las dietas enterales se les asignó un grado de desnutrición severa, mientras que a la mayoría (66%) de los animales DN que se han utilizado para caracterizar el perfil farmacocinético del aminoácido se les asignó un grado de desnutrición leve o moderada. Con la información experimental disponible no podemos explicar estas diferencias, ya que las condiciones de mantenimiento de los animales a lo largo del periodo de acondicionamiento fueron siempre las mismas. Ahora bien, se debe remarcar que los experimentos se llevaron a cabo a lo largo de un periodo de tiempo en el que la colonia de animales del SCSIE de la Universitat de València fue renovada, por lo que podemos asegurar que los animales empleados en cada una de las fases del estudio proceden de poblaciones diferentes. Este hecho puede justificar las diferencias obtenidas entre ambos grupos tanto en la concentración plasmática de albúmina como en la concentración plasmática basal de taurina y evidencia la necesidad de normalizar ambos valores en cada población de estudio.

La caracterización farmacocinética del aminoácido en las condiciones de estudio ha sido compleja. Entre los factores que han podido contribuir a esta complejidad cabe resaltar la variabilidad de los valores de concentración plasmática obtenidos tras administrar la dosis más elevada de taurina (100 mg) (mayor a la obtenida tras la administración de las dosis inferiores), y la limitada fluctuación de las concentraciones plasmáticas del aminoácido tras administrar las dosis inferiores de aminoácido ensayadas (0,22, 0,58, 1 ó 10 mg) en las diferentes matrices (agua o dieta enteral).

Pese a ello, consideramos que el modelo farmacocinético presentado permite aportar conocimiento al mecanismo de los procesos del LADME de la taurina en rata y evaluar la modificación que se origina en los parámetros farmacocinéticos del aminoácido como resultado de un déficit nutricional. En cualquier caso, se piensa que esta Memoria aporta conocimiento a la práctica clínica de incorporar taurina libre a los preparados de nutrición enteral al confirmar el valor añadido de la utilización de preparados enriquecidos con taurina, en estados carenciales y en régimen de dosis múltiple.

7 CONCLUSIONES

1. El protocolo de desnutrición empleado permite disponer de un modelo de desnutrición animal sencillo y útil para evaluar la influencia del estado nutricional de los animales sobre los parámetros cinéticos de fármacos y nutrientes.
2. Los niveles de albúmina plasmática y la evolución del peso corporal pueden considerarse biomarcadores útiles para gradar los tipos de desnutrición calórico-proteíca de los animales (leve, moderada y severa).
3. El área bajo la curva de concentración plasmática tiempo (AUC_{0-2h}) obtenida tras la administración del aminoácido taurina, por vía intravenosa, revela un incremento no proporcional a la dosis administrada, tanto en animales normo como desnutridos.
4. El análisis farmacocinético empírico indica que el modelo estructural que mejor describe los datos experimentales es el bicompartimental con eliminación no lineal y dependiente del estado nutricional.
5. El análisis farmacocinético mecanicista concluye que la fase de disposición de la taurina se describe mediante un modelo bicompartimental con distribución pasiva y con excreción renal compuesta por procesos de reabsorción y secreción activa. En estado de desnutrición la capacidad del proceso de secreción activa se reduce un 10%.

6. La modelización farmacocinética empírica tras administración del aminoácido taurina por vía oral indica que su absorción es ligeramente inferior en animales desnutridos aunque las diferencias con los valores obtenidos en animales normonutridos no son estadísticamente significativas.
7. La modelización farmacocinética mecanicista tras administración del aminoácido por vía oral indica que el proceso de absorción de taurina se describe mediante una cinética de primer orden y en estado de desnutrición la constante de velocidad que rige el proceso tiene un valor equivalente al obtenido en normonutrición.
8. En estado de desnutrición, la administración de la dieta enriquecida con taurina T-Diet Plus® en régimen de dosis múltiple proporciona un incremento del AUC_{6-8h} del 41,7% respecto al AUC_{6-8h} basal del aminoácido.

8 ANEXOS

8.1 Aprobación del comité ético

VNIVERSITAT
ID VALÈNCIA
Vicerectorat d'Investigació i Política Científica

DR. PEDRO CARRASCO SORLÍ
Presidente del Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de
la Comisión de Ética de la Universitat de València

CERTIFICA:

Que, reunido el Comité Ético de Experimentación y Bienestar Animal de la Comisión de Ética de la Universitat de València el día 31 de octubre de 2008, acordó informar FAVORABLEMENTE la realización en sus instalaciones del protocolo de experimentación animal, presentado en el proyecto titulado **“Caracterización de la biodisponibilidad en ratas desnutridas de nutrientes constituyentes de un preparado enteral: T Diet Plus”**, cuya investigadora principal es Dña. Matilde Merino Sanjuán.

En Valencia, a 31 de octubre de 2008.



8.2 Archivo control del modelo final (150b)

```
;; 1. Based on: tau100_117
;; 2. Description: TAU IV y ORAL
;; x1. Author: ANAC
$PROB    TAU IV=1, 10 y 100, NNYDN, BC
$INPUT  ID NUT GRUP VIA AMT TIME DV MDV CMT ALB1
ALB2 PES1 PES2 SCO D
$DATA    tau100nD.csv IGNORE="#"
$SUBROUTINES  ADVAN6 TOL=5
$MODEL
COMP=(CP)
COMP=(PERI)
COMP=(OR)

$PK
GR1=0
GR2=0
GR3=0
GR4=0
GR5=0
GR6=0
GR7=0
GR8=0
GR9=0
GR10=0
GR11=0
GR12=0

IF (GRUP.EQ.1)  GR1=1
IF (GRUP.EQ.2)  GR2=1
IF (GRUP.EQ.3)  GR3=1
IF (GRUP.EQ.4)  GR4=1
IF (GRUP.EQ.5)  GR5=1
IF (GRUP.EQ.6)  GR6=1
IF (GRUP.EQ.7)  GR7=1
```

```
IF (GRUP.EQ.8) GR8=1
IF (GRUP.EQ.9) GR9=1
IF (GRUP.EQ.10) GR10=1
IF (GRUP.EQ.11) GR11=1
IF (GRUP.EQ.12) GR12=1

; **DISPOSICIÓN**
TVQ0=THETA(1)
Q0=TV Q0*EXP(ETA(1))
TVV=THETA(2)
VC=TVV*EXP(ETA(2))
TVk12=THETA(3)
K12=TVk12*EXP(ETA(3))
TVK21=THETA(4)
K21=TVK21*EXP(ETA(4))

; **ELIMINACIÓN**
TVVMs=THETA(5)*THETA(9)**NUT
VMs=TVVMs*EXP(ETA(5))
KMs=THETA(6)
VMr=THETA(7)
KMr=THETA(8)
CLi=(VMs/KMs-VMr/KMr)

; **RELACIONES Y ACTIVACIÓN COMP**
CS=(Q0/CLi)
A_INITIAL(1)=CS*VC

; **ORAL**
TVKA=THETA(10)
KA=TVKA*EXP(ETA(6))

; **PARAMETROS DERIVADOS**
S1=VC

$DES
; **DEFINICIONES**
CP=A(1)/VC
```

```

; **DISTRIBUCION**
PERI=-K12*A(1)+K21*A(2)

; **ABSORCION ORAL**
VAB31=KA*A(3)

; **VELOCIDAD ELIMINACION**
VEL=((VMS/(KMS+CP))-(VMR/(KMR+CP)))*CP

; **COMPARTIMENTOS**
DADT(1)Q0-VEL+PERI+VAB31
DADT(2)=-PERI
DADT(3)=-VAB31

```

```

$THETA
(1,13.7,100) ; Q0
(0.005,0.0416,1) ; VC
(0,1,2.61,100,1000); K12
(0,01,0.73,1000) ; K21
(1,192,1000) ; VMS
(1,399,10000) ; KMS
(1,16.9,1000) ; VMr
(1,96.1,10000) ; KMr
(0,001,0.906,100) ; FVMS
(0.001,1.2,1000) ; KA

```

```

$OMEGA
0.06605 ; CVQ0
0.256 ; CVVc
1.44962 ; CVK12
0.8724 ; CVK21
0.0292 ; CVVMS
0.36 ; KA

```

```

$ERROR
IPRE=(A(1))/VC
Y=IPRE*EXP(EPS(1))

```

```

IRES=DV-Y
PES=Y+0.000001
IWRE=IRES/PES

$SIGMA 0.04
$EST  MAXEVAL=9000  PRINT=0  POSTHOC  NOABORT
MSFO=mspp01.msf
$WARN WARN=NONE
$COV

$TABLE ID GRUP VIA AMT TIME DV MDV SCO IPRE IRES
IWRE NOPRINT
ONEHEADER FILE=sdtabtau100_150b.txt
$TABLE ID GRUP NUT ALB1 ALB2 PES1 PES2 SCO Q0 VC
VMs KMs VMr KMr
CS K12 K21 CLI SCO FIRSTONLY NOPRINT ONEHEADER
FILE=patabtau100_150b.txt

```


9 REFERENCIAS

1. Grover Z, Ee LC: Protein energy malnutrition, *Pediatr Clin North Am* 2009, 56:1055-1068
2. Waitzberg DL, Ravacci GR, Raslan M: [Hospital hyponutrition], *Nutr Hosp* 2011, 26:254-264
3. Ray S, Laur C, Golubic R: Malnutrition in healthcare institutions: A review of the prevalence of under-nutrition in hospitals and care homes since 1994 in England, *Clin Nutr* 2013, 10:1-7
4. Wanden-Berghe C, Ermelinda Camilo M, Culebras J: Conceptos y definiciones de la desnutrición iberoamericana, *Nutr Hosp* 2010, (Supl 3):1-9
5. Barker LA, Gout BS, Crowe TC: Hospital malnutrition: prevalence, identification and impact on patients and the healthcare system, *Int J Environ Res Public Health* 2011, 8:514-527
6. Genton L, Pichard C: Protein catabolism and requirements in severe illness, *Int J Vitam Nutr Res* 2011, 81:143-152
7. Venegas Moreno E, Soto Moreno A, Pereira Cunill JL, Garcia Peris P, Leon Sanz M, Pita Merce AM, Garcia-Luna PP: [Patients at risk for malnutrition in primary care. Social and health study], *Nutr Hosp* 2001, 16:1-6
8. Debnath A, Bhattacharjee N: Factors Associated with Malnutrition among Tribal Children in India: A Non-Parametric Approach, *J Trop Pediatr* 2014, 60:1-5
9. Gil Hernández Á, Planas Vila M: Tratado de nutrición. Tomo IV, Nutrición clínica. Edited by Madrid, Médica Panamericana, 2005
10. Castiglia PT: Protein-energy malnutrition (kwashiorkor and marasmus), *J Pediatr Health Care* 1996, 10:28-30
11. Muller O, Krawinkel M: Malnutrition and health in developing countries, *CMAJ* 2005, 173:279-286
12. Elia M: Hunger disease, *Clin Nutr* 2000, 19:379-386
13. Jen M, Yan AC: Syndromes associated with nutritional deficiency and excess, *Clin Dermatol* 2010, 28:669-685
14. Garcia Rada A: Child poverty and malnutrition rise in Spain as austerity measures bite, *BMJ* 2013, 347:f5261
15. Saunders J, Smith T: Malnutrition: causes and consequences, *Clin Med* 2010, 10:624-627

16. Hossain MI, Nahar B, Hamadani JD, Ahmed T, Roy AK, Brown KH: Intestinal mucosal permeability of severely underweight and nonmalnourished Bangladeshi children and effects of nutritional rehabilitation, *J Pediatr Gastroenterol Nutr* 2010, 51:638-644
17. Ferraris RP, Carey HV: Intestinal transport during fasting and malnutrition, *Annu Rev Nutr* 2000, 20:195-219
18. Ziegler TR, Evans ME, Fernandez-Estivariz C, Jones DP: Trophic and cytoprotective nutrition for intestinal adaptation, mucosal repair, and barrier function, *Annu Rev Nutr* 2003, 23:229-261
19. Lee JH, Suh OK, Lee MG: Pharmacokinetic changes in drugs during protein-calorie malnutrition: correlation between drug metabolism and hepatic microsomal cytochrome P450 isozymes, *Arch Pharm Res* 2004, 27:693-712
20. McLaren DS, Burman D: Textbook of paediatric nutrition. Edited by Churchill Livingstone, 1991, p. pp. 357-390
21. Detsky AS, Baker JP, O'Rourke K, Johnston N, Whitwell J, Mendelson RA, Jeejeebhoy KN: Predicting nutrition-associated complications for patients undergoing gastrointestinal surgery, *JPEN J Parenter Enteral Nutr* 1987, 11:440-446
22. Guigoz Y, Lauque S, Vellas BJ: Identifying the elderly at risk for malnutrition. The Mini Nutritional Assessment, *Clin Geriatr Med* 2002, 18:737-757
23. Ignacio de Ulibarri J, Gonzalez-Madrono A, de Villar NG, Gonzalez P, Gonzalez B, Mancha A, Rodriguez F, Fernandez G: CONUT: a tool for controlling nutritional status. First validation in a hospital population, *Nutr Hosp* 2005, 20:38-45
24. Kondrup J, Rasmussen HH, Hamberg O, Stanga Z: Nutritional risk screening (NRS 2002): a new method based on an analysis of controlled clinical trials, *Clin Nutr* 2003, 22:321-336
25. Stratton RJ, Hackston A, Longmore D, Dixon R, Price S, Stroud M, King C, Elia M: Malnutrition in hospital outpatients and inpatients: prevalence, concurrent validity and ease of use of the 'malnutrition universal screening tool' ('MUST') for adults, *Br J Nutr* 2004, 92:799-808
26. Rubenstein LZ, Harker JO, Salva A, Guigoz Y, Vellas B: Screening for undernutrition in geriatric practice: developing the short-form mini-nutritional assessment (MNA-SF), *J Gerontol A Biol Sci Med Sci* 2001, 56:366-372

27. Weimann A, Braga M, Harsanyi L, Laviano A, Ljungqvist O, Soeters P, Jauch KW, Kemen M, Hiesmayr JM, Horbach T, Kuse ER, Vestweber KH: ESPEN Guidelines on Enteral Nutrition: Surgery including organ transplantation, *Clin Nutr* 2006, 25:224-244
28. Matarese LE, Gottschlich MM: *Nutrición clínica práctica*. Madrid, Edited by Elsevier, 2004
29. Martinez Augustin O, Martinez de Victoria Munoz E: Proteins and peptides in enteral nutrition, *Nutr Hosp* 2006, 21 Suppl 2:1-13, 11-14
30. SENPE: Área divulgativa: <http://www.senpe.com/divulgacion.html>. Edited by Sociedad Española de Nutrición Parenteral y Enteral, 2012
31. Klek S, Sierzega M, Szybinski P, Szczepanek K, Scislo L, Walewska E, Kulig J: The immunomodulating enteral nutrition in malnourished surgical patients - a prospective, randomized, double-blind clinical trial, *Clin Nutr* 2011, 30:282-288
32. Van de Poll MC, Dejong CH, Soeters PB: Adequate range for sulfur-containing amino acids and biomarkers for their excess: lessons from enteral and parenteral nutrition, *J Nutr* 2006, 136:1694-1700
33. Laidlaw SA, Kopple JD: Newer concepts of the indispensable amino acids, *Am J Clin Nutr* 1987, 46:593-605
34. Pubchem: Taurine - Compound Summary. Edited by USA, National Center for Biotechnology Information (NCBI), 2013
35. Broer S: Amino acid transport across mammalian intestinal and renal epithelia, *Physiol Rev* 2008, 88:249-286
36. O'Flaherty L, Stapleton PP, Redmond HP, Bouchier-Hayes DJ: Intestinal taurine transport: a review, *Eur J Clin Invest* 1997, 27:873-880
37. Voss JW, Pedersen SF, Christensen ST, Lambert IH: Regulation of the expression and subcellular localization of the taurine transporter TauT in mouse NIH3T3 fibroblasts, *Eur J Biochem* 2004, 271:4646-4658
38. Lambert IH: Regulation of the cellular content of the organic osmolyte taurine in mammalian cells, *Neurochem Res* 2004, 29:27-63
39. Chesney RW: Taurine: is it required for infant nutrition?, *J Nutr* 1988, 118:6-10
40. Shils ME, Shike M, Ros Caballero B, Cousins RJ: *Modern Nutrition in Health and Disease*. Edited by Lippincott Williams & Wilkins, 2006,
41. Fontana Gallego L, Sáez Lara MJ, Santisteban Bailón R, Gil Hernández A: [Nitrogenous compounds of interest in clinical nutrition], *Nutr Hosp* 2006, 21:15-29

42. Kim C, Cha YN: Taurine chloramine produced from taurine under inflammation provides anti-inflammatory and cytoprotective effects, *Amino Acids* 2014, 1:89-100
43. Su Y, Fan W, Ma Z, Wen X, Wang W, Wu Q, Huang H: Taurine improves functional and histological outcomes and reduces inflammation in traumatic brain injury, *Neuroscience* 2014, 56-65
44. Agha FE, Youness ER, Selim MM, Ahmed HH: Nephroprotective potential of selenium and taurine against mercuric chloride induced nephropathy in rats, *Ren Fail* 2014, Early Online:1-13
45. Louzada PR, Paula Lima AC, Mendonca-Silva DL, Noel F, De Mello FG, Ferreira ST: Taurine prevents the neurotoxicity of beta-amyloid and glutamate receptor agonists: activation of GABA receptors and possible implications for Alzheimer's disease and other neurological disorders, *FASEB J* 2004, 18:511-518
46. Qian T, Chen R, Nakamura M, Furukawa T, Kumada T, Akita T, Kilb W, Luhmann HJ, Nakahara D, Fukuda A: Activity-dependent endogenous taurine release facilitates excitatory neurotransmission in the neocortical marginal zone of neonatal rats, *Front Cell Neurosci* 2014, 8:1-13
47. Pasantes-Morales H, Hernandez-Benitez R: Taurine and brain development: trophic or cytoprotective actions?, *Neurochem Res* 2010, 35:1939-1943
48. Goodman CA, Horvath D, Stathis C, Mori T, Croft K, Murphy RM, Hayes A: Taurine supplementation increases skeletal muscle force production and protects muscle function during and after high-frequency in vitro stimulation, *J Appl Physiol* 2009, 107:144-154
49. Chesney RW, Helms RA, Christensen M, Budreau AM, Han X, Sturman JA: The role of taurine in infant nutrition, *Adv Exp Med Biol* 1998, 442:463-476
50. Aarons L: Population pharmacokinetics: theory and practice, *Br J Clin Pharmacol* 1991, 32:669-670
51. Oser B, Melnick D, Hochberg M: Physiological Availability of the Vitamins: Study of methods for determining availability in pharmaceutical products, *Ind End Chem* 1945, 17:401-411
52. Dost FH: [Organismic steady state in the area of experimental medicine of our time], *Arztl Wochensh* 1958, 13:745-750
53. Wagner JG: *Pharmacokinetics for the pharmaceutical scientist*. Edited by Technomic Publishing, 1993

54. Wagner JG, Nelson E: Per cent absorbed time plots derived from blood level and/or urinary excretion data, *J Pharm Sci* 1963, 52:610-611
55. Gibaldi M, Koup JR: Pharmacokinetic concepts - drug binding, apparent volume of distribution and clearance, *Eur J Clin Pharmacol* 1981, 20:299-305
56. FDA: Guidance for Industry. Bioavailability and Bioequivalence Studies for Orally Administered Drug Products — General Considerations. Edited by FDA, 2003
57. EMA: Note for guidance on the investigation on bioavailability and bioequivalence. Edited by London, The European Agency for the Evaluation of Medical Products. *Evaluation of Medicines for Human Use*, 2001
58. EMA: Guidelines on the investigation of bioequivalence. London, The European Agency for the Evaluation of Medical Products. *Evaluation of Medicines for Human Use*, 2011
59. FDA: Guidances (Drugs). Edited by FDA, 2000
60. Kulp KS, Fortson SL, Knize MG, Felton JS: An in vitro model system to predict the bioaccessibility of heterocyclic amines from a cooked meat matrix, *Food Chem Toxicol* 2003, 41:1701-1710
61. Merino-Sanjuan M, Catalan-Latorre A, Nacher A, Miralles-Arnau S, Jimenez-Torres NV: Animal model of undernutrition for the evaluation of drug pharmacokinetics, *Nutr Hosp* 2011, 26:1296-1304
62. BVA, FRAME, RSPCA, UFAW: Removal of blood from laboratory mammals and birds. First report of the BVA/FRAME/RSPCA/UFAW Joint Working Group on Refinement, *Lab Anim* 1993, 27:1-22
63. Giner RM, Rios JL, Villar A: Inhibitory effects of *Santolina chamaecyparissus* extracts against spasmogen agonists, *J Ethnopharmacol* 1989, 27:1-6
64. Teerlink T: Derivatization of posttranslationally modified amino acids, *J Chromatogr B Biomed Appl* 1994, 659:185-207
65. FDA: Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation. Edited by FDA, 2001
66. Shah VP, Midha KK, Dighe S, McGilveray IJ, Skelly JP, Yacobi A, Layloff T, Viswanathan CT, Cook CE, McDowall RD, et al.: Analytical methods validation: bioavailability, bioequivalence and pharmacokinetic studies. Conference report, *Eur J Drug Metab Pharmacokinet* 1991, 16:249-255

67. Bonate PL: Pharmacokinetic-Pharmacodynamic Modeling and Simulation. Edited by Springer, 2011
68. Emery PW: Metabolic changes in malnutrition, *Eye (Lond)* 2005, 19:1029-1034
69. Cáceres RÁ: Estadística Multivariante y No Paramétrica con SPSS: Aplicación a Las Ciencias de la Salud. Edited by Díaz de Santos, 1994
70. Martín QM, de Paz Santana YR: Tratamiento estadístico de datos con SPSS: prácticas resueltas y comentadas. Edited by Paraninfo. Thomson, 2007
71. Kutner MH: Applied Linear Statistical Models. Edited by McGraw-Hill, 2005
72. Fleck C: Determination of the glomerular filtration rate (GFR): methodological problems, age-dependence, consequences of various surgical interventions, and the influence of different drugs and toxic substances, *Physiol Res* 1999, 48:267-279
73. Lykke M, Hother AL, Hansen CF, Friis H, Molgaard C, Michaelsen KF, Briend A, Larsen T, Sangild PT, Thymann T: Malnutrition induces gut atrophy and increases hepatic fat infiltration: studies in a pig model of childhood malnutrition, *Am J Transl Res* 2013, 5:543-554
74. Chesney RW, Han X, Patters AB: Taurine and the renal system, *J Biomed Sci* 2010, 17 Suppl 1:1-4
75. Boaz RT, Joseph AJ, Kang G, Bose A: Intestinal permeability in normally nourished and malnourished children with and without diarrhea, *Indian Pediatr* 2013, 50:152-153
76. Prado CM, Maia YL, Ormsbee M, Sawyer MB, Baracos VE: Assessment of nutritional status in cancer--the relationship between body composition and pharmacokinetics, *Anticancer Agents Med Chem* 2013, 13:1197-1203
77. Miralles-Arnau S, Nacher A, Jimenez A, Jimenez-Torres NV, Merino-Sanjuan M: Impact of nutritional status on the oral bioavailability of leucine administered to rats as part of a standard enteral diet, *Clin Nutr* 2011, 30:517-523
78. Miyazaki T, Matsuzaki Y: Taurine and liver diseases: a focus on the heterogeneous protective properties of taurine, *Amino Acids* 2012, 46:101-110
79. Ito T, Schaffer S, Azuma J: The effect of taurine on chronic heart failure: actions of taurine against catecholamine and angiotensin II, *Amino Acids* 2013, 46:111-119

80. Li M, Reynolds CM, Sloboda DM, Gray C, Vickers MH: Effects of taurine supplementation on hepatic markers of inflammation and lipid metabolism in mothers and offspring in the setting of maternal obesity, *PLoS One* 2013, 8:7-19
81. Lahdesmaki P: Biosynthesis of taurine peptides in brain cytoplasmic fraction in vitro, *Int J Neurosci* 1987, 37:79-84
82. Zakeri-Milani P, Valizadeh H, Tajerzadeh H, Azarmi Y, Islambolchilar Z, Barzegar S, Barzegar-Jalali M: Predicting human intestinal permeability using single-pass intestinal perfusion in rat, *J Pharm Pharm Sci* 2007, 10:368-379
83. Correia MI, Waitzberg DL: The impact of malnutrition on morbidity, mortality, length of hospital stay and costs evaluated through a multivariate model analysis, *Clin Nutr* 2003, 22:235-239
84. Ravindran P, Ansari N, Young CJ, Solomon MJ: Definitive surgical closure of enterocutaneous fistula: outcome and factors predictive of increased postoperative morbidity, *Colorectal Dis* 2014, 16:209-218
85. Hertlein L, Kirschenhofer A, Furst S, Beer D, Goss C, Lenhard M, Friese K, Burges A, Rittler P: Malnutrition and clinical outcome in gynecologic patients, *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2014, 174:137-140
86. Cohendy R, Rubenstein LZ, Eledjam JJ: The Mini Nutritional Assessment-Short Form for preoperative nutritional evaluation of elderly patients, *Aging (Milano)* 2001, 13:293-297
87. Gudny Geirsdottir O, Thorsdottir I: Nutritional status of cancer patients in chemotherapy; dietary intake, nitrogen balance and screening, *Food Nutr Res* 2008, DOI: 10.3402/fnr.v52i0.18
88. Almeida AI, Correia M, Camilo M, Ravasco P: Length of stay in surgical patients: nutritional predictive parameters revisited, *Br J Nutr* 2013, 109:322-328
89. Ruiz-Santana S, Arboleda Sanchez JA, Abiles J: Guidelines for specialized nutritional and metabolic support in the critically-ill patient: update. Consensus SEMICYUC-SENPE: nutritional assessment, *Nutr Hosp* 2011, 26 Suppl 2:12-15
90. Boldt J: Use of albumin: an update, *Br J Anaesth* 2010, 104:276-284
91. Oliveira FS, Vieira-Filho LD, Cabral EV, Sampaio LS, Silva PA, Carvalho VC, Vieyra A, Einicker-Lamas M, Lima VL, Paixao AD: Reduced cholesterol levels in renal membranes of undernourished rats may account for urinary Na(+) loss, *Eur J Nutr* 2013, 52:1233-1242

92. Ghandforoush-Sattari M, Mashayekhi S, Krishna CV, Thompson JP, Routledge PA: Pharmacokinetics of oral taurine in healthy volunteers, *J Amino Acids* 2010, 2010:346237
93. Ghandforoush-Sattari M, Mashayekhi S: Evaluation of taurine as a biomarker of liver damage in paracetamol poisoning, *Eur J Pharmacol* 2008, 581:171-176
94. Acharya M, Lau-Cam CA: Comparative evaluation of the effects of taurine and thiotaurine on alterations of the cellular redox status and activities of antioxidant and glutathione-related enzymes by acetaminophen in the rat, *Adv Exp Med Biol* 2013, 776:199-215
95. Spitze AR, Wong DL, Rogers QR, Fascetti AJ: Taurine concentrations in animal feed ingredients; cooking influences taurine content, *J Anim Physiol Anim Nutr (Berl)* 2003, 87:251-262
96. Fujimura M, Yamamoto S, Murata T, Yasujima T, Inoue K, Ohta KY, Yuasa H: Functional characteristics of the human ortholog of riboflavin transporter 2 and riboflavin-responsive expression of its rat ortholog in the small intestine indicate its involvement in riboflavin absorption, *J Nutr* 2010, 140:1722-1727
97. Han X, Patters AB, Jones DP, Zelikovic I, Chesney RW: The taurine transporter: mechanisms of regulation, *Acta Physiol (Oxf)* 2006, 187:61-73
98. Martinez-Olmos MA, Peino R, Prieto-Tenreiro A, Lage M, Nieto L, Lord T, Molina-Perez E, Dominguez-Munoz JE, Casanueva FF: Intestinal absorption and pancreatic function are preserved in anorexia nervosa patients in both a severely malnourished state and after recovery, *Eur Eat Disord Rev* 2013, 21:247-251
99. Moll-Navarro MJ, Merino M, Casabo VG, Nacher A, Polache A: Interaction of taurine on baclofen intestinal absorption: a nonlinear mathematical treatment using differential equations to describe kinetic inhibition models, *J Pharm Sci* 1996, 85:1248-1254
100. Anderson CM, Howard A, Walters JR, Ganapathy V, Thwaites DT: Taurine uptake across the human intestinal brush-border membrane is via two transporters: H⁺-coupled PAT1 (SLC36A1) and Na⁽⁺⁾- and Cl⁽⁻⁾-dependent TauT (SLC6A6), *J Physiol* 2009, 587:731-744

