



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

**“POTENCIAL ANTIVIRAL DE
NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON
NITAZOXANIDA”**

TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA

L. F. THELMA LIEVANOS CAMPOS

DIRECTOR DE TESIS

DR. JULIO CÉSAR RIVERA LEYVA

CO-DIRECTORA DE TESIS

DRA. MARÍA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES

CUERNAVACA, MOR. JULIO DE 2026



FACULTAD DE FARMACIA

Secretaría de Investigación y Posgrado

Jefatura de Posgrado

Cuernavaca, Mor., a 19 de mayo del 2026

Folio: FF/SI/JP/CAM/OF/021/2026

L.F. THELMA LIEVANOS CAMPOS
ALUMNA DE LA MAESTRÍA EN FARMACIA

Por este medio le informo que la Comisión académica de Maestría en su Sesión ordinaria del 13 de mayo del 2026, designó a los siguientes sinodales como integrantes de la Comisión Revisora y Jurado para la revisión y evaluación de la tesis titulada: **"POTENCIAL ANTIVIRAL DE NANOPARTÍCULAS CARGADAS CON NITAZOXANIDA"**.

Sinodal		Adscripción
Presidente	Dr. Efrén Hernández Baltazar	Facultad de Farmacia-UAEM
Secretaria	Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza	Facultad de Farmacia-UAEM
Vocal	Dr. Luis Manuel Orozco Castellanos	Universidad de Guanajuato
Suplente 1	Dr. Antonio Bernabé Antonio	Universidad de Guadalajara
Suplente 2	Dra. María Crystal Columba Palomares	Facultad de Farmacia-UAEM

Se le solicita entregar el presente oficio y manuscrito borrador de tesis a esta comisión, así como dar fluidez a los trámites como se indica en el manual de procedimientos. Además de dar seguimiento a la respuesta de los sinodales asignados, quienes tendrán que resolver de su aceptación o rechazo para formar parte de esta comisión y jurado dentro de un plazo de 5 días hábiles después de la entrega del presente oficio.

Nota (Art. 74 RGEP-UAEM): Los sinodales tendrán un plazo máximo de 20 días hábiles contados a partir de la recepción del documento de tesis para entregar los comentarios de la revisión y para emitir un voto aprobatorio o negatorio. En caso de condicionar el voto a la entrega de un documento en el que el tesista deberá solventar lo revisado, este contará con un plazo no mayor a 20 días hábiles, contados a partir de la notificación del primer dictamen emitido, para integrar las correcciones señaladas, una vez fenecido dicho plazo el sinodal emitirá el voto aprobatorio o negatorio que corresponda.

Sin otro particular por el momento, reciba un cordial saludo.

Atentamente

Por una humanidad culta

efirma-UAEM

Dr. Germán Bernal Fernández

Jefe de Posgrado

Facultad de Farmacia

c.c.p Dr. Efrén Hernández Baltazar, Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza, Dr. Luis Manuel Orozco Castellanos, Dr. Antonio Bernabé Antonio, Dra. María Crystal Columba Palomares

c.c.p. Archivo



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Facultad de Farmacia. Jefatura de Posgrado. Tel. +52, 777 329 70 00, Ext. 7986. maestriafarmacia@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

GERMAN BERNAL FERNANDEZ | Fecha: 2026-06-18 13:30:42 | FIRMANTE

gldUKGM17+lwShE+2mYOsYSDSUFxurKIPSR4BZlIP9YKdVO2pQ61UPaLybl+JFdvIPUo312z6azUraLK++KhHEK1FZuVvUNKcP6WEQ4eKDHMuGyYoLY3L8hY8x7WF9h1b59u2
Bos8dPOkvtDqjzVWqjN6I2X6l1fngvDIDgx+G+VzGkqVVRT4zatsEorM6TGkmu4laspKKal1KhnmjKM5kxIFOQxvi84pmAMP5NXvF7stV5YsDMbEvDoGOWl28qPZ1psvGWg8TT+/
cmIOOyGqpJmCcRVJfJJCcscwauRUZJN0+wjq8oy0pqlGLppq4TUOP9sEJl0zMPww==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

dHdsMO8qA

<https://efirma.uaem.mx/InoRepudio/WnqTMsWid4E0a3F3lx1ghfzc8IQMJ9pp>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029

El presente trabajo se realizó gracias al financiamiento otorgado por CONAHCYT ahora SECIHTI, a través del Proyecto de Ciencia Frontera 2019 No. 1046617 (FORDECYT-PRONACES/1046617/2020) y la beca otorgada CVU 1334593. Su desarrollo se llevó a cabo en el laboratorio 4, 7 y 12 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección de la Dra. María Crystal Columba Palomares, el Dr. Julio César Rivera Leyva y con la asesoría del Dr. Carlos Alberto Távira Montalván.

*No solo es conocimiento,
sino tolerancia a la incertidumbre y constancia ante el error;
entender que el trabajo científico exige resiliencia
y esfuerzo sostenido en el tiempo.*

Agradecimientos

A la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación, por la beca otorgada (CVU: 1334593), que hizo posible dedicar tiempo, esfuerzo y compromiso a este proyecto, y que representó una oportunidad fundamental para el desarrollo de mi formación académica en el posgrado.

A la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, casa de estudios que ha sido testigo de mi evolución desde los primeros pasos en la licenciatura hasta la consolidación de esta etapa. A la Facultad de Farmacia, por abrirme sus puertas y por ser el espacio donde el conocimiento dejó de ser abstracto para convertirse en práctica, cuestionamiento y construcción constante.

Al Dr. Julio César Rivera Leyva, por su presencia constante a lo largo de este proceso, por su guía, su respaldo y por creer en mi trabajo incluso en los momentos de mayor incertidumbre.

A la Dra. Ma. Crystal Columba Palomares, por su paciencia, por cada enseñanza dentro y fuera del laboratorio. Agradezco profundamente la oportunidad de aprender a su lado, así como la confianza y el espacio brindado para desarrollarme académicamente.

Al Dr. Carlos Alberto Tavira Montalván por su dedicación, guía y enseñanzas brindadas a lo largo de mi formación dentro del laboratorio. Su acompañamiento, disposición para compartir conocimientos y compromiso con la investigación fueron fundamentales para el desarrollo de este trabajo y para mi crecimiento académico y profesional.

Asimismo, expreso mi sincero agradecimiento a la Dra. Angélica Meneses Acosta por su orientación, experiencia y apoyo académico, así como por brindarme un espacio de trabajo dentro de su laboratorio, permitiéndome desarrollar este proyecto en un ambiente de aprendizaje, colaboración y crecimiento científico.

A mis profesores, por su generosidad al compartir conocimiento, por su exigencia académica y por enseñarme que la ciencia se sostiene no solo en resultados, sino en la capacidad de cuestionar, analizar y sostener el rigor en cada proceso.

A mi familia, por ser el punto de equilibrio en cada etapa, por su apoyo incondicional y por sostenerme incluso cuando el camino parecía más complejo de lo esperado.

A mis amigos, por acompañar este proceso, por las horas compartidas, las conversaciones, el cansancio y también los momentos de alivio. Su presencia hizo de este camino una experiencia más humana y significativa.

Este trabajo es resultado de un proceso sostenido en el tiempo, construido con rigor, acompañamiento y perseverancia. En él se refleja no solo una formación académica, sino la capacidad de mantenerse y avanzar aun en condiciones de incertidumbre.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 Hepatitis	3
Epidemiología de la hepatitis B	4
Hepatitis B	6
Prevalencia en México VHB	7
Virus de Hepatitis B	10
Tratamientos actuales para la hepatitis B	15
2.2 Antecedentes y generalidades de la Nitazoxanida	16
Actividad antiviral de Nitazoxanida	18
Nitazoxanida y el Virus de Hepatitis B	18
Formulaciones de nitazoxanida	19
2.3 Nanopartículas poliméricas	20
Nanopartículas poliméricas en el tratamiento de infecciones antivirales	21
Nanosistema polimérico de nitazoxanida	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
6. MATERIAL Y MÉTODOS	26
6.2 Marcaje de nanopartículas cargadas con nitazoxanida	26
Recubrimiento de nanopartículas cargadas con nitazoxanida	26
Marcaje con FITC	27
6.3 Caracterización de cultivo de células HepG2	27
Protocolo de congelamiento, descongelamiento y subcultivo de células HepG2	28
Subcultivo de células HepG2 en monocapa	30
6.4 Elección del Plásmido pcDNA3.1-Flag HBx.	30
Amplificación y Purificación del Plásmido pcDNA3.1-Flag HBx en Bacterias DH5α	31
Transformación y selección	31
Cultivo y Amplificación del Plásmido	31
Cultivo de colonias	31
Purificación del Plásmido	32
Verificación del Plásmido	32
6.5 Evaluación antiviral	32
Evaluación antiviral en modelo en cultivos de células HEK293 infectados con r-Ad5.	32
6.6 Transfección con Lipofectamina 2000 para Células HepG2 con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx	33
Preparación de Células:	33
Preparación del Complejo de Transfección	33
Transfección de Células:	34

6.7 Extracción de RNA	34
Recolección de células	34
Lisis celular	35
Aislamiento de RNA	35
6.8 Síntesis de cDNA (Transcripción Inversa)	35
Preparación de la reacción de RT	35
Reacción de transcripción inversa	35
6.9 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)	35
Preparación de la mezcla de PCR	35
Reacción de PCR	36
Análisis de PCR	36
6.10 Evaluación antiviral en modelo de expresión de la proteína HBx del virus de la hepatitis B en células HepG2.	36
MTS	36
6.11 Microscopia de epi fluorescencia, tinción diferencial AO/IP.	37
6.12 Extracción de ADN	38
6.13 Detección de fragmentación de ADN	39
6.14 Detección de apoptosis mediante marcaje con Anexina V	39
7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
7.1 Características morfológicas de las nanopartículas poliméricas cargadas con nitazoxanida	42
7.3 Obtención del plásmido pcDNA3.1Flag HBx	52
7.4 Crecimiento, viabilidad y morfología de células HepG2	55
7.5 Respuesta celular a la nitazoxanida y nanopartículas cargadas con nitazoxanida.	59
Muerte celular asociada a la expresión de HBx.	65
Caracterización de la apoptosis en células HepG2-HBx	70
Fragmentación internucleosomal del ADN como evento terminal de apoptosis	74
8. CONCLUSIONES	78
9. PERSPECTIVAS	79
10. BIBLIOGRAFÍA	81

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>Figura 1. Porcentaje del total de infecciones por hepatitis B entre los países prioritarios, por región de la OMS (WHO, 2024).</i>	6
<i>Figura 2. Principales causas de muertes, según sexo. Enero - septiembre 2024 (Adaptada de INEGI, 2025).</i>	8
<i>Figura 4. Casos e incidencia de Hepatitis B por entidad, México 2020 (Secretaría de Salud, 2020b).</i>	10
<i>Figura 5. Estructura del virón del VHB (Rodríguez-Frias & Jardi, 2008).</i>	11
<i>Figura 6. Esquema representativo del genoma de virus de Hepatitis B (Cortes-Mancera & Navas, 2015).</i>	12
<i>Figura 7. Ciclo de replicación del VHB (Zhao et al., 2021).</i>	14
<i>Figura 8. Estructura química de la nitazoxanida.</i>	17
<i>Figura 9. Metabolismo de Nitazoxanida (Torres & Gonzáles, 2022).</i>	17
<i>Figura 10. Representación de la estructura de nanocápsulas y nanoesferas (Zielinska, Carreiró, Oliveira, Neves, Pires, Venkatesh, et al., 2020b).</i>	21
<i>Figura 11. Mapa de secuencia completa de Addgene para pcDNA3.1-Flag HBx.</i>	33
<i>Figura 12. Micrografías MEB de las nanopartículas cargadas con nitazoxanida.</i>	46
<i>Figura 13. Nanopartículas poliméricas sin marcaje y con marcaje con FITC</i>	50
<i>Figura 15. Micrografía de campo claro a 10 x de nanopartículas sin marcar.</i>	52
<i>Figura 16. Micrografía de campo claro a 10 x de nanopartículas marcadas con FITC.</i>	53
<i>Figura 17. Micrografías de campo claro a 10 x y 40 x de células HepG2, grupo control sin tratamiento.</i>	54
<i>Figura 18. Transformación de Bacterias E. coli DH5α con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx.</i>	56
<i>Figura 19. Purificación del plásmido pcDNA3.1-Flag HBx.</i>	58
<i>Figura 20. Crecimiento y viabilidad de células HepG2 en función del tiempo.</i>	59
<i>Figura 21. Morfología de células HepG2.</i>	61
<i>Figura 22. Ensayo antiviral rAd5.</i>	63
<i>Figura 24. Modelo de expresión de la proteína HBx del virus de Hepatitis B en células HepG2.</i>	66
<i>Figura 25. Porcentaje de viabilidad celular en cultivos HepG2 transfectados con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx y tratados con nanopartículas cargadas con nitazoxanida.</i>	68
<i>Figura 26. Microscopia de epi fluorescencia de cultivos control.</i>	69
<i>Figura 28. Ensayo de Annexina V en cultivos control</i>	74
<i>Figura 29. Ensayo de Annexina V en cultivos celulares transfectados con HBx y tratados con nanopartículas de nitazoxanida.</i>	75
<i>Figura 30. Análisis de fragmentación de ADN en células HepG2 transfectadas con</i>	

ÍNDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Países prioritarios de la OMS para la respuesta a la hepatitis viral, por región de la OMS (WHO, 2024)</i>	12
<i>Tabla 2. Genoma del VHB y características de sus moléculas.</i>	19
<i>Tabla 3. Propiedades fisicoquímicas de NTZ (Shakya et al., 2017).</i>	24
<i>Tabla 4. Descripción de linaje celular HepG2 (ATCC, 2024)</i>	33
<i>Tabla 5. Concentraciones de plásmido pcDNA3.1-Flag HBx purificado por columna (miniprep kit Thermo Scientific™).</i>	56

ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C/min	Grados centígrados por minuto
μ	Velocidad específica de crecimiento
μg/mL	Microgramos por mililitro
μL	Microlitro
μM	Micromolar
aa	Aminoácido
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
ADNccc	ADN covalentemente cerrado circular
AO	Naranja de acridina
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNpg	Ácido rubonucleico pregenómico
ATCC	American Type Culture Collection
CaCl₂	Cloruro de calcio
CAD	ADNasa activada por caspasa (caspase-activated DNase)
CE₅₀	Concentración efectiva media
cel/mL	Células por minuto
CHC	Carcinoma Hepatocelular
CL₅₀	Concentración letal media
cm/s	Centímetros por segundo
cm/s	Centímetro sobre segundo
cm²	Centímetro cuadrado
CO₂	Dioxido de carbono
CRAC	Canal de liberación de calcio activado por depleción
CRAC	Canal de Ca ²⁺ activado por liberación de Ca ²⁺
DDB1	DNA damage-dinding protein 1 (proteína huésped de unión al ADN específico del daño)
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMEMF12	Dulbecco's Modified Eagle Medium F12
DMSO	Dimetilsulfóxido
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
EDR	Estadísticas de Defncciones Registradas
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FDA	Food and Drug Administration
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
h⁻¹	Inversa de hora
HBcAg	Antígeno del core del virus de la hepatitis B
HBeAg	Antígeno e del virus de la hepatitis B
HBsAg	Antígeno de superficie
ICF	Instituto de ciencias físicas
kV	Kilovoltio
LB	Luria-Bertani (medio de cultivo)
MEB	Microscopia electrónica de barrido
MERS	Middle East Respiratory Syndrome
mg	Miligramo
min	Minutos
mM	Milimolar

MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio
mV	milivoltio
n	Tamaño de muestra
ng/μL	Nanogramos sobre microlitro
nm	Nanómetro
NP	Nanopartícula polimérica
NPs	Nanopartículas poliméricas
NTZ	Nitazoxanida
OMS	Organización mundial de la salud
PBS	Tampón fosfato salino
PCL	Policaprolactona
PCR	Polymerase Chain Reaction (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PI	Ioduro de propidio
PNPS-NTZ	Nanopartículas poliméricas cargadas con nitazoxanida
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
rpm	Revoluciones por minuto
RT	Transcriptasa reversa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa
SARS	Severe Acute Respiratory Syndrome
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutica
SOCE	Store-Operated Calcium Entry (Entrada de calcio operada por depositos)
TM	Temperatura máxima
TZN	Tizoxanida
UNAM	Universidad Nacional Autónoma de México
v/v	Volumen por volumen
VHA	Virus de la hepatitis A
VHB	Virus de la hepatitis B

RESUMEN

La infección crónica por el virus de la hepatitis B (VHB) constituye un problema de salud pública de alcance mundial, con 254 millones de personas afectadas en 2022 y aproximadamente 1.1 millones de muertes anuales asociadas a cirrosis y carcinoma hepatocelular. Si bien los tratamientos antivirales disponibles logran suprimir la replicación viral, la erradicación de la infección continúa siendo inalcanzable debido a la persistencia del ADN covalentemente cerrado circular (ADNccc) en el núcleo de los hepatocitos infectados. Este reservorio episomal, cuya actividad transcripcional es mantenida de manera indispensable por la proteína viral HBx, representa el principal obstáculo terapéutico en la hepatitis B crónica. La proteína HBx actúa como regulador transcripcional multifuncional, modula la proliferación celular, la apoptosis y la homeostasis del calcio citosólico, y es esencial para la persistencia viral, lo que la posiciona como un blanco terapéutico de alta relevancia.

En este contexto, la nitazoxanida (NTZ) ha sido identificada como un agente antiviral de amplio espectro con actividad demostrada frente al VHB, cuyo mecanismo de acción incluye la inhibición de la interacción HBx-DDB1, la restauración de los niveles del complejo SMC5/6 y la consecuente supresión de la transcripción del ADNccc. Sin embargo, su clasificación como fármaco de clase II en el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, derivada de su baja solubilidad acuosa, limita su biodisponibilidad intracelular y eficacia clínica. Para superar estas limitaciones, en un estudio previo se desarrollaron y caracterizaron nanopartículas poliméricas de policaprolactona cargadas con nitazoxanida (NPs-NTZ), con un tamaño de 370 ± 5 nm, índice de polidispersión de 0.180 ± 7 y eficiencia de encapsulación del 98 %, que en el presente trabajo fueron evaluadas en modelos de expresión de HBx.

El presente trabajo evaluó el potencial antiviral de la NTZ libre y nanoencapsulada mediante un modelo de expresión ectópica de HBx en células HepG2 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx. La caracterización morfológica del nanosistema mediante microscopía electrónica de barrido confirmó la

formación de estructuras nanométricas íntegras; la funcionalización superficial con quitosano-FITC permitió verificar la internalización progresiva de las nanopartículas en células HepG2. Como modelo preliminar, el sistema HEK293-rAd5 demostró que la nanoencapsulación potencia significativamente la actividad antiviral de la NTZ respecto a su forma libre, con restauración de viabilidad celular del 65 % frente al 35 % del fármaco libre.

En el modelo HepG2/HBx, la transfección con pcDNA3.1-Flag HBx indujo una reducción drástica de la viabilidad celular hasta el 35 %, activación de apoptosis progresiva y fragmentación internucleosomal del ADN, confirmada de manera convergente mediante ensayos de viabilidad MTS, tinción diferencial AO/IP, Anexina V-FITC/IP y análisis electroforético de ADN. El tratamiento con NPs-NTZ restauró la viabilidad hasta el 80 % a 0.75 μ M, redujo la población apoptótica y disminuyó significativamente la fragmentación del ADN, con eficacia superior a la NTZ libre en todos los parámetros evaluados. Estos efectos se atribuyen a la mejora en la biodisponibilidad intracelular y la liberación controlada del principio activo conferidas por el sistema polimérico.

La evidencia generada demuestra que la nanoencapsulación de nitazoxanida potencia su actividad citoprotectora y antiviral frente a los efectos de HBx en un modelo hepatocitario controlado, sentando las bases para estudios futuros en modelos de infección completa por VHB que permitan confirmar el impacto del nanosistema sobre la replicación viral y la eliminación del reservorio de ADNccc, con miras a su eventual desarrollo preclínico como estrategia terapéutica para la hepatitis B crónica.

ABSTRACT

Chronic hepatitis B virus (HBV) infection represents a global public health burden, with 254 million people affected in 2022 and approximately 1.1 million annual deaths attributed to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Although current antiviral treatments effectively suppress viral replication, complete eradication of the infection remains unachievable due to the persistence of covalently closed circular DNA (cccDNA) in the nucleus of infected hepatocytes. This episomal reservoir, whose transcriptional activity is indispensably maintained by the viral protein HBx, constitutes the primary therapeutic obstacle in chronic hepatitis B. HBx functions as a multifunctional transcriptional regulator, modulating cell proliferation, apoptosis, and cytosolic calcium homeostasis, and is essential for viral persistence, positioning it as a high-relevance therapeutic target.

In this context, nitazoxanide (NTZ) has been identified as a broad-spectrum antiviral agent with demonstrated activity against HBV, whose mechanism of action includes inhibition of the HBx-DDB1 interaction, restoration of SMC5/6 complex levels, and consequent suppression of cccDNA transcription. However, its classification as a Biopharmaceutics Classification System class II drug, derived from its low aqueous solubility, limits its intracellular bioavailability and clinical efficacy. To overcome these limitations, a prior study developed and characterized polycaprolactone-based polymeric nanoparticles loaded with nitazoxanide (NPs-NTZ), with a particle size of 370 ± 5 nm, polydispersity index of 0.180 ± 7 , and encapsulation efficiency of 98 %, which were evaluated in HBx expression models in the present work.

The present study assessed the antiviral potential of free and nanoencapsulated NTZ using an ectopic HBx expression model in HepG2 cells transfected with the pcDNA3.1-Flag HBx plasmid. Morphological characterization of the nanosystem by scanning electron microscopy confirmed the formation of structurally intact nanometric structures; surface functionalization with chitosan-FITC allowed verification of the progressive internalization of nanoparticles into HepG2 cells. As a preliminary model, the HEK293-rAd5 system demonstrated that

nanoencapsulation significantly enhances the antiviral activity of NTZ compared to its free form, restoring cell viability to 65 % versus 35 % achieved by the free drug.

In the HepG2/HBx model, transfection with pcDNA3.1-Flag HBx induced a dramatic reduction in cell viability to 35 %, activation of progressive apoptosis, and internucleosomal DNA fragmentation, confirmed in a convergent manner by MTS cell viability assay, AO/PI differential staining, Annexin V-FITC/PI detection, and electrophoretic DNA analysis. Treatment with NPs-NTZ restored cell viability to 80 % at 0.75 μ M, reduced the apoptotic cell population, and significantly decreased DNA fragmentation, with superior efficacy over free NTZ across all evaluated parameters. These effects are attributed to improved intracellular bioavailability and controlled release of the active compound conferred by the polymeric delivery system.

The evidence generated demonstrates that nanoencapsulation of nitazoxanide enhances its cytoprotective and antiviral activity against the effects of HBx in a controlled hepatocyte model, laying the groundwork for future studies in complete HBV infection models to confirm the impact of the nanosystem on viral replication and cccDNA reservoir elimination, with a view toward its eventual preclinical development as a therapeutic strategy for chronic hepatitis B

1. INTRODUCCIÓN

La hepatitis viral representa un grave problema de salud pública a nivel global, caracterizada por una alta tasa de morbilidad y mortalidad asociada a complicaciones severas como la cirrosis y el carcinoma hepatocelular (CHC). El Virus de la Hepatitis B (VHB), un hepadnavirus de ADN, es particularmente preocupante debido a su capacidad de cronificarse, evadiendo la respuesta inmune del huésped. A nivel mundial, se estima que 254 millones de personas padecían una infección crónica por VHB en 2022, siendo esta causa de muerte para aproximadamente 1.1 millones de personas ese año. En México, las enfermedades del hígado se posicionaron como la cuarta causa nacional de defunciones entre enero y septiembre de 2024 .

Aunque los tratamientos antivirales actuales logran suprimir la replicación viral, el objetivo final de la erradicación de la infección se ve obstaculizado por la persistencia del ADN covalentemente cerrado circular (ADNccc) en el núcleo de los hepatocitos.

En este contexto, la nitazoxanida (NTZ), un compuesto antiinfeccioso de amplio espectro ha surgido como un agente de interés. La NTZ y su metabolito activo, la tizoxanida, han demostrado actividad antiviral significativa, incluyendo la capacidad de inhibir la replicación del VHB y la expresión de la proteína HBx. La proteína HBx es un componente esencial para la replicación y la patogénesis del VHB, actuando como regulador transcripcional clave y siendo fundamental para la activación del ADNccc. Sin embargo, la NTZ está clasificada como un fármaco de Clase II según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica debido a su baja solubilidad acuosa, lo cual limita su biodisponibilidad y eficacia clínica.

Para superar estos desafíos de formulación, la nanotecnología ofrece un enfoque prometedor. Las nanopartículas poliméricas (NPs) son sistemas de liberación que mejoran la estabilidad y biodisponibilidad del fármaco, permitiendo una liberación controlada y potencialmente específica del principio activo. Las nanopartículas poliméricas cargadas con nitazoxanida (PNPS-NTZ) ya han sido elaboradas

previamente, demostrando una eficiencia de encapsulación del $98 \% \pm 0.4$ y una mejora en la solubilidad y permeabilidad acuosa de la NTZ en comparación con la formulación en suspensión.

Por lo tanto, en este trabajo de investigación se evaluó el potencial antiviral de las nanopartículas cargadas con NTZ en un modelo relevante de expresión de la proteína HBx del VHB en cultivos de células HepG2. El objetivo general fue evaluar la eficacia de las nanopartículas cargadas de nitazoxanida para reducir la expresión de la proteína HBx. Se postula que las NPs de NTZ inhibirán dicha expresión. La caracterización de este nanosistema mediante técnicas avanzadas, como PCR y análisis de viabilidad celular (MTS, Anexina V), busca contribuir al desarrollo de terapias más efectivas y dirigidas en el campo de la nanomedicina y la virología contra infecciones virales crónicas como la hepatitis B. Resultados preliminares indican que el nanosistema de NPs-NTZ es más efectivo que la NTZ libre en la mejora de la viabilidad celular en modelos que expresan la proteína HBx

2. ANTECEDENTES

2.1 Hepatitis

La hepatitis viral es un importante problema de salud pública a nivel mundial, se estima que su mortalidad ha ido en incremento en los últimos años, esto secundario a la cronicidad de la enfermedad que deriva en casos de cáncer y cirrosis, el cual afecta a millones de personas en todo el mundo (OMS, 2023; Secretaría de Salud, 2020a).

La hepatitis viral se refiere a la inflamación del hígado causada por una infección viral; existen varios tipos de hepatitis, siendo A, B, C, D y E los más comunes, cada tipo es causada por un virus diferente y presenta características diferentes en términos de transmisión gravedad y consecuencias a largo plazo (OMS, 2023).

La infección causada por el virus hepatitis A (VHA) es una de las enfermedades más antiguas conocidas por la humanidad. Su epidemiología se sustenta en dos pilares fundamentales: la transmisión fecal-oral, por lo general, es una infección de corta duración y no conduce a una enfermedad hepática crónica y la inmunidad permanente a su vez pasada la infección (Aguilera et al., 2006; Tobagar et al., 2023).

La hepatitis B se transmite por contacto con sangre, semen u otros fluidos corporales infectados, causando infecciones tanto agudas como crónicas y pueden provocar cirrosis hepática o cáncer de hígado. La hepatitis C, se transmite principalmente a través de la exposición a sangre infectada, comúnmente al compartir agujas, o a través de procedimientos médicos inseguros, o de madre a hijo durante el parto. A menudo se convierte en una infección crónica y puede causar complicaciones hepáticas a largo plazo si no lleva el tratamiento farmacológico adecuado (Tobagar et al., 2023).

La hepatitis D es un tipo único de hepatitis que ocurre en personas que están infectados con hepatitis B, se transmite por contacto con la sangre infectada o sexual, la cual puede provocar una enfermedad hepática más grave que la hepatitis B. La hepatitis E se transmite principalmente a través del consumo de

agua o alimentos contaminados, particularmente en áreas con saneamiento deficiente. Por lo general, es una infección aguda, puede ser particularmente peligrosa para las mujeres embarazadas y provocar complicaciones graves

Epidemiología de la hepatitis B

La hepatitis B es un problema de salud mundial considerable. Las regiones de la OMS que soportan mayor carga de infección crónica son el pacífico Occidental y África donde afecta a 97 y 65 millones de personas respectivamente. Las regiones de la OMS (figura 1) de Asia Sudoriental, que cuenta con 61 millones de personas infectadas, el Mediterráneo Oriental, con 15 millones, Europa con 11 millones y América con 5 millones (OMS, 2024). En la tabla 1 se muestran los 38 países prioritarios de la OMS para la respuesta a la hepatitis vírica, los cuales enfrentan desafíos singulares en sus respuestas al VHB. Los países fueron seleccionados en función de una combinación de factores epidemiológicos y otros factores estratégicos y programáticos. Los países representan diversos contextos en términos de su carga de morbilidad, situación sociopolítica, compromiso del país con la respuesta a la hepatitis vírica, enfoques innovadores en sus programas nacionales y sitios de proyectos importantes (WHO, 2024).

Tabla 1. Países prioritarios de la OMS para la respuesta a la hepatitis viral, por región de la OMS (WHO, 2024)

África	Europa
Camerún	Georgia
Costa de marfil	Kirguistán
República democrática del Congo	Republica de Moldavia
Etiopia	Federación Rusa
Ghana	Ucrania
Nigeria	Uzbekistán
Ruanda	
Sudafrica	
Uganda	
Republica unida de Tanzania	
América	Mediterráneo Oriental
Brasil	Egipto
Colombia	Marruecos
México	Pakistán
Perú	Sudán
	Yemen

Sudeste Asiático	Pacífico occidental
Bangladesh	Camboya
India	República democrática popular Lao
Indonesia	Mongolia
Birmania	Niue
Tailandia	Filipinas
	Vanuatu
	Vietnam

La lista de países incluye países grandes y poblados donde las actividades de eliminación de la hepatitis vírica están integradas en esfuerzos más amplios para expandir la cobertura sanitaria universal; así como países más pequeños, como pequeños estados insulares y países con epidemias concentradas entre poblaciones clave, que pueden adaptar los enfoques para avanzar en el camino hacia la eliminación. La hepatitis viral también puede suponer una carga relativamente significativa de enfermedad en poblaciones o zonas geográficas específicas en países más allá de estos 38 países prioritarios. Todos los países deben aprovechar al máximo las oportunidades disponibles para ampliar el acceso a la prevención, las pruebas y el tratamiento de la hepatitis viral para las poblaciones que lo necesitan. La OMS sigue prestando apoyo a todos los países del mundo en sus esfuerzos por alcanzar el objetivo de eliminar la hepatitis viral (WHO, 2024).

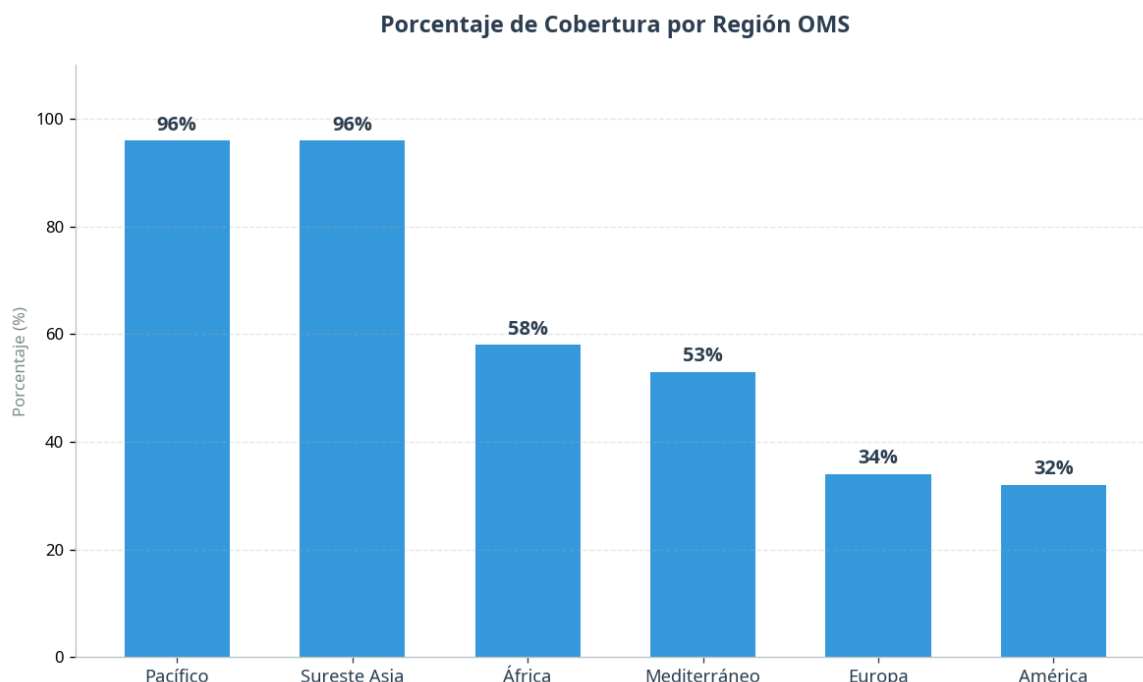


Figura 1. Porcentaje del total de infecciones por hepatitis B entre los países prioritarios, por región de la OMS (WHO, 2024).

La OMS estima que 254 millones de personas padecían una infección crónica por el virus de la hepatitis B en 2022, y que cada año se producen 1.2 millones de nuevas infecciones. En 2022, la hepatitis B provocó la muerte de aproximadamente 1.1 millones de personas, principalmente por cirrosis o hepatocarcinoma (cáncer hepático primario) (OMS, 2024).

Hepatitis B

La hepatitis B es una infección del hígado causada por el virus de la hepatitis B, dicha infección puede ser aguda o crónica; la cual se puede cronificar y conlleva un alto riesgo de muerte por cirrosis o carcinoma hepatocelular (Carnalla et al., 2022; OMS, 2024).

El mecanismo fisiopatológico del daño hepático no es citopático directo, sino debido a la respuesta inmune celular contra los hepatocitos infectados y esa misma explicación se tiene para las manifestaciones extrahepáticas que en ocasiones acompañan el cuadro agudo. Esto ha sido confirmado por el seguimiento a portadores asintomáticos, que quienes, a pesar de mostrar niveles

altos de replicación viral intrahepática, conservan las pruebas de función hepática normales, y por el hecho de que en neonatos infectados, su sistema inmune inmaduro causa una mínima lesión hepática a pesar de la alta replicación del virus (Toro Montoya et al., 2011).

Infección crónica por VHB puede considerarse una enfermedad que se caracteriza por la incapacidad de generar una respuesta inmune adaptativa eficaz y coordinada, lo que resulta en persistencia viral, que puede ser una consecuencia de la capacidad del VHB para manipular respuestas inmunes innatas clave. Las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas coordinadas son importantes para la eliminación del VHB del hígado. Es importante destacar que, en la mayoría de las circunstancias, el VHB es no citopático (no mata directamente a los hepatocitos): por tanto, la inflamación y la fibrosis del hígado que complican la infección crónica a largo plazo están mediadas predominantemente por la respuesta inmunitaria del huésped (Yuen et al., 2018).

Eventos iniciales después a la infección por VHB. Después de la infección por VHB, existe un periodo de retraso de 4 a 7 semanas antes de que el ADN del VHB y el HBsAG se vuelvan detectables en el suero o el hígado (periodo de incubación). Los estudios de conjuntos de genes durante el periodo de incubación no han revelado una fuerte respuesta genética estimulada por interferón, lo que lleva a la propuesta de que el VHB podría ser un virus furtivo capaz de evadir las respuestas inmunitarias innatas iniciales (Yuen et al., 2018).

La probabilidad de desarrollar infección aguda con los síntomas característicos (ictericia, dolor abdominal, orina oscura, fiebre) y la eliminación posterior del VHB está relacionada con la edad; en niños menores a cuatro años se presenta en solo 10% de los casos, aproximadamente, mientras que, en los adultos jóvenes, la proporción es mayor (Verónica et al., 2016).

Prevalencia en México VHB

El INEGI (2025) publicó en febrero un comunicado de prensa reportando las estadísticas de defunciones registradas (EDR), donde las enfermedades del hígado se posicionan en el 4° lugar nacional con 30,263 defunciones entre enero y septiembre del 2024, aunque no superan a las enfermedades cardiovasculares, diabetes mellitus y tumores malignos, si representan una causa relevante dentro de las primeras cinco a nivel nacional (figura 2).

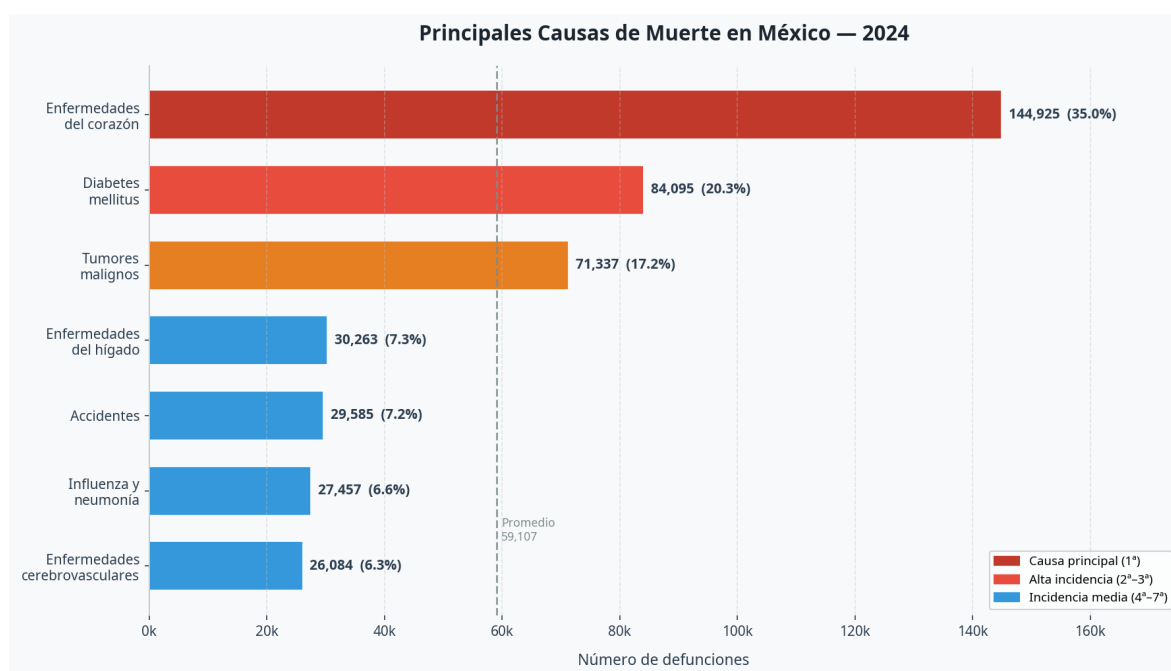


Figura 2. Principales causas de muertes, según sexo. Enero - septiembre 2024 (Adaptada de INEGI, 2025).

Durante el 2010-2020 se han registrado 7,746 casos de hepatitis B en México observándose una tendencia a la baja entre 2010 y 2017, tras lo cual la tendencia se revierte hacia el alza; sin embargo, observamos una reducción importante en la notificación para el año 2020 (Figura 2) (Secretaría de Salud, 2020b).

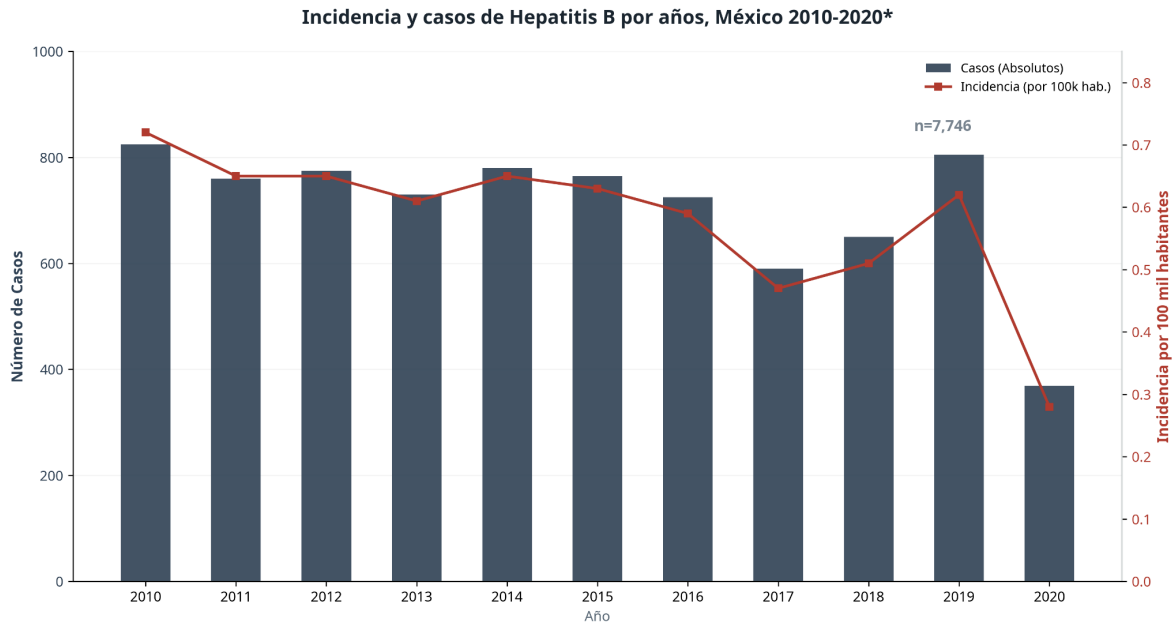


Figura 3. Incidencia y casos de Hepatitis B por años, México 2010-2020 (Secretaría de Salud, 2020b).

Durante el 2020 se registraron 369 casos de hepatitis B en México con una tasa de incidencia nacional de 0.28 casos por cada 100,000 habitantes. Dentro de los estados que reportaron las tasas de incidencia más altas en 2020, fueron Quintana Roo (0.81), Chihuahua (0.66) y Tamaulipas (0.60). Figura 3. (Secretaría de Salud, 2020b).

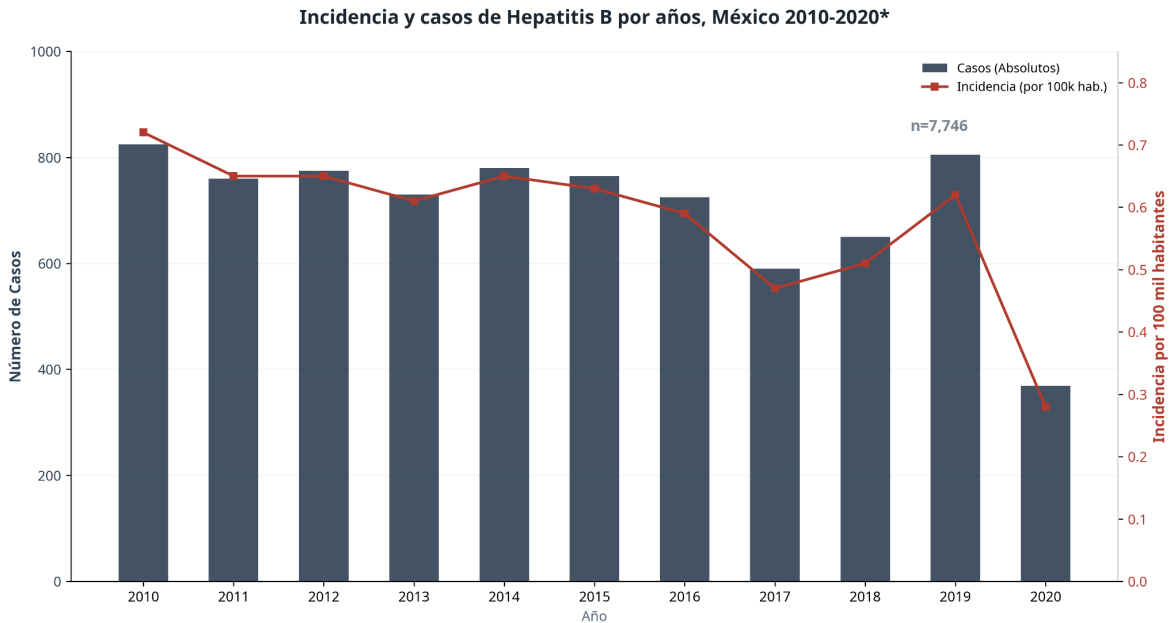


Figura 4. Casos e incidencia de Hepatitis B por entidad, México 2020 (Secretaría de Salud, 2020b).

Con los fármacos de los que se dispone actualmente no es posible la erradicación de la infección por VHB, debido a la persistencia de ADNccc en el núcleo de los hepatocitos. Por ello, el objetivo final del tratamiento en pacientes con hepatitis B crónica es mejorar la supervivencia (Secretaría de Salud, 2020b).

En muchos pacientes la recuperación clínica se completa en tres a seis meses. Los signos de disfunción hepática que se manifiestan en las pruebas de laboratorio pueden persistir más tiempo, pero los pacientes en su mayoría se recuperan del todo (Friedman, 2023).

Virus de Hepatitis B

El virus de la hepatitis B (VHB) (figura 4). Es un hepadnavirus de 42 nm con un genoma de ADN bicatenario parcial, proteína central interna y cubierta superficial externa, perteneciente a la familia Hepadnaviridae (Mironova & Ghany, 2024). Existen 10 genotipos diferentes, los cuales pueden influir en el curso de la infección y la respuesta al tratamiento antiviral (Friedman, 2023).

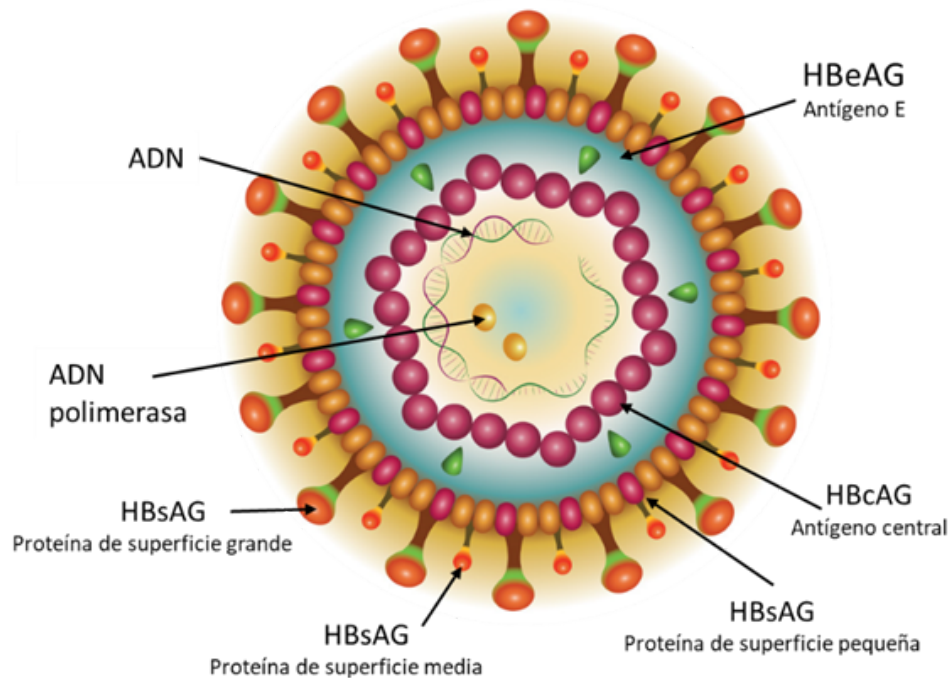


Figura 5. Estructura del virión del VHB (Rodríguez-Frias & Jardi, 2008).

El virión completo (Figura 4) tiene una estructura esférica de doble capa ~42 nm de diámetro, la cual cuenta con dos partículas esféricas y filamentosas más pequeñas que consisten en el antígeno de superficie de la hepatitis B (HBsAg) complejo con lípidos del huésped pero que carecen de ADN viral. Por lo que estas partículas no son infecciosas y superan ampliamente el número de la partícula danesa infecciosa (Mironova & Ghany, 2024). En el interior de las partículas se encuentra un núcleo esférico, electron-denso, de 22-25 nm de diámetro que contiene el antígeno core (HBcAg), el ADN viral, una proteína con actividad ADN polimerasa (proteína P) y proteínas del huésped. Hay otro antígeno viral, denominado antígeno “e” (HBeAg) que no forma parte de la estructura del VHB, pero que se sintetiza a partir del gen que codifica la proteína del core (Rodríguez-Frias & Jardi, 2008).

El genoma viral (Figura 5) tiene cuatro marcos de lectura abiertos superpuestos; entre ellos, la región pre-S1/pre-S2/s, antígeno de superficie grande, mediano y pequeño del HBsAg, la región P, que codifica la polimerasa viral, la proteína X, que codifica la proteína transactivadora X (HBx) y la region pre-core/core que codifica

la proteína core, unidad estructural de la cápside (HBcAg) y el antígeno e (HBeAg) (Cortes-Mancera & Navas, 2015; Mironova & Ghany, 2024).

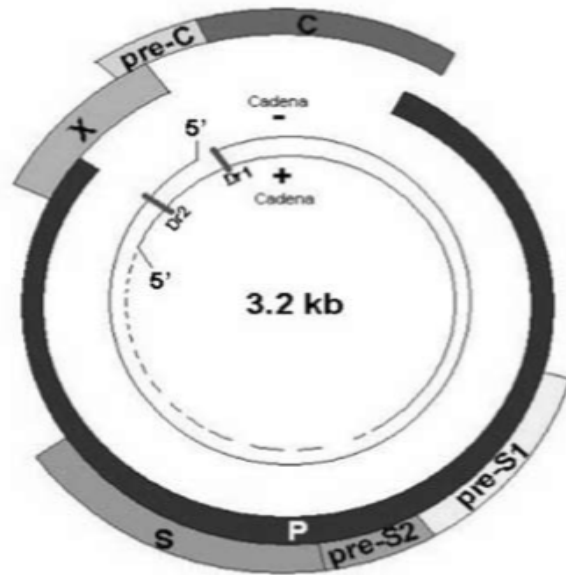


Figura 6. Esquema representativo del genoma de virus de Hepatitis B (Cortes-Mancera & Navas, 2015).

Los hepatocitos son el principal sitio de replicación del VHB, (Mironova & Ghany, 2024) sin embargo se han encontrado genomas virales intermediarios de la replicación fuera del hígado, como en el epitelio de ducto biliar, el páncreas, las células renales, linfocitos y monocitos (Verónica et al., 2016). Aunque se le conoce como un virus con alta capacidad de replicación, debido a la ausencia de la enzima transcriptasa inversa correctora, las mutaciones que ocurren naturalmente pueden surgir en diferentes regiones del genoma. Estas regiones (ver tabla 2) pueden codificar las polimerasas, el antígeno de superficie, el promotor central/precore y comprenden de los genes X que influyen significativamente en la expresión de HBsAg y la progresión del carcinoma hepatocelular (Güvenir & Arikan, 2020).

Tabla 2. Genoma del VHB y características de sus moléculas.

Gen/región	Proteína codificada	Función y características
P	Polimerasa	Replicación del genoma viral.
• Pre-S1 • Pre-S2 • Gen S	• Pre-S1 + Pre-S2+ Gen S = "proteína grande". • Pre-S2 + Gen S = "Proteína mediana" • Gen S = "Proteína pequeña"	Forma parte estructural de la envoltura del virus. En la proteína grande se encuentra un sitio de reconocimiento al hepatocito, por lo que se considera que sirve en la entrada del VHB a la célula del huésped.
Pre-c Gen c	• Región Pre-C + Gen C = HBeAg • Gen C = La proteína central (HBcAg)	HBeAg. Es la forma soluble del HBcAg Necesario para una infección persistente. Forma parte estructural de la nucleocápside del virus
Gen X	Proteína X	Regulador transcripcional, favorece la transcripción de su propio gen y genes del hospedero.

El ciclo de replicación del virus (figura 7) comienza una vez que el virus penetra en el hepatocito, libera la nucleocápside en el citoplasma. A continuación, el genoma viral se transporta al núcleo mediante mecanismos que aún no están bien definidos. Después, la cadena positiva del ADN viral no completa se termina de sintetizar por medio de la polimerasa viral, donde forma un ADN circular covalente cerrado (ADNccc). La RNA polimerasa II del huésped transcribe la cadena negativa del ADN viral en ARN pregenómico (ARNpg) y cuatro RNA mensajeros (RNAm) que sirven para la traducción de proteínas virales (Verónica et al., 2016) la cual se lleva a cabo en el retículo endoplasmático rugoso en el cual se sintetizan las proteínas que envuelven al genoma viral y, junto con lípidos del hospedero, envuelven a la cápside para liberar la partícula viral completa. Partículas subvirales, HBeAg y HBxAg, son secretadas de la célula (Verónica et al., 2016).

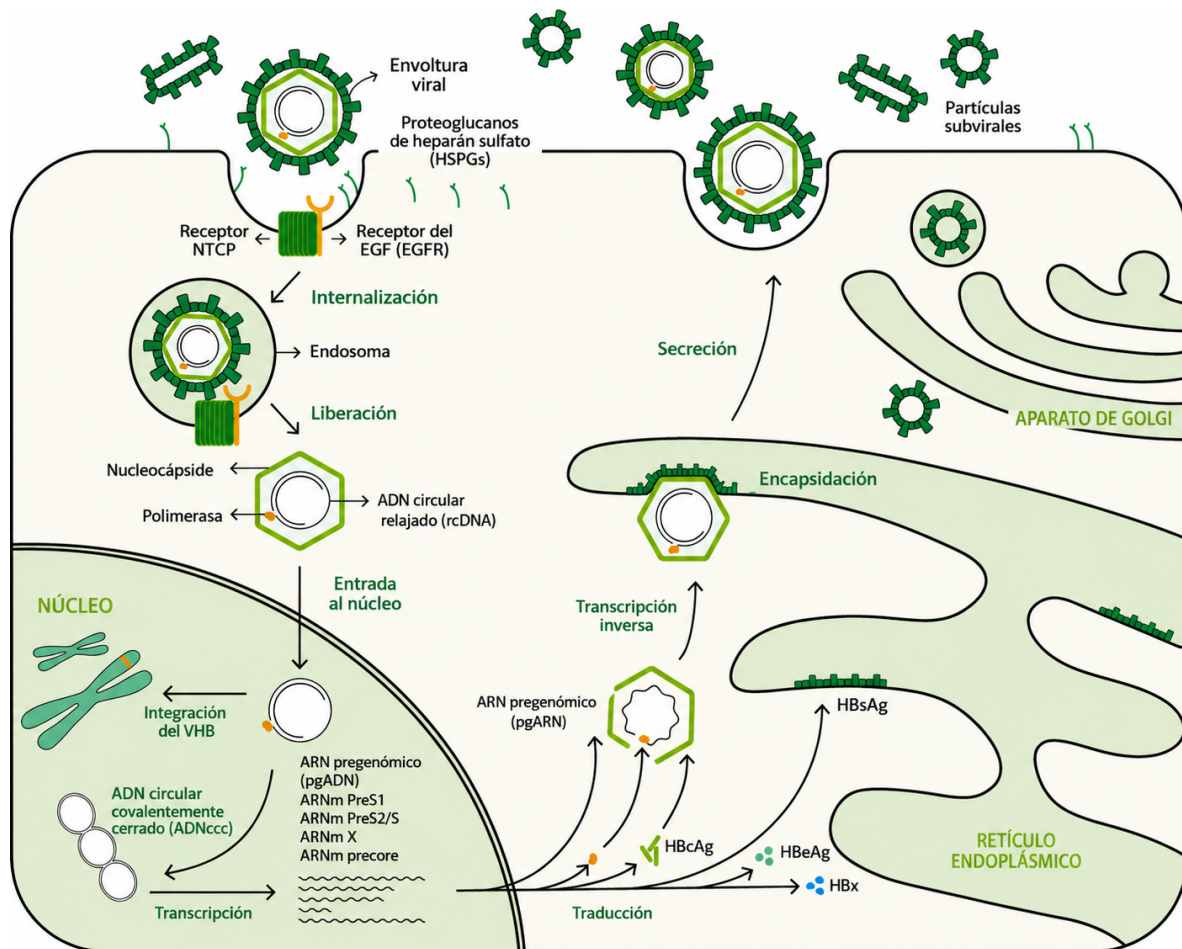


Figura 7. Ciclo de replicación del VHB (Zhao et al., 2021).

El ARNpg sale del núcleo y, en el citoplasma, tiene dos funciones: por un lado, sirve como mensajero para la síntesis de la polimerasa y de la proteína central, y por otro, es un intermediario en el proceso de replicación. Si el ADN viral continúa el tiempo suficiente en la célula, se convierte en bicatenario, y en este caso regresa al núcleo para otra onda replicativa. Sin embargo, cuando se forma un ADN de doble cadena parcial, la nucleocápside madura e interactúa con las proteínas de la envoltura en el retículo endoplasmático, para formar la partícula viral completa que es secretada por endocitosis (Verónica et al., 2016).

Proteína HBx

Es una proteína pequeña de 154 aminoácidos (aa) se subdivide en dos subdomios funcionales distintos. El amino terminal (N-terminal) el cual actúa como dominio transactivador negativo (aa 1-50) e incluye un área rica en prolina/serina (30-46

aa). El dominio carboxiterminal (C-terminal) actúa como activador transcripcional o dominio coactivador (aa 52-148) y comprende sitios de localización mitocondrial (aa 54-70; 75-88; 109-131) así como numerosas regiones diana para la interacción con proteínas hospedadoras (Schollmeier et al., 2023a).

La proteína Hbx es un componente fundamental y multifuncional del virus de la hepatitis B, con roles cruciales tanto en la replicación viral como en la patogénesis de la enfermedad hepática crónica (Tyagi et al., 2024). HBx es esencial para iniciar y mantener la replicación viral después de la infección (Kumar, 2025), su actividad está estrechamente ligada al ADN circular covalentemente cerrado (ADNccc) del VHB, el cual persiste en núcleo de los hepatocitos infectados y es la fuente de la infección crónica (Kumar, 2025; Tyagi et al., 2024).

HBx modula procesos clave tanto en el citoplasma como en el núcleo de la célula huésped, uno de estos procesos es la regulación de ADNccc, que es una de las funciones más críticas de HBx, en la regulación de la homeostasis y la transcripción de ADNccc. Del mismo modo, HBx es una proteína transactivadora que tiene la capacidad de estimular una amplia gama de promotores de genes virales y celulares (Kumar, 2025; Tyagi et al., 2024). Estudios previos han sugerido que este proceso requiere la unión de HBx con la proteína huésped de unión al ADN específico del daño (DDB1), (Sekiba et al., 2019a). De igual forma interactúa directa o indirectamente con factores de transcripción generales, reparación de ADN y moléculas de transducción de señales, HBx se asocia con mitocondrias e induce fusión y mitofagia, y se une a modificaciones de cromatina para regular negativamente la transcripción de VHB. Sin embargo, los mecanismos subyacentes de la interacción de HBx con DDB1 y la promoción de la transcripción viral han permanecido desconocidos (Schollmeier et al., 2023a). HBx también puede modular la proliferación y la viabilidad celular a través de interacciones con miembros de la familia p53 y Bcl-2. Como reflejo de sus funciones enigmáticas, se ha demostrado que HBx induce apoptosis o la previene (Jiang et al., 2016).

Tratamientos actuales para la hepatitis B

El tratamiento por infección de VHB se trata utilizando un análogo de nucleótido de un antiviral como lamivudina, entecavir o tenofovir. Junto con ellos, interferón pegilado también se utiliza con pacientes con VHB. El tratamiento para la infección crónica por VHB suprime principalmente la replicación sin eliminar el virus debido a la persistencia de ADNccc. Con la comprensión más amplia del ciclo de vida del VHB, se están desarrollando nuevos enfoques antivirales centrados en la modulación inmunitaria, la interferencia con el ciclo de vida y la propagación del virus y la terapia dirigida al ADNccc (Parikh et al., 2023).

En las investigaciones clínicas en curso, los investigadores están probando terapias antivirales basadas en moléculas pequeñas que se dirigen principalmente a interacciones moleculares complejas entre el virus y las células huésped involucradas en la replicación viral (Parikh et al., 2023).

2.2 Antecedentes y generalidades de la Nitazoxanida

La nitazoxanida, 2-ecetiloxi-N-(5-nitro-2-triazolil) benzamida (Figura 7) es tiazólido antiinfeccioso de amplio espectro con baja solubilidad acuosa, clasificado como fármaco de clase II según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), (Teixeira et al., 2024). autorizado en el 2004 por la FDA para el tratamiento de la parasitosis por protozoarios y helimitos (Romero-Cabello et al., 2021a) medicamento antiparasitario eficaz contra el virus de la influenza, *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, así como para el virus de Hepatitis B y C (Liu, 2021). A diferencia de los nitroimidazoles, dispone de mayor espectro, mayor potencia y menor toxicidad; cuenta con cuatro diferentes mecanismos de acción los cuales se describen a continuación, dependiendo del patógeno al que esté dirigida: (Romero-Cabello et al., 2021a).

- 1) Al actuar contra bacterias, interrumpe el metabolismo de estos patógenos mediante la inhibición del ciclo ferredoxina-flavodoxina-oxidorreductasa.

- 2) Actúa contra protozoarios, inhibiendo las enzimas quinona-oxidorreductasa, nitrorreductasa y proteína disulfuro-isomerasa para lesionar la membrana celular del microorganismo y despolarizar su membrana mitocondrial.
- 3) En nematodos inhibe la glutatión-transferasa y modula el gen *Avr-14* que codifica para la subunidad α del canal iónico cloruro-glutamato.
- 4) En los virus actúa suprimiendo la replicación mediante el bloqueo de la maduración de la hemaglutinina viral y la inhibición del factor de transcripción viral, además de que activa el factor de iniciación de la traducción eucariota de tipo 2- α .

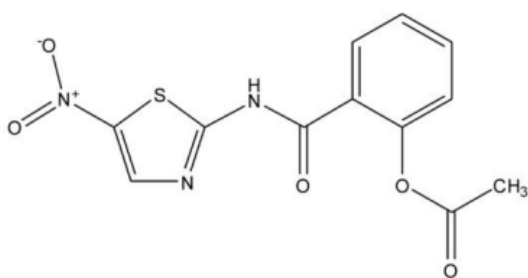


Figura 8. Estructura química de la nitazoxanida.

El metabolito activo de este fármaco es la tizoxanida (Figura 8). La reacción inicial en la vía metabólica de la nitazoxanida es la hidrólisis a tizoxanida, seguida de la conjugación principalmente por glucuronidación a glucurónido de tizoxanida. La tizoxanida se excreta en la orina y las heces (Shakya et al., 2017).

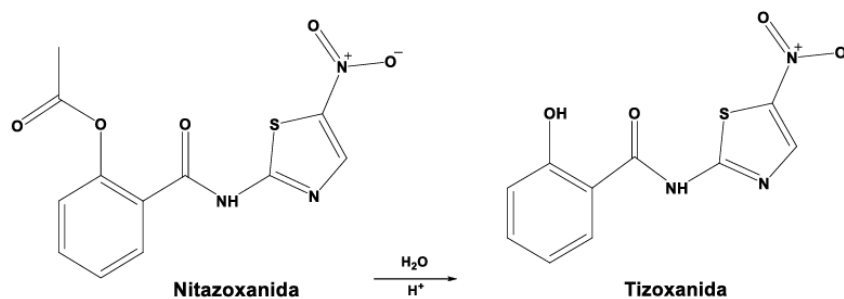


Figura 9. Metabolismo de Nitazoxanida (Torres & Gonzáles, 2022).

Las propiedades fisicoquímicas de NTZ se muestran en la tabla 3, mostrando baja solubilidad en agua. de acuerdo con los criterios establecidos por el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica, la nitazoxanida puede clasificarse dentro de la

Clase II, caracterizada por presentar baja solubilidad y alta permeabilidad (Shakya et al., 2017).

Tabla 3. *Propiedades fisicoquímicas de NTZ (Shakya et al., 2017).*

Características fisicoquímicas	
Nombre IUPAC	2-ecetiloxi-N-(5-nitro-2-triazolil) benzamida
Fórmula	C ₁₂ H ₉ N ₃ O ₅ S
Punto de fusión	202°C
Punto de ebullición	394°C
Peso molecular	307.3 g/mol
Apariencia	1.63
pKa	0.3
Solubilidad	0.00755 mg/ml (acuosa)

Actividad antiviral de Nitazoxanida

La nitazoxanida y su metabolito tizoxanida, han demostrado efectos inhibidores contra MERS-CoV y SARS-CoV-1. Además, se ha informado que la inhibición de coronavirus murino, la cepa de coronavirus bovino, el coronavirus entérico humano, y la cepa A59 del virus de hepatitis de ratón. La nitazoxanida suprime la replicación viral y activa proteínas intracelulares antivirales. La nitazoxanida y su metabolito activo circulante, tizoxanida inhiben la replicación viral de un amplio rango de virus tanto RNA como DNA, inhibiendo la maduración de la hemaglutamina viral y el factor de transcripción viral inmediato temprano 2 (IE2), así como al activar el factor de iniciación de la traducción eucariota 2 α (proteína intracelular antiviral). Por último, la NTZ exhibe un efecto inhibidor sobre la progresión de células tumorales al alterar la desintoxicación de fármacos (glutación-S-transferasa P1), la respuesta de proteínas desplegadas, la autofagia, la actividad anticitocinas y la inhibición de c-Myc (OMS, 2024). Tiene acción contra 16 cepas de influenza A/H1N1, H3N2, H3N2v, H3N8, H5N9, N7N1 y una cepa de influenza B. Actúa en contra de virus sincitial respiratorio, norovirus, dengue, fiebre amarilla, virus de encefalitis japonesa, rotavirus, hepatitis B y C, incluso contra el virus de inmunodeficiencia humana, coronavirus del SARS Y MERS, por lo cual se le considera como un fármaco antiviral con amplio espectro (Romero-Cabello et al., 2021a; Torres & Gonzáles, 2022).

Nitazoxanida y el Virus de Hepatitis B

El VHB es una fuente de enfermedad hepática progresiva significativa debido al incremento de infecciones. Se ha demostrado que la nitazoxanida y la tizoxanida, inhiben el ADN del VHB y su antígeno central (Mahmoud et al., 2020). La nitazoxanida ha sido evaluada en pacientes con infección con VHB (500 mg, dos veces al día) y se ha observado que reduce tempranamente los marcadores de infección en 22 a 33 % de paciente, y cuenta con eficacia sostenida en el mediano plazo en 89% de ellos. Un estudio sugiere que la nitazoxanida podría no solo suprimir el ADN de VHB sérico, sino también conducir pérdida de HBsAgs sérico en un número significativo de casos; esto es consistente con evaluaciones *in vitro* previas (Rossignol & Bréchet, 2019). Por otra parte, la nitazoxanida se encuentra en ensayos clínicos aleatorizados para ser aprobado por la FDA como medicamento antiviral, actuando como modulador la quinasa EIF-2, inhibidor de la proteína HN, Inhibidor de la oxidoreductasa; modulador de la proteína tirosina quinasa del receptor, encontrándose en la segunda fase de desarrollo indicado para el tratamiento de VHB (Parikh et al., 2023).

Formulaciones de nitazoxanida

La nitazoxanida es un fármaco disponible en el mercado en forma de tabletas y polvo para suspensión oral. Sin embargo, presenta una solubilidad acuosa muy baja, considerada prácticamente como insoluble, lo cual repercute en una biodisponibilidad oral reducida y limita su eficacia terapéutica. De acuerdo con el Sistema de Clasificación Biofarmacéutica (BCS), se ubica en la clase II, caracterizada por baja solubilidad y alta permeabilidad. Así mismo, la NTZ se ha descrito como inestable en estado sólido y en solución, mostrando susceptibilidad a condiciones de calor, oxidación, pH ácido y exposición a la luz (Lira et al., 2021a).

Con el fin de superar estas limitaciones, se han desarrollado distintos sistemas de liberación. La formulación actualmente disponible corresponde a una forma de liberación inmediata; sin embargo, se reconoce la necesidad de nuevas estrategias que optimicen la biodisponibilidad de moléculas poco solubles. Entre estas, los sistemas de liberación sostenida o modificada representan alternativas

de interés, ya que permiten prolongar la permanencia del fármaco en el organismo y mejorar su perfil farmacocinético (Arti & Ashwini, 2019). La NTZ se ha formulado en sistemas innovadores como Liposomas, que han demostrado especial utilidad en oncología, mejorando la biodistribución y direccionamiento selectivo hacia células tumorales. Los cocrystal con ácidos succínico y glutárico aumentan la solubilidad y disolución, aunque presentan inestabilidad en medios acuosos, lo cual limita su aplicación clínica directa (Lira et al., 2021b).

Las microesferas poliméricas ofrecen encapsulación eficiente y una liberación controlada, mientras que los comprimidos bicapa permiten combinar una dosis de carga inmediata con una fase de liberación sostenida hasta 12 h, optimizando la adherencia terapéutica. Así mismo, los comprimidos con hidrogel superporoso han demostrado un perfil de liberación casi total (99.54 %) con potencial gastrorretentivo(Lira et al., 2021b).

Por otro lado, los comprimidos de liberación sostenida, basados en matrices poliméricas que han conseguido extender la liberación del fármaco de manera controlada, con perfiles cinéticos cercanos a orden cero y mejoras terapéuticas frente a formas convencionales. Finalmente, las nanopartículas lipídicas solidas representan una de las estrategias más prometedoras, con eficiencia de encapsulación y liberación sostenida del principio activo, lo que favorece su estabilidad y biodisponibilidad (Lira et al., 2021b).

En conjunto, estas formulaciones innovadoras constituyen alternativas valiosas para potenciar la eficacia terapéutica de la NTZ, abriendo el camino para su reposicionamiento en múltiples áreas farmacológicas.

2.3 Nanopartículas poliméricas

El término “nanopartícula” comprende tanto nanocápsulas como nanoesferas, las cuales se diferencian en su morfología (figura 9). Donde las nanoesferas se basan en una red polimérica continua en la que el fármaco puede retenerse en el interior o adsorberse en su superficie. Mientras que las nanocápsulas están compuestas por un núcleo aceitoso en el que normalmente se disuelve el fármaco, rodeado de

una cubierta polimérica que controla el perfil de liberación del fármaco desde el núcleo (Zielinska, Carreiró, et al., 2020).

Las nanopartículas poliméricas (NP) son sistemas coloidales formados por polímeros naturales o sintéticos, buscando que sean biodegradables, donde la elección del polímero y las condiciones de autoensamblaje brindan una considerable flexibilidad del diseño al permitir la modulación de las propiedades fisicoquímicas, así como sus propiedades de liberación. Las nanopartículas poliméricas presentan varias ventajas significativas entre otros nanoportadores como los liposomas, micelas y nanosistemas; siendo portadores de fármacos incluyen su uso potencial para la liberación controlada, capaces de proteger fármacos y a otras moléculas con capacidad biológica contra el medio ambiente, mejora de biodisponibilidad e índice terapéutico (Gagliardi et al., 2021a; Zielinska, Carreiró, et al., 2020).

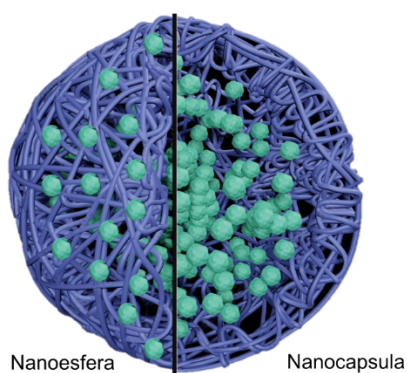


Figura 10. Representación de la estructura de nanocápsulas y nanoesferas (Zielinska, Carreiró, Oliveira, Neves, Pires, Venkatesh, et al., 2020b).

Las NP suscitan interés debido a su pequeño tamaño y a la posibilidad de modificar el perfil de biodistribución y de liberación del fármaco encapsulado. No obstante, las NP también presentan ciertas limitaciones en lo que respecta a su potencial antigenicidad y a aspectos relacionados con la degradación del polímero (González, 2022).

Nanopartículas poliméricas en el tratamiento de infecciones antivirales

Las enfermedades virales pueden destruir células, tejidos y órganos, lo que provoca hasta la muerte del ser humano. Los agentes terapéuticos antivirales son muy necesarios para prevenir la propagación de infecciones virales (Uday et al., 2023). Es importante disponer de medios eficaces para prevención la transmisión viral y reducir los sus efectos sobre la salud. Aunque ya existen muchos antivirales disponibles, su eficacia suele ser limitada debido a factores como: mala solubilidad, baja permeabilidad, mala biodisponibilidad, liberación no dirigida, efectos secundarios adversos y resistencia a antivirales (Delshadi et al., 2021a).

Dado que la administración precisa de medicamentos es uno de los principales obstáculos en el desarrollo de potentes candidatos a fármacos antivirales, se ha sugerido que las nanopartículas poliméricas son posibles agentes de administración de medicamentos antivirales equipados con mecanismos de administración de medicamentos sostenidos y controlados, con biodisponibilidad mejorada y menos toxicidad y efectos secundarios (Sharmin et al., 2021).

Nanosistema polimérico de nitazoxanida

La obtención de nanopartículas poliméricas cargadas con nitazoxanida, fueron elaboradas por la M. F. Samaria Cortez Nuñez, donde para su desarrollo se siguió el método de emulsión simple/difusión de disolvente, mostrando los resultados de la caracterización física de las nanopartículas cargadas con nitazoxanida, en el cual se observa que los tamaños de partícula fueron de 370 ± 5 nm, con un índice de polidispersión de 0.180 ± 7 , potencial zeta de -11 ± 3 mV, una concentración de carga del 1 ± 3 % y una eficiencia de encapsulación del $98 \% \pm 0.4$. Obteniendo perfiles de liberación *in vitro* del 25 % de fármaco liberado a 72 h a partir de las nanopartículas poliméricas (PNs), a diferencia del fármaco libre que solo liberó el 5 %, reflejando una mejora en la solubilidad acuosa de NTZ. El estudio de permeabilidad demostró que el nanosistema de PNs-NTZ presenta una mayor permeabilidad en comparación de la NTZ en suspensión, donde el promedio de las constantes de permeabilidad de las PNs-NTZ es de 4.22×10^{-05} cm/s y para

NTZ en suspensión de 8.38×10^{-06} cm/s, lo cual nos indica que el nanosistema ha incrementado la capacidad de permear de la NTZ (Cortez, 2023).

3. JUSTIFICACIÓN

La infección por el virus de la hepatitis B influye en la morbilidad y la mortalidad en todo el mundo porque es causa de fibrosis hepática, carcinoma hepatocelular (CHC) incluso la muerte (OMS, 2024). Los fármacos antivirales disponibles en la actualidad tienen una alta eficacia y seguridad, sin embargo, son altamente costosos y algunos países no cuentan con programas de acceso a estos. El desarrollo de la terapia antiviral ha generado ofrecer tratamientos simples pero eficaces, las investigaciones sobre la biología celular del VHB y su interacción con el huésped se han visto limitadas durante años por la falta de un sistema de cultivo celular *in vitro* capaz de reproducir el ciclo replicativo completo del VHB, incluida la producción de plásmidos virales infecciosos. La nitazoxanida es un fármaco de interés debido a su amplio espectro de actividad antiviral probada frente al VHB (Sekiba et al., 2019b; Su, 2019), además de su reposicionamiento como agente antiviral representa una estrategia terapéutica relevante. Por otro lado, la eficacia de los tratamientos puede mejorarse mediante el uso de la nanotecnología donde por ejemplo las nanopartículas poliméricas, presentan entre sus ventajas propiciar una liberación controlada del fármaco, mejora de la biodisponibilidad, protección del fármaco, alta capacidad de carga del principio activo, disminución en dosis, tiempos de administración y una posible disminución de los efectos adversos. Cabe señalar que en un estudio previo se realizó la encapsulación de NTZ, se obtuvieron y caracterizaron nanopartículas poliméricas, cargadas con NTZ por el método de emulsión simple/difusión de disolvente. Es por ello, que en el presente proyecto se evaluaron esas nanopartículas en modelos de expresión de la proteína HBx, crucial en el ciclo de replicación del VHB, de tal forma que pudieran ser una potencial alternativa en la administración de fármacos antivirales.

4. HIPÓTESIS

Las nanopartículas poliméricas cargadas con nitazoxanida reducen la expresión de la proteína HBx del virus de la hepatitis B en cultivos de células HepG2 transfectadas, favoreciendo la viabilidad celular y disminuyendo los eventos asociados a muerte celular en comparación con la nitazoxanida libre.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la eficacia de las nanopartículas cargadas de nitazoxanida para reducir la expresión de la proteína HBx en un modelo de infección de Hepatitis B.

5.2 Objetivos específicos

- Realizar microscopía electrónica de barrido de las nanopartículas, como evidencia visual complementaria.
- Funcionalizar la superficie de nanopartículas cargadas con nitazoxanida mediante el marcaje fluorescente con FITC.
- Evaluar la expresión de la proteína HBx del virus de la hepatitis B en cultivos celulares de HepG2 transfectados, mediante análisis de PCR.
- Caracterizar los cultivos celulares de HepG2 transfectados con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx como modelo experimental para el estudio de la infección y expresión de la proteína HBx.
- Evaluar la actividad antiviral de las nanopartículas cargadas con nitazoxanida mediante análisis de viabilidad celular por ensayo MTS, anexina V, detección de fragmentación de ADN y microscopía de epifluorescencia.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1 Obtención de las nanopartículas cargadas con nitazoxanida

Las nanopartículas poliméricas cargadas con nitazoxanida (PNPs-NTZ) empleadas en el presente estudio fueron previamente desarrolladas y caracterizadas por Cortez Núñez (2023) en la tesis de maestría titulada *“Desarrollo y caracterización de un nanosistema polimérico de nitazoxanida con potencial actividad antiviral”*. La síntesis de las nanopartículas se llevó a cabo en el Laboratorio 4 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos mediante la técnica de emulsión simple seguida de evaporación de disolvente.

Debido a que la fabricación y caracterización fisicoquímica de las PNP-NTZ no formaron parte de los objetivos experimentales de la presente investigación, se emplearon los lotes previamente obtenidos para la evaluación de su actividad biológica y antiviral en cultivos celulares.

La formulación optimizada presentó un tamaño de partícula promedio de 360 ± 18 nm, un índice de polidispersidad (PDI) de 0.171 ± 0.01 , un potencial zeta de -10 ± 1.2 mV, una capacidad de carga (%CC) de 1 ± 0.2 % y una eficiencia de encapsulación (%EE) de 96 ± 2.2 %. Asimismo, la caracterización mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC) y difracción de rayos X en polvo (DRXP) demostró que la nitazoxanida se encontraba en estado amorfo dentro de la matriz polimérica. Por otra parte, los estudios de espectroscopía infrarroja (IR) indicaron la ausencia de interacciones químicas significativas entre el fármaco y los componentes de la formulación, confirmando la adecuada incorporación de la nitazoxanida en el nanosistema.

Los estudios de liberación *in vitro* mostraron una liberación sostenida del fármaco, alcanzando aproximadamente un 25 % a las 72 h, mientras que la nitazoxanida en suspensión presentó una liberación cercana al 5 % durante el mismo periodo.

Adicionalmente, los ensayos de permeabilidad evidenciaron una mayor transferencia de nitazoxanida desde las nanopartículas en comparación con la suspensión del fármaco, registrándose una masa permeada de 6.5 μg y 3.1 μg a los 240 min, respectivamente.

Los procedimientos detallados de fabricación, así como la caracterización fisicoquímica completa de las PNP-NTZ, pueden consultarse en la tesis de Cortez Núñez (2023), utilizada como referencia para el presente trabajo. Por lo tanto, en esta investigación únicamente se emplearon las nanopartículas previamente desarrolladas para la evaluación de su potencial actividad antiviral en un modelo celular de expresión de la proteína HBx del virus de la hepatitis B.

6.2 Microscopía electrónica de barrido

Las nanopartículas cargadas con nitazoxanida empleadas en este estudio fueron previamente desarrolladas y caracterizadas por Cortez Núñez (2024) en el Laboratorio 1 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, como parte de la tesis de maestría titulada *“Desarrollo y caracterización de un nanosistema polimérico de nitazoxanida con potencial actividad antiviral”*. Con el propósito de complementar la caracterización fisicoquímica reportada en dicho trabajo, en el presente estudio se realizó la caracterización morfológica de las nanopartículas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB). El análisis se llevó a cabo en el Instituto de Ciencias Físicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (ICF-UNAM), utilizando un microscopio electrónico de barrido JEOL® modelo JSM-IT500LV.

Las muestras se prepararon mediante deposición directa de una alícuota de la suspensión coloidal sobre un soporte metálico con superficie adherente conductora, seguido de un secado a temperatura ambiente bajo condiciones controladas. Posteriormente, las muestras fueron recubiertas con una capa conductora de plata por medio de pulverización catódica, con el objetivo de mejorar la conductividad superficial y evitar artefactos generados por acumulación de carga durante la observación.

El análisis se efectuó en modo de bajo vacío, empleando voltajes de aceleración entre 5 y 15 kV, seleccionados de acuerdo con la resolución requerida. Se obtuvieron micrografías a diferentes aumentos para permitir la evaluación detallada de la morfología.

6.3 Marcaje de nanopartículas cargadas con nitazoxanida

Recubrimiento de nanopartículas cargadas con nitazoxanida

Este protocolo el procedimiento para recubrir nanopartículas de policaprolactona (PCL) cargadas con nitazoxanida (NTZ) utilizando una solución acuosa de quitosano en ácido acético al 0.5 %. Posteriormente, se realizó una diálisis contra tampón PBS para adaptar el sistema a condiciones fisiológicas sin el uso de solventes orgánicos. Este método permite conservar la funcionalidad de los grupos amino del quitosano, esenciales para futuras conjugaciones, como con FITC.

Solución de quitosano

Se preparó una solución de ácido acético al 0.5% en agua mili-Q para disolver lentamente el quitosano 448869-50G de bajo peso molecular Merck-Aldrich® al 0.1% bajo agitación constante hasta su completa disolución (Huang et al., 2023).

Recubrimiento de nanopartículas

Las nanopartículas previamente obtenidas se resuspendieron en agua Milli-Q. Posteriormente, se añadió lentamente el volumen correspondiente de solución de quitosano en una relación 1:1 (v/v) respecto a la suspensión de nanopartículas, manteniendo una agitación suave durante 40 min para favorecer el recubrimiento superficial. Finalmente, se realizaron lavados para eliminar el exceso de quitosano no adherido mediante centrifugación a 13,000 rpm durante 20 min utilizando una centrifuga Eppendorf™ 5804 R (Dyawanapelly et al., 2016).

Marcaje con FITC

Conjugar FITC (fluoresceína isotiocianato) covalentemente a los grupos amina primaria superficiales del quitosano en las nanopartículas cargadas con nitazoxanida.

Se añadió lentamente la solución de FITC SIGMA® a la suspensión de nanopartículas cargadas con nitazoxanida relación 1:10, se dejó incubando por 48 h a 4 °C. Posteriormente fueron centrifugadas a 10,000 rpm (Eppendorf™ Centrifuge 5804 R) por 5 min a 4°C lavando pellet con PBS pH 9 hasta eliminar exceso del fluoróforo en tubos Spin-X® UF (Dyawanapelly et al., 2016).

6.4 Caracterización de cultivo de células HepG2

La línea celular HepG2 (ATCC® HB-8065™) es un modelo biológico ampliamente empleado en investigaciones biomédicas y farmacológicas debido a su origen hepático humano y a su capacidad de conservar múltiples funciones metabólicas características de los hepatocitos normales. Derivada de un carcinoma hepatocelular de un varón de 15 años, esta línea exhibe morfología epitelial y crecimiento adherente en monocapa, lo que facilita su manejo experimental y la evaluación de procesos infecciosos o metabólicos dependientes de la funcionalidad hepática. La tabla 4 presenta la descripción detallada de las características morfológicas, genéticas y funcionales de la línea celular HepG2 (ATCC, 2024).

Tabla 4. Descripción de linaje celular HepG2 (ATCC, 2024)

Repositorio	ATCC (American Type Culture Collection)
Cat. No.	HB-8065
Descripción	Hep G2 [HEPG2] es una línea celular que exhibe morfología epitelial que se aisló de un carcinoma hepatocelular de un joven varón blanco de 15 años con cáncer de hígado. La línea celular fue depositada por el Instituto Wistar y es un huésped de transfección adecuado. Los marcadores de expresión incluyen insulina; factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF II).
Organismo	Homo Sapiens
Origen	Hígado. Masculino de 15 años.
Propiedades del cultivo	Monocapa, Adherente
Perfil de ADN STR	TH01: 9 D5S818: 11, 12 D13S317: 9, 13 D7S820: 10 D16S539: 12, 13 CSF1PO: 10, 11 Amelogenin: X, Y vWA: 17 TPOX: 8, 9
Cariotipo	Aneuploid (hipotetraploide)
Tumorigénico	No

Genes expresados	alfa-fetoproteína (AFP, alfa fetoproteína); albúmina; alfa2 macroglobulina (alfa-2-macroglobulina); alfa1 antitripsina (alfa-1-antitripsina); transferrina; alfa1 antitripsina (alfa-1-antitripsina); Haptoglobina; ceruloplasmina; plasminógeno, complemento (C4); activador C3; fibrinógeno; glicoproteína ácida alfa1 (glicoproteína ácida alfa-1); alfa2 glicoproteína HS (alfa-2-HS-glicoproteína); beta lipoproteína (beta-lipoproteína); Proteína de unión al retinol (proteína de unión al retinol)
Marcadores de expresión	Insulina; factor de crecimiento similar a la insulina II (IGF II).

Protocolo de congelamiento, descongelamiento y subcultivo de células HepG2

Descongelamiento de células HepG2

Se verificó la temperatura (37 °C) y el nivel del baño de agua. Se preparó el medio DMEM-F12 (gibco) con una concentración de suero fetal bovino al 20 %. Se extrajo el vial del tanque de nitrógeno líquido y se transportó en un recipiente congelador. Se comprobó que la etiqueta del vial correspondiera con la línea celular y se sumergió el vial en el baño de agua a 37 °C, evitando que el agua alcanzara la tapa para reducir el riesgo de contaminación. Una vez descongelado el contenido del vial, se desinfectó su superficie con etanol al 70 % y se abrió dentro de la campana de flujo laminar. Se transfirió el contenido del vial a un tubo de centrifuga de 15 mL. Se añadieron lentamente 10 mL de medio DMEM-F12 sin suero, primero gota a gota y luego aumentando gradualmente el flujo para diluir de forma paulatina las células y el crioprotector. Se centrifugó durante 5 min a 700 rpm (VELAB™ VE-4000). Se descartó el sobrenadante con el crioprotector. El pellet celular se resuspendió con cuidado en 5 mL de medio DMEM-F12 suplementado con un 20 % de suero fetal bovino. Se transfirió la suspensión a un matraz T-25 cm² y se incubó a 37 °C con un 5 % de CO₂. Se rotuló el matraz con la línea celular, la fecha, el usuario y el medio de cultivo. El cultivo se observó en el microscopio invertido a las 24 h.

Congelamiento de Células HepG2

Se confirmó que el cultivo cumplía los criterios para ser congelado, entre ellos un aspecto saludable, morfología característica y ausencia de contaminación; además, se encontraba en la última etapa de la fase exponencial. Se preparó el medio de criopreservación con la siguiente proporción: DMEM-F12, 20 % de suero fetal bovino y 10 % de DMSO. Se tripsinizó el cultivo y se cuantificaron las células.

Estas se centrifugaron a 700 rpm durante 5 min y el pellet resultante se resuspendió en el medio de criopreservación, ajustando la concentración entre 1×10^6 cel/mL y 1×10^7 cel/mL. Se dispensó la suspensión en crioviales debidamente etiquetados y se cerraron hasta el límite de torsión de la tapa. Los crioviales se congelaron a -1 °C/min en un congelador de velocidad controlada durante 6 h a -70 °C. Después, se trasladaron rápidamente a un tanque de nitrógeno líquido, ya que los crioviales se recalentarían aproximadamente 10 °C/min, comprometiendo la viabilidad celular si la temperatura superara los -50 °C. Se documentó el número de crioviales y su ubicación dentro del tanque de nitrógeno líquido.

Subcultivo de células HepG2 en monocapa

Se preparó la campana de flujo laminar y se limpió con etanol al 70 %. Los reactivos y materiales necesarios para el procedimiento también se desinfectaron con etanol al 70 % y se colocaron de inmediato dentro de la campana. El cultivo se examinó minuciosamente, evaluando el pH, la densidad celular y la morfología para descartar signos de contaminación o deterioro. La caja de cultivo se trasladó al área de trabajo estéril. Se preparó el medio de mantenimiento con la siguiente proporción: DMEM-F12 suplementado con un 10 % de suero fetal bovino. Se retiró el medio de cultivo gastado y se lavó el cultivo con 3 mL de PBS (para una caja de 25 cm²). Posteriormente, se añadieron 2 mL de tripsina-EDTA al 0,25 % y se incubó durante 5 min a 37 °C en una atmósfera al 5 % de CO₂. Se añadió a continuación un volumen cuádruple de medio de mantenimiento para inactivar la tripsina, alcanzando un volumen total de 10 mL, y se transfirió la suspensión celular a un tubo de centrifuga de 15 mL. La mezcla se centrifugó a 800 rpm (VELAB™ VE-4000) durante 5 min; el sobrenadante se descartó y el pellet se resuspendió cuidadosamente en 5 mL de medio de mantenimiento. La concentración celular se determinó mediante el método de exclusión con azul de tripano y se ajustó a 2×10^5 células/mL en un volumen final de 5 mL (caja de 25 cm²), aplicando una relación de subcultivo de 1:4 a 1:6. Finalmente, la caja se incubó a 37 °C con 5 % de CO₂.

6.5 Elección del Plásmido pcDNA3.1-Flag HBx.

El plásmido pcDNA3.1-Flag HBx (Figura 11) se obtuvo a través de la plataforma Addgene. El uso de este plásmido ofrece diversas ventajas específicas en la investigación del virus de la hepatitis B, especialmente en estudios sobre la función de la proteína HBx, su interacción con proteínas celulares, expresión en células eucariotas, así como la presencia de epítipo FLAG para la detección y purificación (Yang & Bouchard, 2012). Su amplificación se realizó en *Escherichia coli* DH5α y, posteriormente, los plásmidos se purificaron mediante el kit Miniprep (Thermo), de modo que quedaron disponibles los stocks correspondientes.

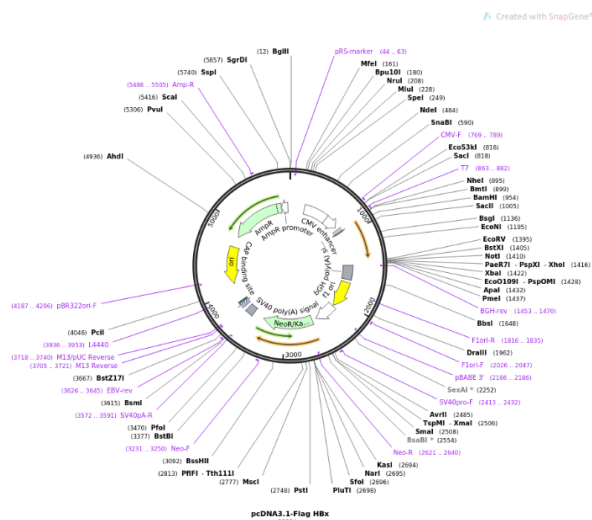


Figura 11. Mapa de secuencia completa de Addgene para pcDNA3.1-Flag HBx.

Amplificación y Purificación del Plásmido pcDNA3.1-Flag HBx en Bacterias DH5α

Transformación y selección

Se mezclaron 50 µL de células competentes DH5α con 1-5 µL de plásmido pcDNA3.1-Flag HBx (~100 ng). Se incubaron en hielo durante 30 minutos. Se realizó un choque térmico a 42°C durante 45-60 segundos. Posteriormente se volvió a incubar en hielo por 2 minutos. Se añadieron 450 µL de medio SOC (o LB) sin antibióticos y se incubó a 37°C durante 1 hora con agitación. Se colocaron de

100-200 μ L de la mezcla en placas de agar LB que contenían el antibiótico correspondiente (ampicilina a 100 μ g/mL). Las placas se incubaron a 37°C durante la noche.

Cultivo y Amplificación del Plásmido

Cultivo de colonias

Se seleccionarán colonias individuales y se transferirán a 5 mL de medio LB con ampicilina. Se incubarán a 37°C con agitación (200-250 rpm) durante 8-12 horas. Se inocularon 100-500 μ L del pre-cultivo en 50-100 mL de medio LB con ampicilina. Se incubaron a 37°C con agitación durante 12-16 horas.

Purificación del Plásmido

Se procedió con la purificación del plásmido utilizando el protocolo estándar del GeneJET Plasmid Miniprep Kit correspondiente (Thermo Fisher scientific, 2025).

ANEXO 1

Verificación del Plásmido

Se realizó una digestión de restricción con enzimas específicas para confirmar la identidad y tamaño del plásmido. Los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa y se visualizaron bajo luz UV tras teñir con bromuro de etidio.

Este protocolo proporcionó una guía completa para la amplificación y purificación del plásmido pcDNA3.1-Flag HBx en bacterias DH5 α , asegurando la obtención de plásmido en cantidad y pureza adecuadas para experimentos posteriores.

6.6 Evaluación antiviral

Evaluación antiviral en modelo en cultivos de células HEK293 infectados con r-Ad5.

El ensayo antiviral se realizó utilizando un adenovirus recombinante tipo 5 (r.Ad5) como modelo de infección viral, con el objetivo de evaluar la capacidad inhibitoria de la Nitazoxanida, su metabolito activo Tizoxanida y las nanopartículas poliméricas cargadas con Nitazoxanida.

Las células HEK293 fueron cultivadas en medio DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS), 1% de penicilina/estreptomicina y 1% de L-glutamina, manteniéndose a 37 °C en una atmósfera húmeda con 5% de CO₂. Una vez alcanzada una confluencia, los cultivos se infectaron con el virus rAd5 a una multiplicidad de infección de 10.

Las células fueron tratadas con las diferentes condiciones experimentales: Nitazoxanida (0.15 µM), Tizoxanida (0.15 µM) y nanopartículas de Nitazoxanida (equivalente a 0.15 µM del fármaco). Los controles incluyeron un cultivo sin infectar (control negativo) y un cultivo infectado sin tratamiento (control positivo).

Los cultivos se incubaron durante 96 h postinfección bajo las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo de exposición, se evaluó la actividad antiviral mediante tinción con cristal violeta. Para ello, las células fueron fijadas con paraformaldehído al 4% durante 20 min, lavadas con PBS y teñidas con una solución de cristal violeta al 0.5% durante 30 min. Posteriormente, se enjuagaron con agua destilada y se dejaron secar a temperatura ambiente. La intensidad del colorante retenido se utilizó como indicador visual de la inhibición de la infección viral, donde una mayor retención de color se interpretó como una menor lisis celular y, por tanto, una mayor actividad antiviral.

Adicionalmente, la viabilidad celular fue cuantificada mediante el ensayo colorimétrico de MTS para corroborar los resultados de la tinción. Las lecturas de absorbancia se realizaron a 490 nm utilizando un lector de microplacas. Los valores se expresaron como porcentaje de viabilidad relativa respecto al control sin infección, considerando la media y desviación estándar de tres réplicas biológicas con tres réplicas técnicas cada una.

6.7 Transfección con Lipofectamina 2000 para Células HepG2 con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx

Preparación de Células:

Un día antes de la transfección, se sembraron las células HepG2 en una placa de cultivo de manera que alcanzando un 70 - 90 % de confluencia el día de la transfección. Se utilizará un medio de cultivo adecuado sin antibióticos.

Preparación del Complejo de Transfección

Solución A (Plásmido): Se diluyeron n 0.8-2 µg de plásmido pcDNA3.1-Flag HBx en 50-100 µL de Opti-MEM o DMEM sin suero y sin antibióticos, ajustando el volumen y la cantidad de plásmido proporcionalmente para otras placas.

Solución B (Lipofectamina 2000): Se diluyeron 2-5 µL de Lipofectamina 2000 en 50-100 µL de Opti-MEM o DMEM sin suero y sin antibióticos, ajustando el volumen proporcionalmente para otras placas. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos.

Mezcla de Soluciones A y B: Se mezclaron suavemente las soluciones A y B, dejándolas incubar a temperatura ambiente durante 20 minutos para permitir la formación de complejos de ADN-Lipofectamina.

Transfección de Células:

Se removió el medio de cultivo de las células HepG2 y se lavaron con PBS. Se añadió 0.5-1 mL de Opti-MEM o DMEM sin suero y sin antibióticos a cada pozo. Posteriormente, se añadió la mezcla de ADN-Lipofectamina preparada (A+B) de manera uniforme a cada pozo. Las células se incubaron con el complejo de transfección en la incubadora de CO₂ a 37°C durante 4-6 horas.

Cambio de Medio

Después de la incubación, se removió la mezcla de transfección y se añadieron 2 mL de medio de cultivo completo (con suero y antibióticos) a cada pozo. Las células continuaron incubándose a 37°C con 5% de CO₂ hasta el momento del análisis.

Monitoreo de la expresión de HBx

Se diseñaron y se mandaron a sintetizar los primers correspondientes para las secuencias que expresa la proteína HBx del virus del VHB. Se extrajo el ARN total de los cultivos de células HepG2 transfectados con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx. El ARN será convertido a cDNA a través de la reacción de RT-PCR para la posteriormente se monitoreo la expresión de HBx por PCR Punto final.

6.8 Extracción de RNA

Recolección de células

Se cultivaron las células HepG2 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx. Se cosecharon las células mediante tripsinización o recolección directa del medio de cultivo.

Lisis celular

Se utilizó un reactivo de lisis específico para la extracción de RNA, como Trizol o un kit comercial. El reactivo de lisis se añadió a las células recolectadas y se homogeneizará para asegurar una lisis completa de las células.

Aislamiento de RNA

Se siguió el protocolo del reactivo o kit para separar el RNA del ADN y proteínas, lo que generalmente incluirá pasos de separación de fases, precipitación, lavado y disolución del RNA. Se medirá la concentración y pureza del RNA utilizando un espectrofotómetro, como un Nanodrop.

6.9 Síntesis de cDNA (Transcripción Inversa)

Preparación de la reacción de RT

Se utilizó un kit de transcripción inversa para convertir el RNA aislado en cDNA. Se mezcló una cantidad adecuada de RNA, generalmente 1 µg, con primer de oligo(dT) y buffer de transcripción inversa. Luego, se añadió la enzima transcriptasa inversa, como M-MLV o SuperScript.

Reacción de transcripción inversa

Se incubó la mezcla a una temperatura óptima, usualmente entre 37-50°C, durante el tiempo especificado por el fabricante del kit, generalmente de 30 a 60 minutos. Luego, se inactivó la transcriptasa inversa mediante calentamiento a una temperatura de 70 - 85°C durante unos minutos.

6.10 PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa)

Preparación de la mezcla de PCR

Se utilizó un kit de PCR y se preparó una mezcla que contendrá el cDNA sintetizado a partir de RNA, primers específicos para el gen HBx, dNTPs, buffer de PCR, y DNA polimerasa, como la Taq polimerasa.

Reacción de PCR

Se configuró el termociclador con un programa típico que incluirá una desnaturalización inicial a 94-95°C durante 2-5 minutos, seguida de 30-40 ciclos de amplificación, con desnaturalización a 94-95°C durante 30 segundos, alineación (annealing) a 50-60°C (dependiendo de la T_M de los primers) durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 30 segundos a 1 minuto, dependiendo del tamaño del amplicón. Finalmente, se realizará una extensión final a 72°C durante 5-10 minutos.

Análisis de PCR

Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1-2% y se teñieron con bromuro de etidio o un tinte alternativo, como SYBR Safe, para su visualización bajo luz UV. Se verificó el tamaño del amplicón comparándolo con un marcador de peso molecular de 120 pb.

6.11 Evaluación antiviral en modelo de expresión de la proteína HBx del virus de la hepatitis B en células HepG2.

Posterior a de cuatro días de la transfección, las células se lavaron con medio fresco DMEM-F12 y fueron tratadas con nanopartículas cargadas con NTZ a

diferentes concentraciones a 0, 24 y 48 horas. Se incluyó un grupo de células de control (0,5% DMSO) (n = 2) incluido.

MTS

El ensayo MTS (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay) es una técnica colorimétrica empleada para evaluar la viabilidad y proliferación celular. Este ensayo mide la actividad metabólica de las células, lo cual sirve como un indicador indirecto de su viabilidad, a través de la reducción del reactivo MTS a formazán soluble en agua por las células viables.

Para llevar a cabo el ensayo, se dispuso de varios materiales, incluyendo el reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution (que contendrá MTS y fenazina metosulfato (PMS)), células para evaluar en una placa de 96 pozos, un medio de cultivo celular adecuado para la línea celular que se utilice, una incubadora a 37°C con 5% de CO₂, y un espectrofotómetro de placa (lector de microplacas).

Primero, se sembraron las células en una placa de 96 pozos a una densidad adecuada, generalmente entre 1,000 y 10,000 células por pozo, y se les permitiera adherirse y crecer durante 24 horas en la incubadora. Se añadieron a los pozos los tratamientos correspondientes y se incubarán durante el tiempo deseado.

A temperatura ambiente, se añadieron 20 µL del reactivo CellTiter 96® AQueous One Solution directamente a cada pozo que contendrá 100 µL de medio de cultivo celular. Se evita la formación de burbujas al añadir el reactivo, ya que estas podrían interferir con la lectura espectrofotométrica. Posteriormente, se incubó la placa en la incubadora a 37°C con 5% de CO₂ durante 1 a 4 horas, tiempo que variará dependiendo de la actividad metabólica de las células y que deberá optimizarse para cada tipo celular. Durante la incubación, las células viables reducirán el MTS a formazán, produciendo un color marrón soluble.

Finalmente, tras la incubación, se midió la absorbancia a 490 nm usando el lector de microplacas, siendo esta absorbancia proporcional a la cantidad de células viables en cada pozo. Si la placa contuviera medio de cultivo y reactivo MTS sin células (controles en blanco), se restará su valor de absorbancia de las lecturas

experimentales para corregir cualquier absorbancia de fondo. Se comparó la absorbancia de los pozos tratados con la de los controles para determinar el efecto de los tratamientos sobre la viabilidad celular, y se calculará la viabilidad celular como porcentaje en relación con los controles no tratados.

6.12 Microscopia de epi fluorescencia, tinción diferencial AO/IP.

La tinción de naranja de acridina/ ioduro de propidio (AO/PI) es una técnica de microscopia para diferenciar entre células vivas y muertas. Se basa en la capacidad del naranja de acridina (AO) de unirse a los ácidos nucleicos de todas las células y del yoduro de propidio (PI) de penetrar solo en células con membranas plasmáticas permeables (células muertas o en proceso de muerte). Permite identificar células vivas (fluorescencia verde) y células muertas (fluorescencia roja) (Lin et al., 2017). Se realizaron las micrografías de epifluorescencia de las células: Control sin transfectar (Control (-) de muerte), de células Hep G2 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx y el control (+) de muerte células tratadas con 20 μ M de Cisplatino.

6.13 Extracción de ADN

La apoptosis es una forma distintiva de muerte celular programada, se caracteriza por cambios morfológicos clave, siendo la fragmentación del ADN su sello distintivo. Ara evaluar este fenómeno, se empleó el ensayo de escalera de ADN, citometría de flujo y microscopia de epifluorescencia.

Para ello se preparó un buffer de lisis para extracción de ADN genómico a partir de cultivos celulares, utilizando Tris-HCl sólido 10 mM y EDTA 0.5 mM pH 8.0.

Se disolvió Tris-HCl en agua miliQ, añadiendo EDTA 0.5 M a pH8. Posteriormente fue incorporado el SDS y se mezcló hasta disolver completamente, se ajustó el pH 8, y fue filtrado mediante una membrana 0.2 μ m. se homogenizo, se alicuitó y fue almacenado a 4 °C.

El pellet celular fue lavado dos veces con PBS. Para ello, se resuspendió inicialmente en PBS y se centrifugó a 2000 rpm (Eppendorf™ Centrifuge 5804 R)

durante 5 minutos, tras lo cual se retiró el sobrenadante. Posteriormente, el pellet se resuspendió en 250 μ L de buffer de lisis, se añadió 1 μ L de RNasa y se incubó a 37 °C durante una hora a 500 rpm. Al término de este tiempo, se incorporó 1 μ L de proteinasa K y se continuó la incubación a 56 °C por 90 minutos, manteniendo la agitación a 500 rpm.

Posteriormente, a la mezcla se le añadió fenol, cloroformo y alcohol isoamílico en una proporción de 25:24:1, respectivamente, y se sometió a vortex durante 2 minutos. La solución fue centrifugada a 13 000 rpm (Eppendorf™ Centrifuge 5804 R) por 10 minutos a 4 °C, y la fase acuosa (superior) se recuperó en un tubo limpio. A esta fracción se le agregaron etanol al 96 %, glucógeno y acetato de amonio, dejándose reaccionar durante 14 horas.

Cumplido este tiempo de incubación, las muestras fueron centrifugadas nuevamente a 13 000 rpm (Eppendorf™ Centrifuge 5804 R) durante 10 minutos a 4 °C. El sobrenadante fue retirado y el pellet se lavó con 300 μ L de etanol al 70 %, seguido de una nueva centrifugación en las mismas condiciones. Este paso se repitió una vez más.

Finalmente, el pellet se dejó semi húmedo y se resuspendió en 35 μ L de buffer pH 8 (1M Tris pH 8, 0.5 M EDTA pH 8). Las muestras fueron almacenadas a –20 °C para posteriores análisis.

6.14 Detección de fragmentación de ADN

El ADN extraído se cuantificó y se sometió a electroforesis en un gel de agarosa al 1.5 % que contenía tinción SYBR-Safe, permitiendo examinar y fotografiar el patrón de fragmentación bajo lámpara de UV (Saadat et al., 2015).

6.15 Detección de apoptosis mediante marcaje con Anexina V

Se indujo apoptosis a células usando cisplatino a 20 μ M. Se preparó un control negativo incubando las células en ausencia de agente inductor de apoptosis y un control positivo con muerte inducida incubando células a 55 °C durante 20 minutos. Se preparó un tampón de unión a anexina V, posterior se preparó una solución de trabajo de yoduro de propidio (PI) de 100 μ g/mL diluido en 5 μ L de la

solución madre de PI de 1 mg/mL en 45 µL de tampón de unión a Anexina V. Tras el periodo de incubación las células fueron recolectadas y lavadas con PBS. Las células fueron resuspendidas en tampón de unión a anexina V 1 x, a una concentración de $\sim 1 \times 10^6$ células/mL. Posteriormente se añadió anexina v y 1 µL de solución de trabajo PI 100 µg/mL a cada suspensión celular de 100 µL, las células fueron incubadas a temperatura ambiente durante 15 minutos a oscuridad, fueron añadidos 400 µL de tampón de unión a anexina 1 x mezclando suavemente, posterior fueron conservadas las muestras en hielo. Las muestras fueron analizadas por citometría de flujo. Las muestras fueron analizadas por microscopia (Saadat et al., 2015).

7 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La evaluación del potencial antiviral de nuevas estrategias terapéuticas frente al virus de la hepatitis B requiere una interpretación integrada de los resultados experimentales, considerando tanto el contexto biológico del virus como las limitaciones inherentes a los modelos *in vitro* empleados. En particular, la persistencia del ADN covalente cerrado circular (ADNccc) en el núcleo de los hepatocitos representa el principal obstáculo para la erradicación de la infección, ya que este reservorio episomal actúa como plantilla transcripcional estable para la síntesis continua de ARNs virales y proteínas, incluso bajo tratamiento antiviral prolongado (Allweiss et al., 2022; Zoulim & Testoni, 2023). Esta característica explica por qué los tratamientos actuales logran suprimir la replicación viral sin eliminar completamente la infección, y ha motivado el desarrollo de estrategias dirigidas al silenciamiento transcripcional o a la desestabilización funcional del ADNc.

En este contexto, la proteína HBx ha sido identificada como un factor clave en la persistencia viral. Se ha demostrado que HBx es indispensable para mantener la actividad transcripcional del ADNccc, al interactuar con proteínas del hospedero involucradas en el control epigenético y la regulación de la cromatina viral (Schollmeier et al., 2023a). Además, HBx modula múltiples procesos celulares, incluyendo la proliferación, la viabilidad y la apoptosis, lo que contribuye tanto a la patogénesis del VHB como a la progresión hacia el daño hepático crónico (Wang et al., 2023). Por ello, la inhibición de la expresión de HBx se ha propuesto como una estrategia terapéutica prometedora para reducir la carga viral y atenuar las alteraciones celulares asociadas a la infección crónica.

Los resultados presentados provienen de un modelo de expresión de HBx en cultivos celulares HepG2, diseñado para evaluar el efecto de la nitazoxanida, en su forma libre y nanoencapsulada, sobre parámetros celulares y moleculares relevantes. Este tipo de aproximación permite aislar el impacto específico de HBx sin la interferencia de otros eventos del ciclo replicativo viral, lo cual constituye una estrategia ampliamente empleada para el análisis mecanístico de proteínas virales

multifuncionales (Che et al., 2022). Si bien este modelo no reproduce una infección completa por VHB, resulta adecuado para estudiar la modulación de la expresión de HBx y sus consecuencias celulares en un entorno hepatocitario controlado.

La nanoencapsulación de fármacos con limitaciones biofarmacéuticas, como la nitazoxanida, ha demostrado mejorar la biodisponibilidad intracelular y potenciar el efecto biológico de compuestos antivirales, particularmente cuando el blanco terapéutico se localiza en compartimentos intracelulares (Sharmin et al., 2021b). En este contexto, la interpretación de los resultados presentados en esta sección se enfoca en establecer la relación entre las características fisicoquímicas del nanosistema, su interacción con el modelo celular y los efectos observados sobre la viabilidad, la apoptosis y la expresión de HBx, delimitando de manera explícita el alcance del modelo experimental empleado.

7.1 Características morfológicas de las nanopartículas poliméricas cargadas con nitazoxanida

La caracterización morfológica por microscopía electrónica de barrido (MEB), permitió confirmar la formación de estructuras definidas e individualizadas, compatibles con sistemas coloidales estables. La observación de partículas con contornos bien delimitados y sin evidencia de colapso estructural o agregación excesiva es indicativa de un nanosistema físicamente consistente, condición indispensable para su aplicación en entornos biológicos. Desde el punto de vista farmacotecnológico, la integridad morfológica evidenciada por MEB respalda la estabilidad del sistema y su idoneidad como vehículo de liberación intracelular (Zielinska Aleksandra et al., 2020).

La caracterización morfológica de las nanopartículas poliméricas es fundamental para evaluar atributos como la forma, uniformidad y características superficiales, los cuales influyen en sus propiedades y desempeño. Esta evaluación permite verificar la calidad estructural de las partículas obtenidas (Mishra et al., 2017; Floyd et al., 2025; Khan et al., 2024; Ridolfo et al., 2021; Vakurov et al., 2012). En el presente estudio, las imágenes obtenidas (Figura 12) resultaron fundamentales

para conocer la morfología de las nanopartículas cargadas con nitazoxanida, aportando evidencia visual sobre su integridad estructural y comportamiento bajo condiciones experimentales controladas.

La morfología de las nanopartículas fue analizada a distintos aumentos, lo que permitió una caracterización progresiva desde la escala macroscópica hasta la nanométrica. En la Figura 12A, obtenida a 100×, se observa una muestra compuesta por agregados con morfología heterogénea, que incluye estructuras de formas irregulares y alargadas con distribución no uniforme. Algunas partículas presentan aspecto fibroso o tubular, mientras que otras exhiben formas más compactas y amorfas. Esta tendencia a la aglomeración puede atribuirse a fuerzas de interacción superficial (Demirezen et al., 2022), lo cual es consistente con el potencial zeta reportado para las nanopartículas cargadas con nitazoxanida de -11.0 ± 3.0 mV (Cortez, 2023). Este valor refleja una carga superficial moderada y una capacidad de repulsión electrostática limitada; dado que para garantizar una estabilidad coloidal adecuada se requieren valores superiores a +20 mV o inferiores a -20 mV, los valores cercanos a cero favorecen la aproximación entre partículas y, en consecuencia, su aglomeración (Demirezen et al., 2022).de nanopartículas.

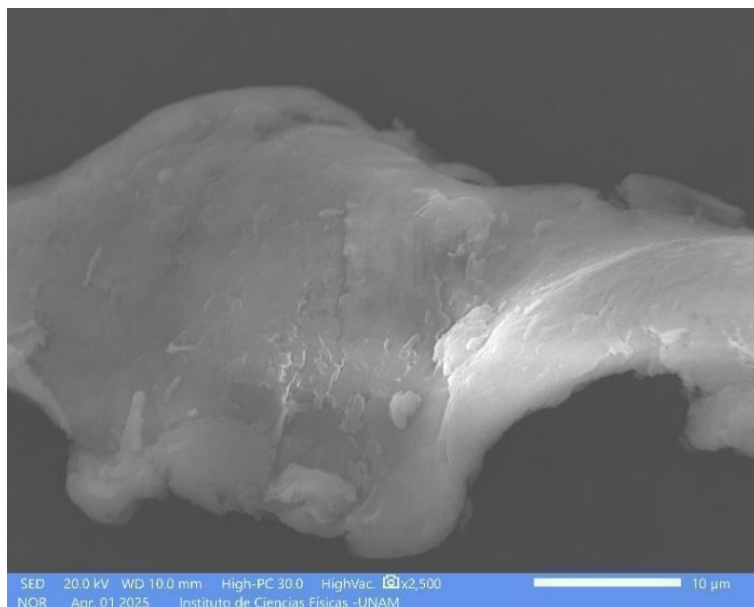
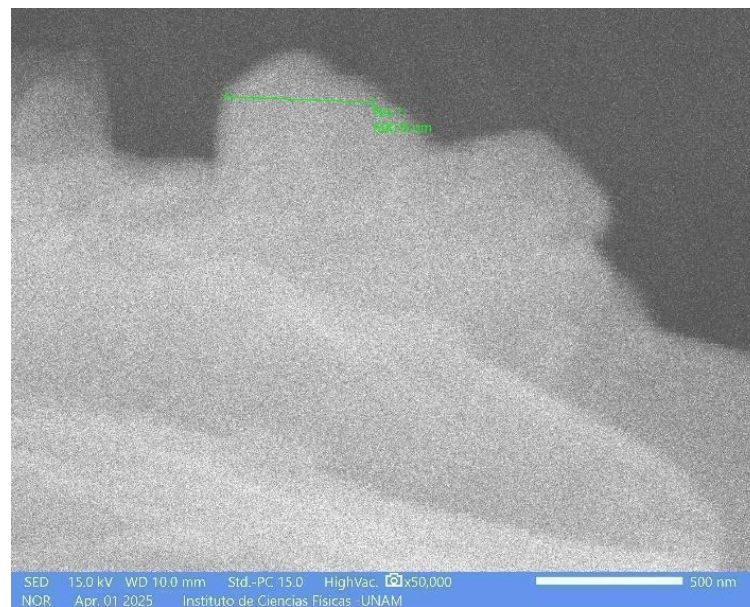
A**B**

Figura 12. Micrografías MEB de las nanopartículas cargadas con nitazoxanida.

A) Detalle de una partícula individual a 2,500 x, mostrando superficie rugosa y compacta. B) Imagen a 50,000 x que revela dominios nanométricos con tamaños aproximados de 500.8 nm, correspondientes a nanopartículas individuales.

En la Figura 12A, correspondiente a un aumento de 2,500×, se aprecia una estructura con morfología irregular y aspecto compacto. La superficie de la partícula presenta una textura rugosa y ondulada, con depresiones y protuberancias características. A mayor resolución, en la Figura 12B obtenida a 50,000×, se revelan con claridad estructuras nanométricas en la superficie del material. Se observa una partícula de aproximadamente 500.8 nm, conforme a la medición directa realizada sobre la micrografía. Estas estructuras corresponden probablemente a nanopartículas individuales o superficialmente aglomeradas, lo que confirma que el sistema contiene componentes dentro del rango nanométrico (Lu et al., 2011).

La morfología de las nanopartículas constituye una propiedad crítica, ya que influye directamente sobre la adhesión celular, el transporte intracelular, el destino subcelular, el tiempo de circulación sistémica, la biodistribución y la toxicidad (Lu et al., 2011; Mishra et al., 2017). Las dimensiones a nanoescala facilitan la captación celular y la capacidad de atravesar barreras biológicas, lo cual es fundamental para la entrega dirigida de fármacos al interior de las células (Ridolfo et al., 2021; Vakurov et al., 2012; Zielinska Filipa et al., 2020).

Si bien el tamaño promedio, el índice de polidispersión (PDI) y el potencial zeta del nanosistema fueron reportados previamente durante su desarrollo (Cortez, 2023), su discusión resulta fundamental para interpretar los efectos biológicos observados en el presente estudio. El tamaño reportado en el rango nanométrico, junto con un PDI bajo, indica una población de nanopartículas relativamente homogénea. Esta homogeneidad constituye un atributo deseable desde el punto de vista farmacológico, ya que reduce la variabilidad en la interacción célula-nanopartícula y favorece una distribución intracelular más uniforme del fármaco encapsulado (Gagliardi et al., 2021b; Zielinska Aleksandra et al., 2020).

Se ha descrito que nanopartículas poliméricas en el rango aproximado de 100 a 500 nm pueden ser internalizadas eficientemente mediante mecanismos endocíticos, incluyendo endocitosis mediada por clatrina, caveolina y

macropinocitosis, dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del nanosistema y del tipo celular (Nelemans & Gurevich, 2020). En líneas celulares hepáticas como HepG2, estos mecanismos favorecen la acumulación intracelular del principio activo, aspecto crucial para fármacos cuyo blanco terapéutico se localiza dentro de la célula.

Esta relación entre tamaño, captación celular y efecto biológico adquiere especial relevancia en el contexto de la nitazoxanida, un fármaco caracterizado por baja solubilidad acuosa que limita su biodisponibilidad cuando se administra en forma libre. La nanoencapsulación en un sistema polimérico mejora su dispersión en medios biológicos, protege al fármaco de la degradación y favorece su transporte a través de la membrana celular, incrementando así la concentración intracelular efectiva del principio activo, condición necesaria para que ejerza efectos biológicos significativos sobre blancos intracelulares (Delshadi et al., 2021b).

Desde una perspectiva antiviral, estas características estructurales y fisicoquímicas explican la idoneidad de las nanopartículas poliméricas cargadas con nitazoxanida para ejercer un efecto antiviral intracelular. La replicación viral y la actividad de proteínas reguladoras como HBx dependen de procesos que ocurren en compartimentos citoplasmáticos y nucleares. Por ello, los sistemas de liberación basados en nanopartículas poliméricas han sido ampliamente propuestos como plataformas eficaces para el transporte intracelular de agentes antivirales, al permitir una liberación controlada del fármaco en el sitio de acción y reducir los efectos inespecíficos asociados a concentraciones extracelulares elevadas (Cojocar et al., 2020; Delshadi et al., 2021c). Adicionalmente, la homogeneidad del nanosistema contribuye a minimizar respuestas citotóxicas no deseadas, al evitar la presencia de fracciones de tamaño extremo que podrían inducir estrés celular independiente del fármaco encapsulado. Este aspecto es particularmente importante en estudios antivirales, donde resulta indispensable diferenciar entre un efecto antiviral genuino y una disminución de la viabilidad celular asociada a la toxicidad del sistema de liberación.

7.2. Marcaje de nanopartículas con FITC.

Para permitir la visualización de las nanopartículas cargadas con nitazoxanida mediante microscopía de epifluorescencia, fue necesario modificar su superficie. Las nanopartículas formuladas están compuestas principalmente de policaprolactona (PCL), un polímero hidrofóbico que carece de grupos funcionales reactivos necesarios para la conjugación directa con fluoróforos como el isotiocianato de fluoresceína (FITC), el cual presenta un espectro de excitación entre 490 y 495 nm y emite a aproximadamente 519 nm. El uso de FITC para marcar nanopartículas poliméricas, y en particular sistemas basados en quitosano, está ampliamente documentado en aplicaciones biomédicas; su empleo recurrente para obtener nanotransportadores fluorescentes destinados al rastreo celular y al estudio de distribución intracelular ha sido descrito en matrices poliméricas derivatizadas con grupos amino susceptibles a la conjugación (Caprificio et al., 2021). Debido a esta limitante, las nanopartículas fueron recubiertas con quitosano, un polímero natural que posee grupos amino libres en su estructura y que permite la conjugación eficiente con FITC (Figura 13), facilitando así el marcaje fluorescente necesario para su rastreo en cultivos celulares (Caprificio et al., 2021, 2024).

Este marcaje resultó esencial para determinar si las nanopartículas formuladas eran capaces de interactuar con las células blanco y, más importante aún, si podían internalizarse. Esta información es crucial para validar su potencial como sistema de liberación dirigido, ya que la eficacia terapéutica de las nanopartículas depende en gran medida de su capacidad para atravesar la membrana celular y liberar el principio activo en el interior del citoplasma. De este modo, el análisis cualitativo mediante microscopía de epifluorescencia proporciona una primera aproximación al comportamiento celular y la bioactividad del nanosistema.

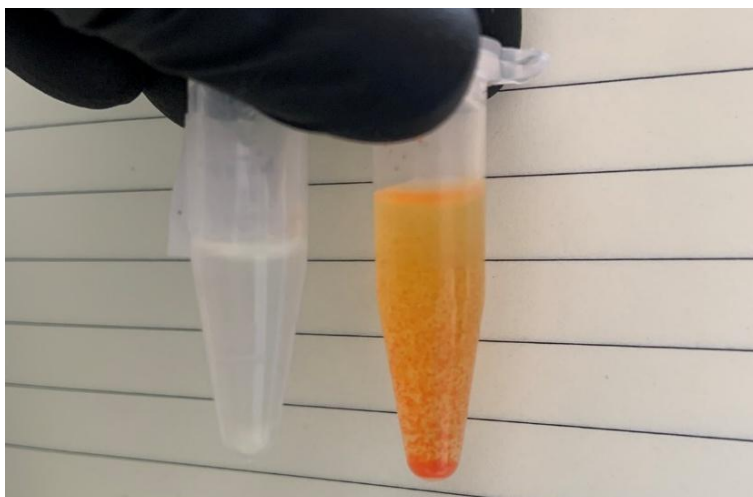


Figura 13. Nanopartículas poliméricas sin marcaje y con marcaje con FITC

Las nanopartículas marcadas con FITC y sin marcar fueron expuestas a una concentración de 5 mg/mL en células HepG2. La Figura 14 presenta imágenes obtenidas mediante microscopía óptica de campo claro y epifluorescencia: en la fila superior se observa la superposición de ambos canales, donde las nanopartículas fluorescentes marcadas con FITC (señal verde) aparecen asociadas a la superficie celular, lo que sugiere interacción con la membrana. En la fila inferior, correspondiente al control negativo, la superposición de los canales de fluorescencia y campo claro no muestra señal detectable, lo que confirma la ausencia de autofluorescencia o marcaje inespecífico en células sin tratamiento.

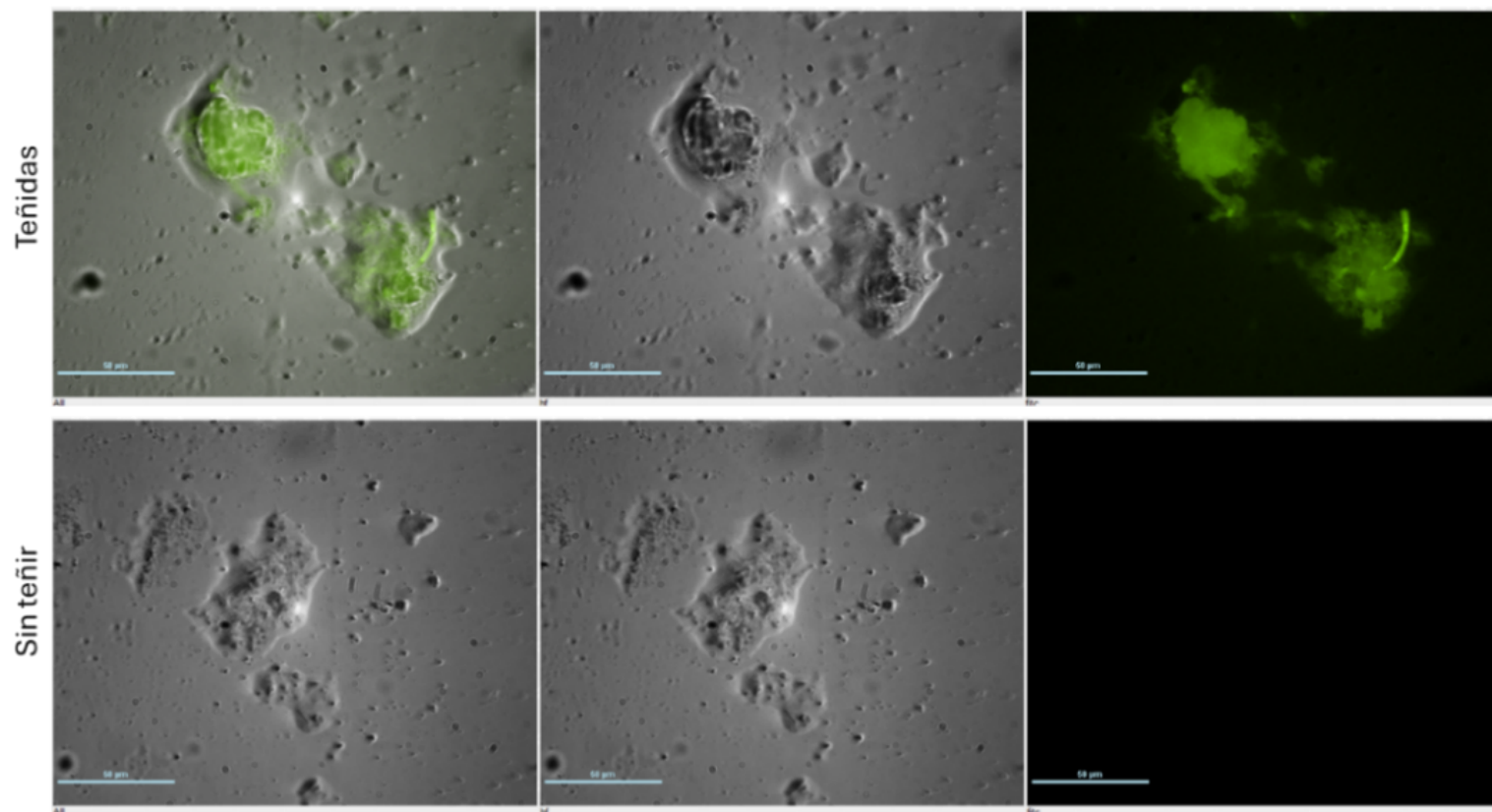


Figura 14. Micrografías de nanopartículas cargadas con nitazoxanida marcadas con FITC obtenidas mediante microscopía de epifluorescencia.

Las Figuras 15, 16 y 17 muestran micrografías de campo claro a 10× y 40× correspondientes a cultivos celulares tratados con nanopartículas poliméricas cargadas con nitazoxanida sin marcaje (Figura 15), marcadas con FITC (Figura 16) y células control sin tratamiento (Figura 17), evaluadas a 24 y 72 horas de exposición.

En las células tratadas con nanopartículas sin marcar (Figura 15), a las 24 y 72 horas se observa una organización en pequeños grupos celulares con integridad estructural aparente y sin evidencia marcada de lisis celular. A 40× se aprecian detalles morfológicos bien definidos, con citoplasmas ligeramente granulares y contornos celulares conservados. A las 72 horas se observa una leve disminución en la densidad celular y cambios en la organización de la monocapa, lo cual podría indicar una interacción progresiva de las nanopartículas con las células.

12 h

72 h

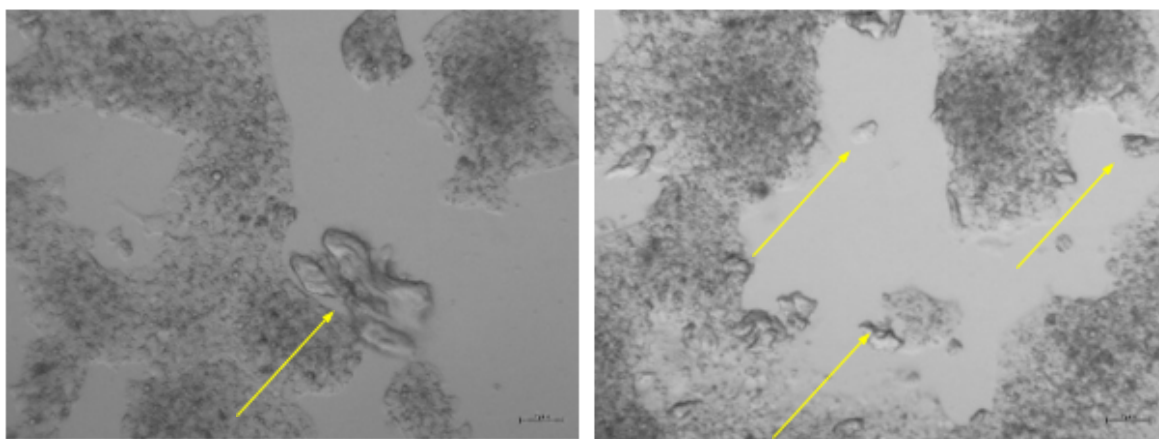


Figura 15. Micrografía de campo claro a 10 x de nanopartículas sin marcar.

Las células expuestas a las nanopartículas marcadas con FITC (Figura 16) presentan una morfología general comparable a la observada en el grupo anterior;

sin embargo, se perciben áreas con mayor densidad intracelular granular, posiblemente asociadas a la internalización o acumulación de las nanopartículas fluorescentes. A las 72 horas se observa una monocapa ligeramente menos definida y una mayor agrupación celular, lo cual podría estar relacionado con la interacción progresiva del nanosistema con el cultivo.

Las células control (Figura 17) presentan una monocapa uniforme con alta confluencia, bordes celulares bien delimitados y morfología típica de células epiteliales. A 40× se observan núcleos definidos y un citoplasma homogéneo, sin evidencia de alteraciones estructurales. Esta condición representa el patrón morfológico de referencia para comparar los posibles efectos inducidos por las nanopartículas.

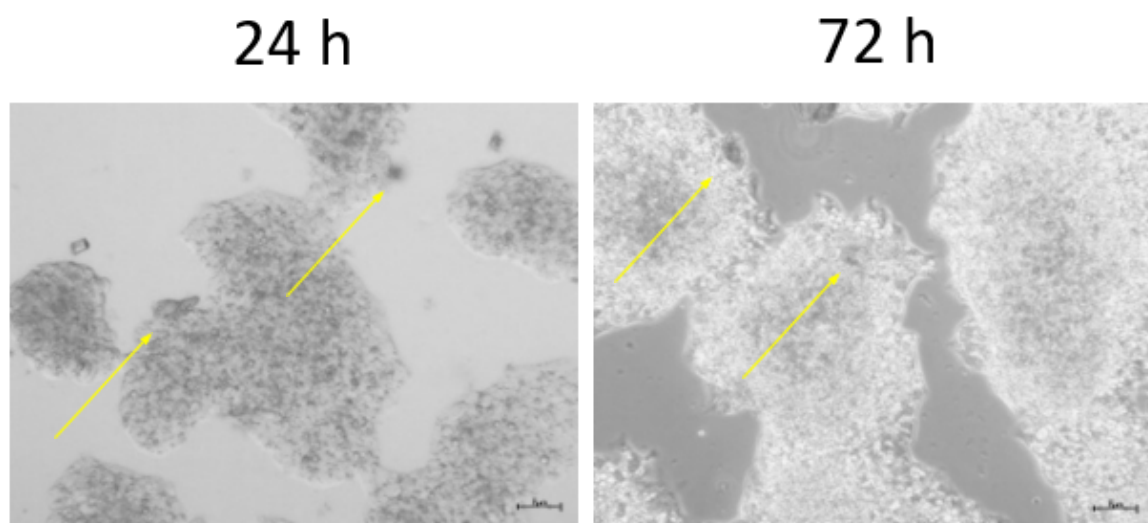


Figura 16. Micrografía de campo claro a 10 x de nanopartículas marcadas con FITC.

La interacción de las nanopartículas con la membrana celular desempeña un papel crucial en la endocitosis y el tráfico intracelular, y depende de múltiples factores, entre ellos el tamaño de las partículas, su forma, carga superficial, lipofilicidad, naturaleza del nanotransportador y el tipo celular involucrado en la internalización (Mazumdar et al., 2021). En células HepG2, la internalización de nanopartículas puede ocurrir a través de diversas vías endocíticas, y los

mecanismos exactos varían en función de las propiedades fisicoquímicas del nanosistema, particularmente el tamaño y la morfología (Mazumdar et al., 2021).

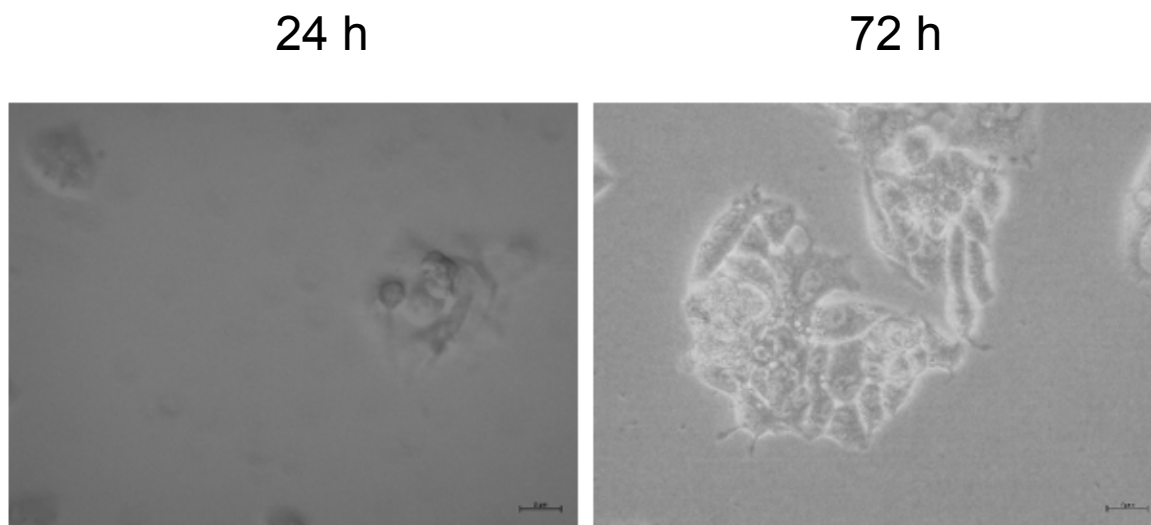


Figura 17. Micrografías de campo claro a 10 x y 40 x de células HepG2, grupo control sin tratamiento.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante microscopía de campo claro y epifluorescencia sugieren que las nanopartículas poliméricas cargadas con nitazoxanida son capaces de interactuar con células HepG2 y de ser internalizadas de manera progresiva, sin inducir alteraciones morfológicas drásticas a las concentraciones evaluadas. La señal fluorescente asociada a las células tratadas con nanopartículas-FITC, en contraste con la ausencia de señal en el control negativo, respalda la especificidad del marcaje y confirma la utilidad del sistema de funcionalización con quitosano como estrategia para el rastreo intracelular. Estos hallazgos son consistentes con lo descrito para nanotransportadores poliméricos de tamaño similar, en los que la internalización mediada por endocitosis constituye la principal ruta de entrada en hepatocitos y líneas celulares hepáticas (Nelemans & Gurevich, 2020; Mazumdar et al., 2021). Desde una perspectiva traslacional, la capacidad de las nanopartículas para

acceder al compartimento intracelular es un requisito indispensable para que la nitazoxanida ejerza su actividad sobre blancos moleculares localizados en el citoplasma y el núcleo, como es el caso de la proteína HBx en el contexto de la infección por virus de la hepatitis B.

7.3 Obtención del plásmido pcDNA3.1Flag HBx

La obtención de ADN plasmídico de alta calidad constituye un paso fundamental para los estudios de expresión génica en células de mamífero, ya que la pureza, integridad estructural y conformación topológica del plásmido influyen directamente en la eficiencia de transfección y en los niveles de expresión del gen de interés. Se ha reportado que la presencia de contaminantes derivados del proceso de purificación, así como una baja proporción de ADN plasmídico en conformación superenrollada, pueden comprometer la transferencia génica y afectar la reproducibilidad experimental (Nguyen,2024).

Para establecer un modelo celular de expresión de HBx asociado al VHB, se adquirió el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx de la plataforma Addgene (número de catálogo #42596). Este plásmido contiene el gen que codifica para la proteína X del VHB bajo el control de un promotor que permite su expresión en células de mamífero, así como un gen de resistencia a ampicilina que facilita su selección y propagación en bacterias. Se ha descrito que la proteína HBx incrementa los niveles de calcio citosólico mediante la modulación del poro de transición de permeabilidad mitocondrial; esta señalización mediada por Ca^{2+} facilita el ensamblaje del núcleo viral y la producción de ARN pregenómico (pgARN), ambos procesos indispensables para la replicación del virus (Li et al., 2024a). La transfección de células HepG2 con pcDNA3.1-Flag HBx permite inducir la expresión ectópica de HBx y reproducir sus efectos sobre la viabilidad celular y la homeostasis del calcio citosólico en un entorno controlado (Geng et al., 2012a), lo que constituye la base del modelo experimental empleado en el presente estudio.

El plásmido pcDNA3.1-Flag HBx fue amplificado y seleccionado en cultivos de *E. coli* DH5 α mediante resistencia a ampicilina. Las bacterias transformadas se

cultivaron inicialmente en medio sólido LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$), donde se observaron colonias positivas que confirmaron la presencia del plásmido en las células transformadas (Figura 18). Las colonias seleccionadas fueron inoculadas posteriormente en medio LB líquido con la misma concentración de ampicilina y se incubaron a 37 °C durante 13 horas. Tras este crecimiento, el plásmido fue purificado utilizando el kit GeneJET (Thermo Scientific), obteniéndose cinco clonas de 50 μL de solución plasmídica. Las concentraciones de ADN obtenidas para cada clona se presentan en la Tabla 5.

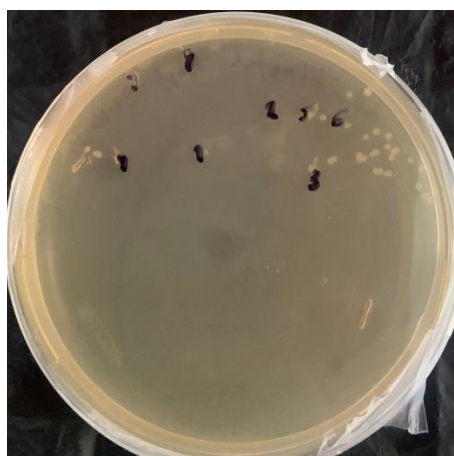


Figura 18. Transformación de Bacterias *E. coli* DH5 α con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx.

Tabla 5. Concentraciones de plásmido pcDNA3.1-Flag HBx purificado por columna (miniprep kit Thermo Scientific™).

No. De clona	[ng/ μL]
1	296
2	483
3	373
4	432.6
5	54.9

La purificación del plásmido constituye un paso crítico dentro del diseño experimental, dado que este vector representa la base molecular para la expresión intracelular de HBx. El plásmido pcDNA3.1 es un vector de expresión ampliamente utilizado en sistemas eucariotas, diseñado para dirigir una expresión eficiente del gen de interés bajo el control de promotores fuertes, lo que lo hace especialmente adecuado para estudios funcionales en líneas celulares humanas como HepG2. La calidad del ADN plasmídico purificado impacta directamente sobre la eficiencia de transfección, los niveles de expresión proteica y la viabilidad celular posterior al proceso de introducción del material genético. Se ha documentado que preparaciones con impurezas proteicas, restos de ARN o endotoxinas bacterianas pueden reducir significativamente la eficiencia de transfección e inducir respuestas celulares inespecíficas que comprometen la interpretación de los resultados (La Vega et al., 2013). Estudios recientes confirman que preparaciones plasmídicas obtenidas mediante métodos comerciales estandarizados cumplen con los criterios mínimos requeridos para aplicaciones en biología celular (Cheng et al., 2025; Kachkin et al., 2020).

La evaluación de la integridad estructural del plásmido mediante electroforesis en gel de agarosa permitió confirmar la presencia predominante de la conformación superenrollada, característica de preparaciones plasmídicas íntegras y funcionales. Esta conformación es particularmente importante, ya que el ADN plasmídico superenrollado presenta mayor eficiencia de transfección en comparación con las formas lineales o relajadas, además de una mayor estabilidad intracelular tras su introducción en las células (Chancham & Hughes, 2001).

Para verificar la identidad del plásmido y confirmar la integridad del inserto, se diseñaron tres cebadores específicos dirigidos a amplificar un fragmento de 120 pb correspondiente al gen HBx (Figura 19). Estos cebadores fueron diseñados además para monitorear la expresión del gen HBx en células transfectadas con pcDNA3.1-Flag HBx, lo que permite no solo autenticar el plásmido previo a su uso,

sino también evaluar de manera confiable la expresión génica en los experimentos funcionales y verificar que el gen HBx sea transcrito de forma efectiva en los cultivos celulares.

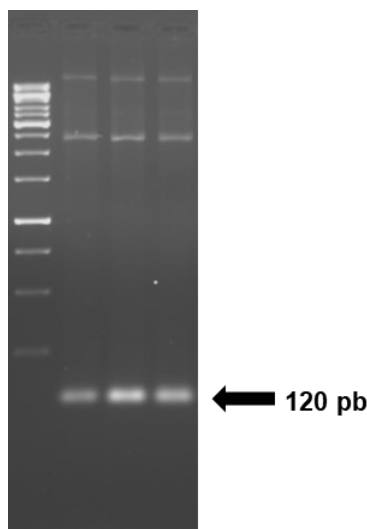


Figura 19. Purificación del plásmido pcDNA3.1-Flag HBx.

En conjunto, la obtención de ADN plasmídico puro, íntegro y con concentración adecuada constituyó un requisito indispensable para lograr transfecciones reproducibles y una expresión eficiente de HBx en células HepG2. La cantidad y calidad del plásmido purificado permitieron establecer un sistema experimental confiable, en el cual los efectos observados sobre la viabilidad celular, la apoptosis y la expresión proteica pueden atribuirse con mayor certeza al impacto biológico de HBx, minimizando la interferencia de variables técnicas asociadas a la preparación del material genético.

7.4 Crecimiento, viabilidad y morfología de células HepG2

Las células HepG2 son una línea derivada de hepatoblastoma humano que se comporta de manera similar a los hepatocitos fetales y expresa muchas de las funciones atribuidas a los hepatocitos humanos normales, lo que la convierte en un modelo ampliamente utilizado para estudios de biología hepática y evaluación de compuestos farmacológicos (Aguillón-Osma et al., 2019).

Se generó un banco maestro de 15 viales a partir de la línea celular HepG2 (ATCC HB-8065), siguiendo el protocolo estándar de descongelación, subcultivo y criopreservación. Cada vial contiene un volumen de 2 mL con una concentración de 1×10^6 células/mL. Las células, correspondientes al pase 8, presentaron una viabilidad del 98 % al momento del procesamiento. Los viales se almacenan en un tanque de nitrógeno líquido a -196°C para garantizar su conservación a largo plazo. -196°C para garantizar su conservación a largo plazo.

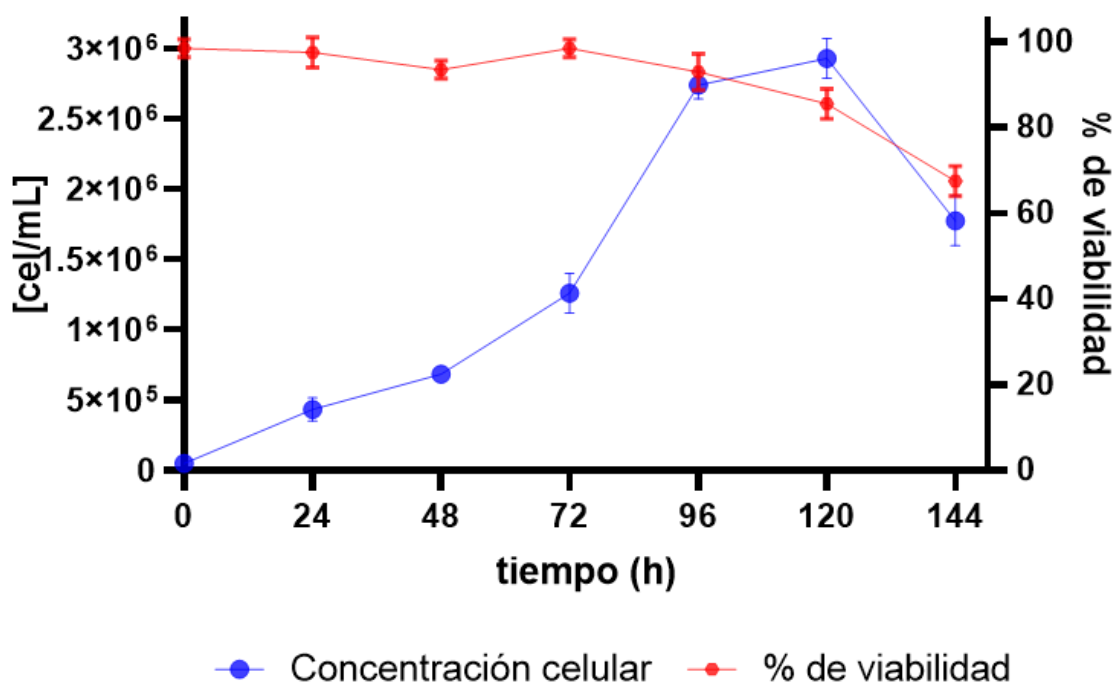


Figura 20. Crecimiento y viabilidad de células HepG2 en función del tiempo.

La cinética de crecimiento celular fue evaluada mediante el seguimiento de la concentración celular y el porcentaje de viabilidad a lo largo del tiempo (Figura 20). Los datos, expresados como media $\pm$ error estándar de $n=3$, muestran que la concentración celular (línea azul) aumenta de manera exponencial entre las 72 y 120 horas de cultivo, seguida de una fase estacionaria y un descenso progresivo hacia las 144 horas. El porcentaje de viabilidad (línea roja) se mantiene cercano al

100 % hasta las 72 horas, lo que indica que las condiciones de cultivo empleadas fueron adecuadas para sostener un crecimiento activo de las células HepG2 (Tsuji et al., 2021). La velocidad específica de crecimiento (μ) calculada fue de 0.214 h^{-1} , con un tiempo de duplicación de 34 horas, valor comparable al reportado por otros autores para esta línea, aunque ligeramente inferior al tiempo de duplicación de 48 horas descrito por Kalikias y colaboradores (2016) bajo condiciones de cultivo similares.

La fase logarítmica de crecimiento observada coincide con lo reportado por Tsuji y colaboradores (2021), quienes describieron una expansión activa de células HepG2 entre las 72 y 120 horas de cultivo, con disminución gradual de la velocidad de crecimiento después de las 120 horas y entrada en fase estacionaria aproximadamente a las 192 horas. Este comportamiento es consistente con la cinética típica de un cultivo sano, caracterizada por una fase de adaptación posterior a la siembra en la que ocurre la reorganización y el anclaje celular, seguida de una fase exponencial de proliferación sostenida y una fase de estabilidad al aproximarse a la confluencia máxima. Este patrón es relevante porque el estado proliferativo y la densidad celular influyen sobre las propiedades funcionales de HepG2 y, por ende, en su respuesta a estímulos farmacológicos y experimentales (Arzumanian et al., 2021; Tanaka-Yachi et al., 2022). De hecho, se ha demostrado que la densidad celular modifica características funcionales de esta línea, lo que subraya la necesidad de estandarizar la confluencia y las condiciones basales para garantizar la comparabilidad entre tratamientos (Tanaka-Yachi et al., 2022).

En cuanto a la viabilidad, mantener porcentajes elevados, comúnmente aceptados como indicadores de cultivos sanos aptos para ensayos de intervención, es esencial para interpretar los cambios observados como efectos reales del tratamiento o del blanco molecular, y no como consecuencia de un cultivo comprometido. Asimismo, el control de calidad del cultivo es un componente reconocido como determinante para que las mediciones de viabilidad y

metabolismo sean reproducibles e interpretables (Roth et al., 2020; Weiskirchen et al., 2023).

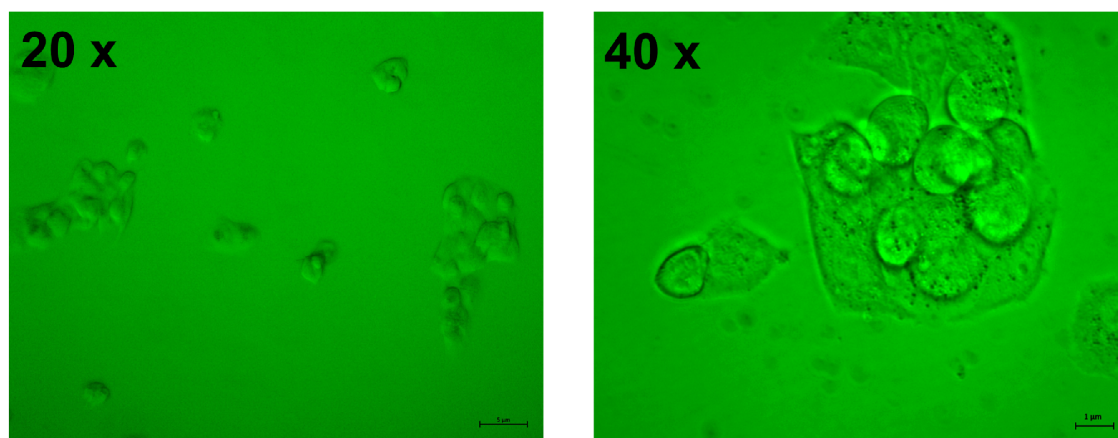


Figura 21. Morfología de células HepG2.

La morfología celular fue evaluada mediante microscopía de campo claro con contraste de fases (Figura 21). Las células HepG2 presentan una forma poligonal o fusiforme, con núcleos grandes, centrales y esféricos; en algunos casos se observa multinucleación, característica frecuente en líneas de origen tumoral, donde puede registrarse hasta siete núcleos por célula (Arzumanian et al., 2021). Las células crecen en monocapa y forman grupos o islas celulares característicos (Donato et al., 2015). El citoplasma es homogéneo y moderadamente refringente, con límites celulares bien definidos y un tamaño aproximado de 20 µm.

El patrón morfológico observado en las micrografías es consistente con el fenotipo descrito para esta línea hepatocitaria bajo condiciones estándar de cultivo (Arzumanian et al., 2021). La adhesión y extensión celular se mantuvieron uniformes, sin cambios abruptos en tamaño ni pérdida del patrón de monocapa, lo cual constituye un indicador indirecto de integridad citoplasmática y homeostasis basal. Asimismo, no se identificaron hallazgos morfológicos compatibles con estrés o deterioro celular, tales como vacuolización marcada, desprendimiento generalizado, redondeo masivo, presencia excesiva de detritos o signos

sugestivos de contaminación microbiana. La ausencia de estos indicadores es particularmente relevante, dado que la contaminación, especialmente por *Mycoplasma*, puede generar alteraciones en el crecimiento, la viabilidad y los perfiles de expresión génica, comprometiendo la reproducibilidad de los resultados experimentales (Dayanidhi et al., 2023; Roth et al., 2020; Weiskirchen et al., 2023).

Por tanto, la caracterización de la línea celular HepG2 confirma que las células empleadas en este estudio presentaban condiciones basales óptimas: viabilidad elevada, cinética de crecimiento reproducible y morfología íntegra sin evidencia de deterioro. Estos atributos son requisitos indispensables para garantizar que los efectos observados en los experimentos de transfección y tratamiento farmacológico sean atribuibles a las intervenciones experimentales, es decir, la expresión de HBx y la acción de la nitazoxanida libre o nanoencapsulada, y no a variables confusoras derivadas del estado basal del cultivo.

7.5 Respuesta celular a la nitazoxanida y nanopartículas cargadas con nitazoxanida.

Viabilidad celular en el modelo HEK293-rAd5

Previo al establecimiento del modelo de expresión de HBx en células HepG2, se empleó un modelo de infección viral heterólogo basado en células HEK293 y adenovirus recombinante tipo 5 (rAd5) como sistema de evaluación preliminar de la actividad antiviral de la nitazoxanida en sus formas libre y nanoencapsulada. Este abordaje permitió validar la funcionalidad del nanosistema en un contexto de infección viral activa antes de avanzar hacia el modelo específico de VHB, proporcionando evidencia inicial sobre la capacidad del sistema de liberación para potenciar el efecto biológico del fármaco encapsulado. Si bien el rAd5 no es el agente etiológico objeto de estudio, su uso como modelo de infección viral *in vitro* está ampliamente justificado para la evaluación de antivirales de amplio espectro en etapas exploratorias, dado que permite cuantificar con precisión el efecto citopático viral y la recuperación celular inducida por el tratamiento (Bharti et al., 2021; Rossignol, 2014).

La evaluación cualitativa mediante tinción con cristal violeta (Figura 23A) mostró que los cultivos infectados con rAd5 sin tratamiento presentaron una pérdida marcada de la monocapa celular, compatible con el efecto citopático característico del adenovirus. En los cultivos tratados con nitazoxanida libre y tizoxanida se observó una recuperación parcial de la monocapa, lo que sugiere una actividad antiviral moderada frente al rAd5. De manera notable, el tratamiento con nanopartículas cargadas con nitazoxanida (Nano+Nita) produjo una coloración más intensa y homogénea en comparación con las formas libres del fármaco, lo que indica una mayor preservación de la integridad celular y una posible mejora en la eficacia antiviral atribuible a la formulación nanoparticulada.

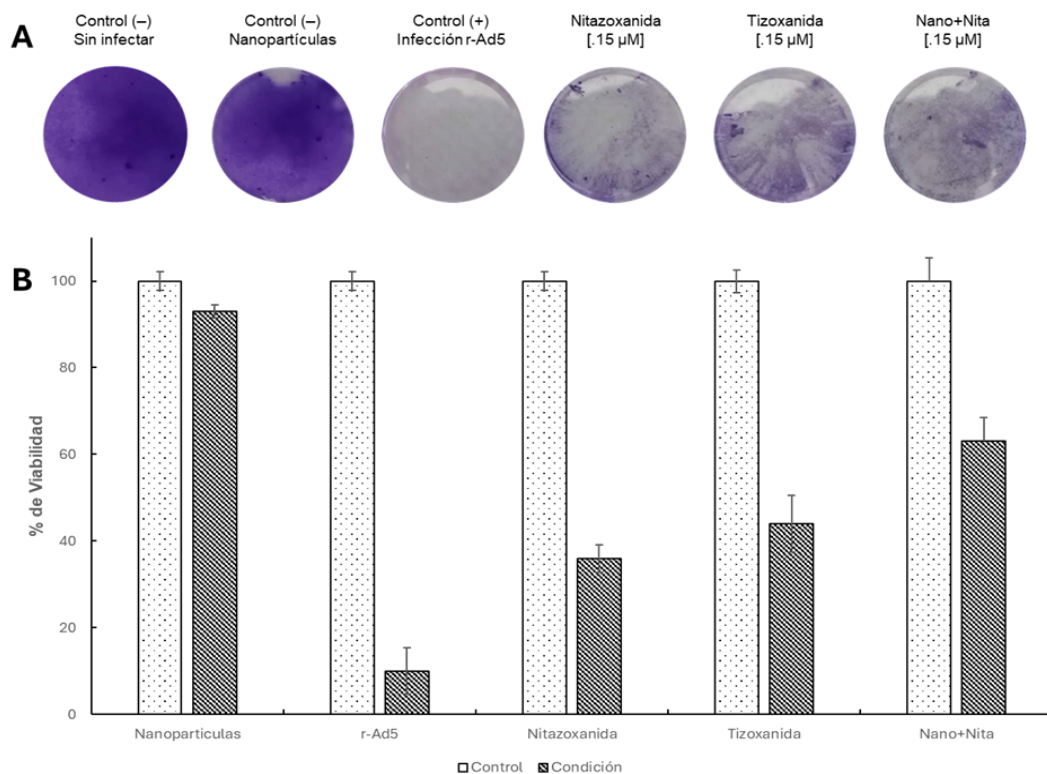


Figura 22. Ensayo antiviral rAd5.

A) Tinción de cristal violeta de cultivos de células HEK293 infectados con rAd5. Controles (-) sin infectar, control de infección y cultivos infectados + Nitazoxanida, Tizoxanida y nanopartículas de nitazoxanida. **B)** % de viabilidad del ensayo antiviral en cultivos de células HEK293 infectados con

r-Ad5. Las barras de error corresponden la desviación estándar de la media de 3 réplicas biológicas con 3 muestras técnicas cada una.

Los resultados de viabilidad celular (Figura 23B) respaldan las observaciones cualitativas descritas previamente. Las células control no infectadas y las tratadas con nanopartículas sin carga exhibieron porcentajes de viabilidad superiores al 95 %, confirmando la biocompatibilidad del nanosistema empleado. La infección con rAd5 resultó en una marcada disminución de la viabilidad celular (menor al 15 %), reflejo de la lisis celular masiva inducida por el virus. Bajo tratamiento con nitazoxanida libre se observó una recuperación parcial de aproximadamente el 35 %, y con tizoxanida de aproximadamente el 45 %, lo que indica una actividad antiviral moderada en ambos casos. Sin embargo, la formulación nanoparticulada cargada con nitazoxanida logró restaurar la viabilidad celular hasta aproximadamente un 65 %, lo que representa una mejora significativa respecto a los compuestos libres y evidencia el valor añadido de la nanoencapsulación para potenciar la biodisponibilidad intracelular del fármaco.

La actividad antiviral observada es consistente con el perfil farmacológico de la nitazoxanida como agente antiviral de amplio espectro (Rossignol, 2014). Se ha documentado que la nitazoxanida y su metabolito activo, la tizoxanida, inhiben la replicación de un amplio rango de virus de ARN y ADN mediante mecanismos que, en su mayoría, no dependen directamente de proteínas virales específicas, sino de procesos regulados por el hospedero que son aprovechados por distintos virus durante su ciclo replicativo (Bharti et al., 2021; Romero-Cabello et al., 2021b; Rossignol, 2014). Entre los mecanismos descritos se encuentra el bloqueo de la maduración de glicoproteínas virales en etapas postraduccionales, como la hemaglutinina del virus de la influenza y la proteína espiga de los coronavirus, así como la activación de respuestas inmunes innatas del hospedero que limitan la replicación viral de manera indirecta (Piacentini et al., 2023; Rossignol, 2014). Esta dependencia de blancos del hospedero, más que de proteínas virales altamente

específicas, explica en parte la actividad de la nitazoxanida frente a virus estructuralmente diversos, incluyendo adenovirus, y fundamenta su evaluación frente al VHB en el modelo de expresión de HBx.

Los resultados obtenidos en el modelo HEK293-rAd5 constituyen una evidencia preliminar relevante: confirman que el nanosistema es biocompatible, que la nanoencapsulación mejora el efecto antiviral de la nitazoxanida respecto a su forma libre, y que el fármaco conserva su actividad biológica tras el proceso de formulación. Estos hallazgos justifican el avance hacia el modelo de mayor especificidad representado por las células HepG2 transfectadas con pcDNA3.1-Flag HBx, en el que se evalúa el impacto de la nitazoxanida libre y nanoencapsulada sobre la expresión de la proteína HBx y los parámetros celulares asociados a la infección crónica por virus de la hepatitis B.

Viabilidad celular en el modelo de expresión de HBx

El análisis de viabilidad celular en el modelo de expresión de HBx reveló un patrón de respuesta diferencial entre los grupos experimentales (Figura 24). El grupo control, correspondiente a células sin transfección ni tratamiento, presentó una viabilidad cercana al 100 %, estableciendo la línea base del sistema. En contraste, la transfección con HBx sin tratamiento provocó una reducción drástica de la viabilidad celular hasta el 35 %, evidenciando la citotoxicidad inducida por la expresión ectópica de esta proteína viral, consistente con los efectos previamente descritos de HBx sobre la homeostasis celular, la modulación de calcio citosólico y la inducción de apoptosis (Geng et al., 2012a; Wang et al., 2023).

El tratamiento con nanopartículas sin carga (Trans+Nano/SC) no mostró un efecto significativo sobre la viabilidad, manteniéndose en niveles similares a los del grupo transfectado sin tratamiento. Este resultado confirma que el sistema nanoparticulado por sí mismo no revierte el daño inducido por HBx y respalda la biocompatibilidad del nanosistema, en concordancia con los resultados obtenidos

previamente en el modelo HEK293-rAd5, donde las nanopartículas sin carga no afectaron la viabilidad celular (sección 7.5).

El tratamiento con nanopartículas cargadas con nitazoxanida resultó en una recuperación notable de la viabilidad celular de manera dependiente de la concentración. A una concentración de 1.5 μM se observó una recuperación parcial del 66 %, mientras que a 0.75 μM la viabilidad aumentó de forma más marcada hasta el 80 %, alcanzando niveles cercanos al grupo control. Este comportamiento sugiere una relación inversamente dependiente de la dosis, en la que la concentración más baja de nitazoxanida vehiculizada resultó más eficaz para restaurar la viabilidad celular. Este fenómeno podría estar relacionado con efectos citostáticos o sobre rutas de señalización celular que se manifiestan de manera distinta según la concentración del fármaco, y merece ser explorado en estudios de seguimiento con un rango de concentraciones más amplio.

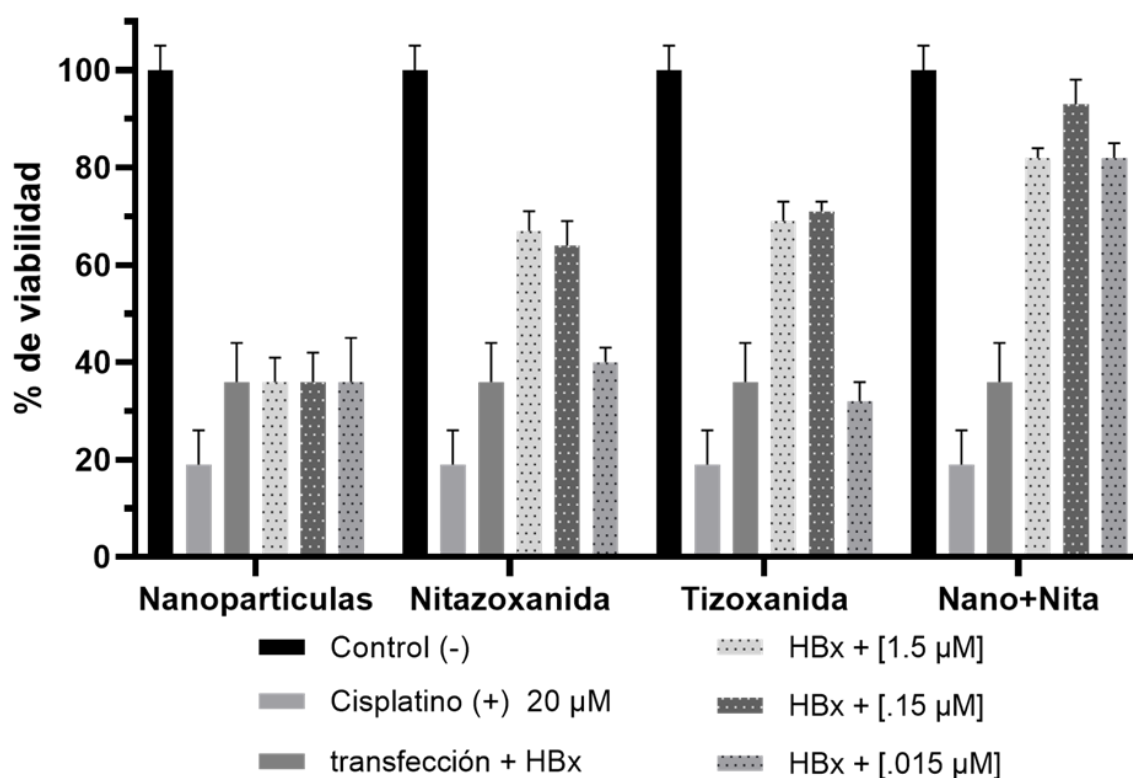


Figura 24. Modelo de expresión de la proteína HBx del virus de Hepatitis B en células HepG2.

Porcentaje de viabilidad determinado por MTS de cultivos transfectados con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx y tratados con nanopartículas sin compuesto, nitazoxanida, tizoxanida y nanopartículas cargadas con nitazoxanida a las siguientes concentraciones: 1.5 μ M, 0.15 μ M y 0.015 μ M. Control negativo de muerte: Células sin tratamiento, Control positivo de muerte: Cisplatino 20 μ M. Los cultivos fueron evaluados a las 96 h post transfección.

A nivel molecular, la disminución observada en la expresión de HBx en células HepG2 tras el tratamiento con nanopartículas cargadas con nitazoxanida y con nitazoxanida en su forma libre sugiere una posible interferencia en la interacción entre HBx y la proteína celular DDB1 (Figura X). Esta interacción es esencial para que HBx promueva la degradación del complejo SMC5/6, un restrictor natural de la transcripción del ADNccc viral. Se ha reportado que la nitazoxanida puede inhibir esta interacción, restaurando los niveles de SMC5/6 y reduciendo así la transcripción del ADNccc, con la consecuente disminución en la producción de ARNs y proteínas virales asociadas al VHB (Sekiba et al., 2019b). Desde el punto de vista funcional, la reducción de HBx sugiere que los tratamientos interfieren en el mantenimiento del estado transcripcional activo del ADNccc, lo que puede traducirse en menor producción de ARN pregenómico, menor síntesis de antígenos virales y atenuación de la propagación del virus.

Estos hallazgos son consistentes con lo demostrado por Sekiba y colaboradores (2019), quienes reportaron que la nitazoxanida inhibe la interacción HBx-DDB1 y restaura la proteína SMC5/6, suprimiendo la transcripción desde el ADNccc tanto en células HepG2 como en hepatocitos primarios infectados con VHB, sin causar toxicidad significativa en rangos de concentración terapéuticos (Sekiba et al., 2019b). De manera complementaria, Korba y colaboradores (2008) demostraron que la nitazoxanida y la tizoxanida inhiben la replicación del VHB y del VHC en modelos celulares, afectando proteínas virales clave y la replicación en general (Korba et al., 2008). Revisiones recientes destacan que, si bien la nitazoxanida posee un espectro antiviral amplio, su relevancia frente al VHB radica principalmente en su capacidad de interferir en la interacción de HBx con factores

celulares del hospedero, mecanismo que la distingue de los antivirales convencionales dirigidos a la polimerasa viral (Zhuang et al., 2023).

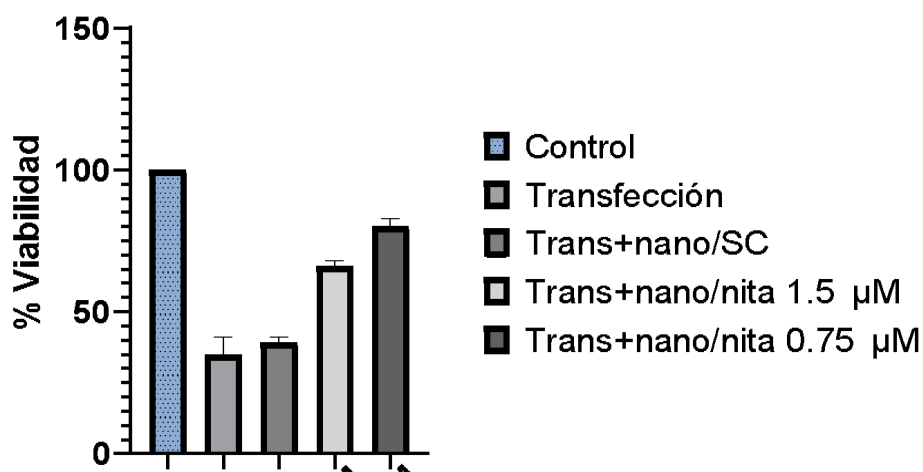


Figura 25. Porcentaje de viabilidad celular en cultivos HepG2 transfectados con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx y tratados con nanopartículas cargadas con nitazoxanida.

La forma nanoparticulada de la nitazoxanida ofrece ventajas adicionales respecto a la forma libre en este contexto. La encapsulación en el sistema polimérico mejora la estabilidad fisicoquímica del fármaco en medios biológicos, favorece su liberación controlada en el compartimento intracelular y aumenta la concentración efectiva disponible en el sitio de acción, condiciones que en su conjunto potencian el efecto biológico observado. Esta superioridad de la formulación nanoparticulada sobre el compuesto libre fue igualmente evidenciada en el modelo preliminar HEK293-rAd5 (sección 7.5), donde las nanopartículas cargadas con nitazoxanida restauraron la viabilidad celular hasta el 65 % frente al 35 % alcanzado por el fármaco libre, estableciendo un patrón de respuesta coherente entre ambos modelos experimentales.

La evidencia generada en el modelo HepG2-HBx, considerado en conjunto con los resultados del modelo HEK293-rAd5, permite sostener que la nanoencapsulación de nitazoxanida representa una estrategia viable para potenciar la actividad

antiviral frente al VHB, actuando sobre un blanco molecular de alta relevancia para la persistencia viral como lo es la proteína HBx. Estos resultados sientan las bases para estudios posteriores en modelos de infección completa por VHB que permitan confirmar el impacto del nanosistema sobre la replicación viral y la eliminación del reservorio de ADNccc.

Muerte celular asociada a la expresión de HBx.

La tinción diferencial con naranja de acridina (AO) e ioduro de propidio (IP) permite discriminar entre poblaciones celulares viables, apoptóticas y necróticas con base en la integridad de la membrana plasmática y la actividad lisosomal, constituyendo una herramienta complementaria al análisis de viabilidad para caracterizar el tipo de muerte celular inducida por HBx y el efecto de los tratamientos evaluados.

En la Figura 26 se presentan las micrográficas de epifluorescencia correspondientes a los controles del modelo: células HepG2 sin transfectar (control negativo de muerte), células HepG2 transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx y células tratadas con cisplatino 20 μ M (control positivo de muerte). En el grupo control negativo no se detectó señal en el canal rojo (TRITC), lo que indica ausencia de compromiso de la membrana celular y una viabilidad del cultivo superior al 95 %. La monocapa se observó uniforme y la superposición de los canales rojo y verde no mostró morfología compatible con ningún tipo de muerte celular, confirmando la integridad basal del sistema experimental..

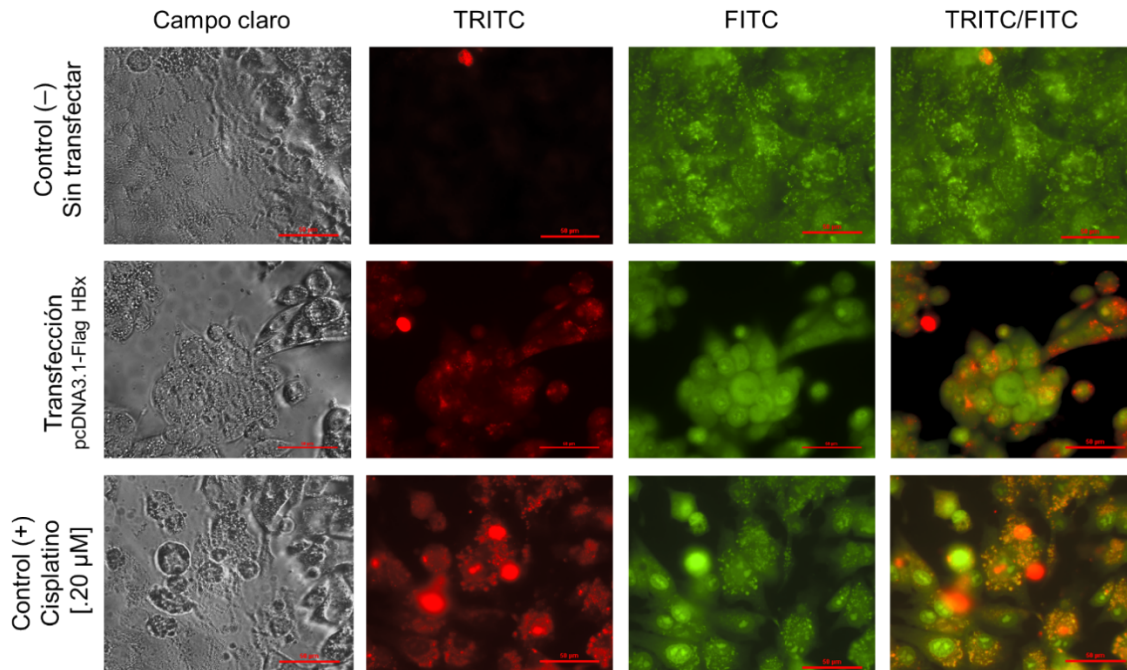


Figura 26. Microscopia de epi fluorescencia de cultivos control.

Células sin transfectar (control – de muerte), Células transfectadas con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx y células tratadas con 20 µM de Cisplatino (Control positivo de muerte).

Las células HepG2 transfectadas con pcDNA3.1-Flag HBx presentaron una morfología consistente con un proceso activo de muerte celular. Se detectó señal en el canal TRITC, indicativa de la entrada de ioduro de propidio y su intercalación con el ADN como consecuencia del compromiso de la membrana plasmática. Las células mostraron pérdida de capacidad de adherencia y morfología redondeada, cambios compatibles con muerte celular en curso. La coloración naranja observada en la superposición de los canales TRITC/FITC se atribuye a una elevada actividad lisosomal asociada a la activación de vías de muerte celular. Este patrón morfológico fue comparable al observado en el control positivo tratado con cisplatino, cuya capacidad de inducir muerte celular en cultivos in vitro está ampliamente documentada (Kim et al., 2016). La evidencia obtenida respalda la capacidad de la proteína HBx para inducir muerte celular en el modelo HepG2, en concordancia con lo descrito previamente respecto a su papel en la modulación de

la apoptosis, la alteración de la homeostasis del calcio citosólico y la desregulación de vías de señalización celular (Geng et al., 2012a; Wang et al., 2023).

Una vez establecidos los controles del modelo HepG2/HBx, los cultivos transfectados fueron tratados con nanopartículas sin carga (0.15 μ M), nitazoxanida libre (0.15 μ M), tizoxanida (0.15 μ M) y nanopartículas cargadas con nitazoxanida (0.15 μ M), cuyos resultados se presentan en la Figura 27. Las nanopartículas sin carga no mostraron capacidad de inhibir el proceso de muerte iniciado por la expresión de HBx, con un patrón de fluorescencia similar al del grupo transfectado sin tratamiento, lo que confirma que el efecto protector observado en los demás grupos es atribuible al principio activo y no al sistema de liberación, resultado coherente con los datos de viabilidad presentados en la sección anterior.

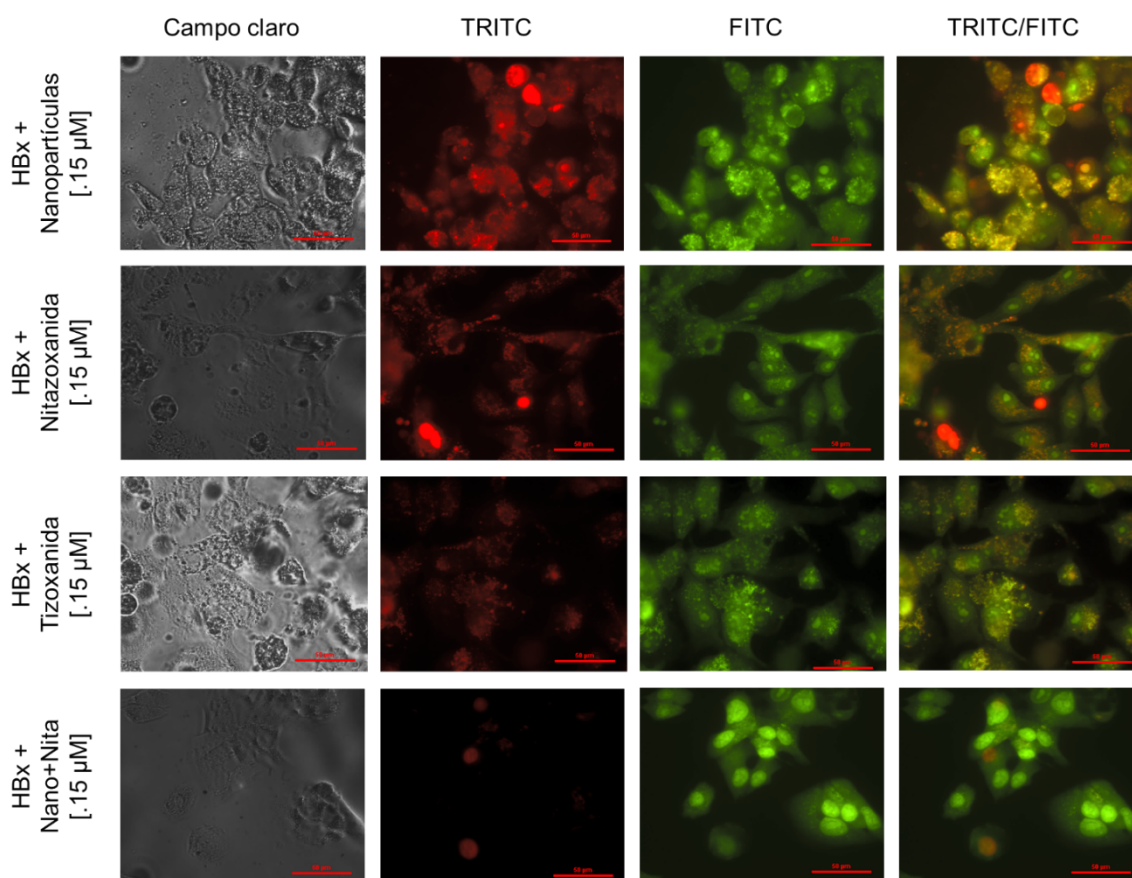


Figura 27. Microscopia de epi fluorescencia de cultivos transfectados con el plásmido pcDNA3.1-Flag HBx.

En los cultivos tratados con nitazoxanida libre y tizoxanida, el efecto de muerte se observó con menor intensidad respecto al grupo transfectado sin tratamiento: se apreciaron células adheridas y reducción de la actividad lisosomal, lo que indica que ambos compuestos tienen capacidad de inhibir parcialmente los efectos citotóxicos de HBx. Este hallazgo es consistente con lo reportado en la literatura, donde la nitazoxanida ha demostrado inhibir la replicación del VHB mediante múltiples mecanismos, entre ellos la interferencia con la interacción HBx-DDB1, la modulación de vías de señalización celular y la inducción de respuestas inmunitarias innatas (Geng et al., 2012b; Sekiba et al., 2019b; Sivasudhan et al., 2022a; Stachulski et al., 2011). Aunque el mecanismo exacto no ha sido completamente dilucidado, se ha propuesto que la nitazoxanida puede interferir con la maduración de proteínas virales y modular la vía del interferón, resultando en la atenuación de la replicación viral (Rossignol, 2014; Zhuang et al., 2023).

El efecto inhibitorio sobre la muerte celular inducida por HBx se observó de manera más contundente en los cultivos tratados con nanopartículas cargadas con nitazoxanida. La señal en el canal rojo fue notablemente menor en comparación con las demás condiciones experimentales, lo que indica un cultivo con mayor proporción de células viables, membranas íntegras, capacidad de adherencia conservada y ausencia de actividad lisosomal asociada a procesos de muerte, características opuestas a las observadas en las células transfectadas sin tratamiento y en el control positivo con cisplatino. Estos resultados sugieren que la nanoencapsulación potencia el efecto citoprotector de la nitazoxanida, favoreciendo una mayor concentración intracelular efectiva del fármaco en el sitio de acción, en línea con lo discutido respecto a las propiedades fisicoquímicas del nanosistema y su capacidad de internalización en células HepG2 (secciones 7.2 y 7.3).

La superioridad de la formulación nanoparticulada sobre la nitazoxanida libre observada en este modelo es consistente con el patrón de respuesta identificado previamente en el modelo HEK293-rAd5 (sección 7.5), donde las nanopartículas cargadas con nitazoxanida restauraron la viabilidad celular en mayor proporción que el fármaco libre frente a la infección con adenovirus recombinante. La convergencia de estos resultados en dos modelos experimentales distintos refuerza la hipótesis de que la nanoencapsulación mejora la biodisponibilidad intracelular de la nitazoxanida y potencia su actividad biológica, independientemente del contexto viral específico. Desde una perspectiva mecanística, la reducción del proceso de muerte celular observada en los cultivos tratados con nanopartículas cargadas con nitazoxanida podría estar mediada por la restauración de los niveles de SMC5/6 mediante la inhibición de la interacción HBx-DDB1, lo que limitaría la transcripción del ADNccc y reduciría la carga de proteínas virales responsables de la desregulación celular (Sekiba et al., 2019b). Esta interpretación integra los datos morfológicos obtenidos mediante microscopía de epifluorescencia con los datos moleculares de expresión de HBx discutidos en la sección anterior, proporcionando una visión coherente del mecanismo de acción del nanosistema en el modelo HepG2/HBx.

Caracterización de la apoptosis en células HepG2-HBx

La Anexina V es una proteína de membrana no glicosilada empleada para detectar la externalización de fosfatidilserina, un fosfolípido que en condiciones fisiológicas se localiza en el leaflet interno de la membrana plasmática, pero cuya exposición en la cara externa constituye un marcador temprano y distintivo de apoptosis y estrés celular. Dado que la externalización de fosfatidilserina puede ocurrir en distintas formas de muerte celular, su detección se combina con ioduro de propidio (IP), el cual penetra exclusivamente en células con membrana comprometida, permitiendo discriminar entre apoptosis temprana (Anexina V+/IP-), apoptosis tardía o necrosis secundaria (Anexina V+/IP+) y células viables (Anexina V-/IP-) (Hu et al., 2021; Zhang & Xu, 2002). La aplicación de este ensayo en el modelo

HepG2/HBx permitió caracterizar con precisión el tipo e intensidad de la muerte celular inducida por la expresión de HBx, así como el efecto modulador de los tratamientos evaluados.

La Figura 28 muestra los cultivos de células HepG2 transfectadas sin teñir, utilizados como control de fluorescencia basal. La ausencia total de señal fluorescente en este grupo confirma que no existe autofluorescencia significativa en el sistema experimental, validando la especificidad de las señales detectadas en los grupos tratados.

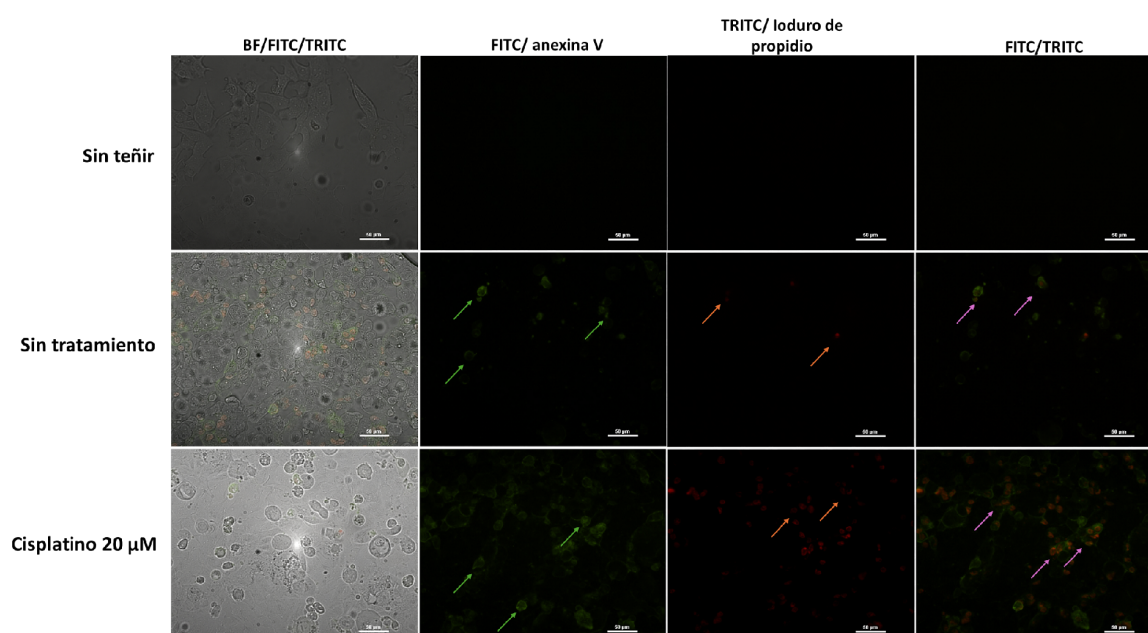


Figura 28. Ensayo de Annexina V en cultivos control

El control negativo, correspondiente a células sin transfección ni tratamiento, mostró una proporción mínima de células Anexina V positivas y prácticamente ausencia de señal de IP, lo que indica una población mayoritariamente viable con apoptosis basal mínima, comportamiento consistente con la estabilidad fisiológica de la línea HepG2 bajo condiciones óptimas de cultivo. El control positivo tratado con cisplatino presentó un incremento notable de células doblemente positivas (Anexina V+/IP+), patrón característico de apoptosis tardía y necrosis secundaria,

lo que valida la sensibilidad del ensayo y su capacidad para detectar procesos avanzados de muerte celular inducida (Kim et al., 2016).

El análisis de los grupos experimentales se presenta en las Figuras 29 y 30. En las células transfectadas con pcDNA3.1-Flag HBx sin tratamiento se observa un incremento marcado de eventos apoptóticos, con predominio de señal en el canal rojo y aumento de la población doblemente positiva, lo que indica progresión desde apoptosis temprana hacia fases tardías. La presencia simultánea de poblaciones Anexina V+/IP- y Anexina V+/IP+ sugiere que la muerte celular inducida por HBx es un proceso dinámico y progresivo, mediado por mecanismos como disfunción mitocondrial, generación de especies reactivas de oxígeno y activación de cascadas de caspasas (He et al., 2024; Li et al., 2024b; Sekiba et al., 2019b). Este resultado es coherente con los hallazgos obtenidos mediante tinción AO/IP (sección 7.7), donde las células transfectadas con HBx presentaron pérdida de adherencia, elevada actividad lisosomal y morfología compatible con muerte celular activa, consolidando la capacidad del modelo HepG2/HBx para reproducir los efectos citotóxicos de esta proteína viral.

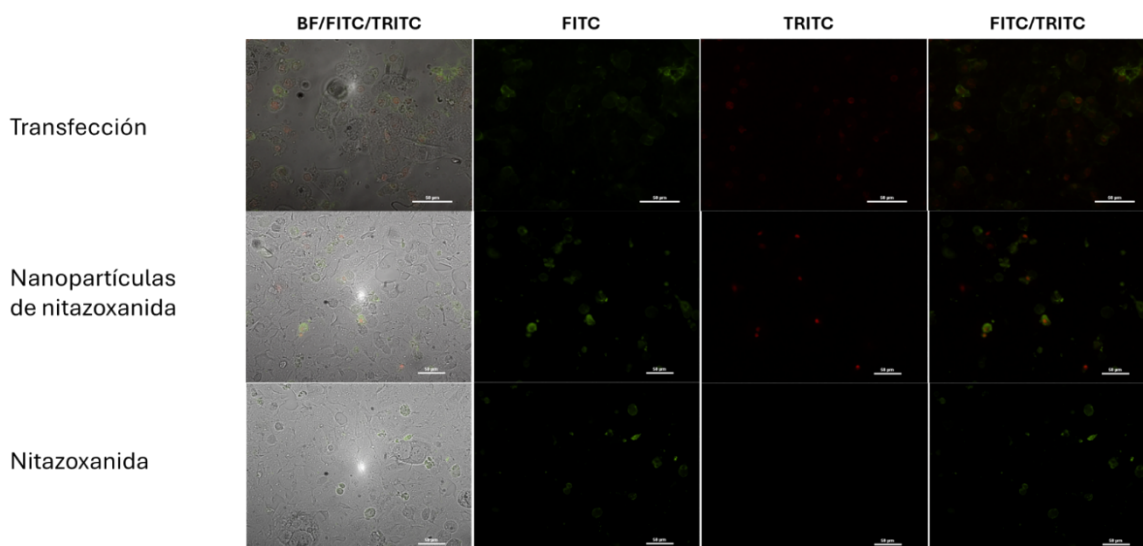


Figura 29. Ensayo de Annexina V en cultivos celulares transfectados con HBx y tratados con nanopartículas de nitazoxanida.

En los cultivos tratados con nitazoxanida libre, se observa una reducción parcial en la proporción de células Annexina V positivas, particularmente en la fracción doblemente positiva, lo que indica que el fármaco ejerce un efecto modulador sobre la progresión de la apoptosis sin lograr revertirla completamente. Este comportamiento es consistente con reportes que atribuyen a la nitazoxanida propiedades antivirales e inmunomoduladoras capaces de interferir con vías de señalización intracelular asociadas a la respuesta al estrés celular (Cao et al., 2016; Rossignol, 2014; Rossignol & Bréchet, 2019). En particular, se ha descrito que la nitazoxanida puede inducir la activación de la respuesta de interferón tipo I y modular procesos relacionados con la homeostasis redox, contribuyendo a reducir la activación de vías proapoptóticas en modelos virales (Rossignol, 2014; Schollmeier et al., 2023a). En el contexto del VHB, estos efectos podrían estar relacionados con la inhibición de la actividad funcional de HBx y la regulación de procesos dependientes del ADNccc (Sekiba et al., 2019b).

El efecto protector más relevante se identificó en los cultivos tratados con nanopartículas cargadas con nitazoxanida, donde se registró una disminución notable tanto en la población de apoptosis temprana como en la tardía, con predominio de células viables (Annexina V-/IP-). La reducción cualitativa de la señal en el canal rojo y de las células doblemente positivas señala que el sistema nanoparticulado confiere una protección frente al daño celular inducido por HBx claramente superior a la observada con el fármaco libre. Esta mejora puede explicarse por las propiedades del sistema basado en policaprolactona (PCL), el cual ha demostrado ser un vehículo eficiente para la liberación controlada de fármacos, favoreciendo su estabilidad, biodisponibilidad intracelular y acumulación sostenida en el sitio de acción (Mitchell et al., 2021; Patra et al., 2018). Desde una perspectiva mecanística, la mayor protección conferida por la formulación nanoparticulada podría estar mediada por una interferencia más eficiente en etapas clave de la cascada apoptótica inducida por HBx, incluyendo la disfunción

mitocondrial, la activación de caspasas y la generación de estrés oxidativo, mecanismos cuya modulación contribuiría a preservar la integridad celular y limitar la progresión hacia apoptosis irreversible.

La evidencia generada mediante el ensayo de Anexina V-FITC/IP confirma que la proteína HBx induce apoptosis en células HepG2 a través de un proceso progresivo que abarca desde etapas tempranas hasta fases terminales, y que este proceso puede ser modulado farmacológicamente. La nitazoxanida libre ejerce un efecto modulador parcial, mientras que su formulación en nanopartículas potencia de manera significativa la capacidad citoprotectora del fármaco, reduciendo tanto la iniciación como la progresión de la muerte celular. Estos hallazgos son coherentes con los resultados obtenidos mediante tinción AO/IP y con los datos de viabilidad y expresión de HBx discutidos en secciones previas, aportando una caracterización integral del tipo de muerte celular en el modelo empleado y reforzando el valor del nanosistema como estrategia para potenciar la actividad antiviral de la nitazoxanida frente al VHB.

Fragmentación internucleosomal del ADN como evento terminal de apoptosis

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso altamente regulado que se caracteriza por cambios morfológicos y bioquímicos distintivos, entre los que destacan la condensación de la cromatina, la contracción celular, la formación de cuerpos apoptóticos y, de manera paradigmática, la fragmentación internucleosomal del ADN cromosómico. Este último evento es ejecutado por endonucleasas específicas activadas durante la apoptosis, particularmente el complejo CAD (caspase-activated DNase), cuya activación es dependiente de caspasas efectoras y genera cortes entre nucleosomas produciendo fragmentos de aproximadamente 180 a 200 pares de bases (Hu et al., 2021; Zhang & Xu, 2002). La identificación de este patrón de fragmentación mediante electroforesis en gel de agarosa constituye un marcador clásico y ampliamente validado de muerte celular programada, que permite confirmar la ejecución terminal del

proceso apoptótico de manera complementaria a técnicas de fluorescencia como la tinción AO/IP y el ensayo de Anexina V-FITC/IP (Saadat et al., 2015).

La detección e identificación precisa del tipo de muerte celular tiene implicaciones fundamentales en el contexto de la investigación antiviral. Distinguir entre apoptosis, necrosis y otras formas de muerte celular permite determinar si la citotoxicidad observada corresponde a un proceso regulado y potencialmente modulable farmacológicamente, o bien a una destrucción celular inespecífica. En el caso de la infección por VHB, la capacidad de HBx para inducir apoptosis representa un mecanismo central en la patogénesis viral, ya que la muerte de hepatocitos infectados contribuye al daño hepático crónico, la inflamación y la progresión hacia fibrosis y carcinoma hepatocelular (He et al., 2024; Wang et al., 2023). Por ello, evaluar si los tratamientos antivirales son capaces de modular específicamente este proceso resulta indispensable para distinguir entre un efecto antiviral genuino y una citotoxicidad inespecífica del compuesto o del sistema de liberación.

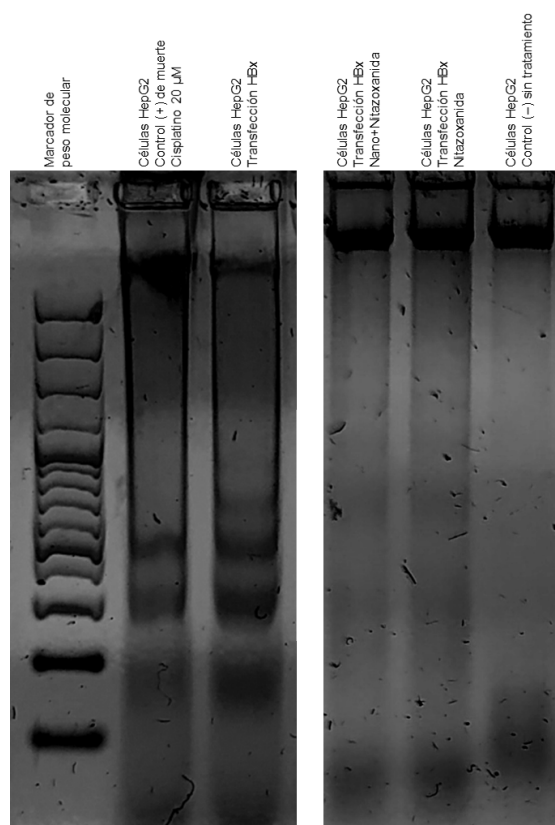


Figura 30. Análisis de fragmentación de ADN en células HepG2 transfectadas con HBx y tratadas con nitazoxanida o nanopartículas de nitazoxanida.

Con el fin de confirmar la naturaleza apoptótica de la muerte celular observada en el modelo HepG2/HBx y evaluar el efecto de los tratamientos, se realizó el análisis de fragmentación de ADN mediante electroforesis en gel de agarosa en células HepG2 transfectadas con pcDNA3.1-Flag HBx bajo las distintas condiciones experimentales (Figura 30). El control positivo, correspondiente a células tratadas con cisplatino 20 μ M, exhibió el patrón clásico de degradación genómica caracterizado por bandas difusas, compatible con la activación de endonucleasas y la fragmentación internucleosomal característica de procesos apoptóticos avanzados. Este comportamiento es concordante con el mecanismo descrito para el cisplatino, que induce apoptosis mediante daño directo al ADN, activación de p53 y activación subsecuente de caspasas efectoras (Kim et al., 2016).

De manera relevante, las células HepG2 transfectadas con HBx sin tratamiento mostraron un patrón de fragmentación comparable al del control positivo, confirmando que la expresión de esta proteína viral es suficiente para inducir daño genómico detectable y activar mecanismos apoptóticos en el modelo empleado. Este hallazgo es consistente con evidencia reciente que describe que HBx promueve apoptosis mediante inducción de estrés oxidativo, disfunción mitocondrial y activación de cascadas de caspasas, procesos que culminan en la activación del complejo CAD y la degradación internucleosomal del ADN (He et al., 2024; Hu et al., 2011a). La concordancia entre este resultado y los obtenidos previamente mediante tinción AO/IP y Anexina V-FITC/IP refuerza la interpretación de que HBx induce un proceso apoptótico progresivo en el modelo HepG2: mientras que la externalización de fosfatidilserina detectada por Anexina V señala los eventos tempranos de la apoptosis, la fragmentación del ADN confirma la ejecución terminal del proceso, indicando que en este modelo se alcanza una fase avanzada de muerte celular programada.

Los cultivos transfectados tratados con nitazoxanida libre presentaron una disminución evidente en el patrón de fragmentación del ADN, con bandas más definidas y menor dispersión del material genético, lo que indica una reducción en la actividad endonucleolítica y una atenuación del proceso apoptótico. Este efecto es coherente con los reportes que atribuyen a la nitazoxanida propiedades antivirales e inmunomoduladoras capaces de interferir con vías de señalización intracelular asociadas a la replicación viral y la activación de rutas proapoptóticas (Cao et al., 2016; Rossignol, 2014; Sekiba et al., 2019b). En particular, se ha descrito que la nitazoxanida puede modular la respuesta celular al estrés oxidativo, reducir la producción de especies reactivas de oxígeno y activar la respuesta de interferón tipo I, mecanismos que contribuirían a limitar la activación de caspasas efectoras y, en consecuencia, a reducir la fragmentación del ADN observada en este modelo (Cao et al., 2016; Romero-Cabello et al., 2021b).

El efecto protector más notable se identificó en los cultivos tratados con nanopartículas cargadas con nitazoxanida, donde la fragmentación del ADN fue considerablemente menor respecto al fármaco libre, con un patrón electroforético más próximo al del control negativo. Este resultado indica una inhibición más eficiente de la apoptosis inducida por HBx, coherente con los hallazgos obtenidos mediante AO/IP y Anexina V-FITC/IP, donde la formulación nanoparticulada mostró sistemáticamente una mayor proporción de células viables frente a todas las demás condiciones experimentales. La superioridad de la formulación nanoparticulada puede atribuirse a mejoras en la farmacocinética intracelular del fármaco, incluyendo mayor estabilidad fisicoquímica, liberación controlada y eficiencia de internalización mediada por endocitosis en células HepG2, factores que incrementan la concentración efectiva del principio activo en el sitio de acción (Mitchell et al., 2021; Patra et al., 2018). Desde una perspectiva mecanística, la reducción en la fragmentación del ADN sugiere que la nitazoxanida nanoformulada podría interferir en etapas clave de la cascada apoptótica inducida por HBx, incluyendo la liberación de factores mitocondriales proapoptóticos, la activación de caspasas efectoras y la consecuente activación del complejo CAD. Considerando el papel central de HBx en el mantenimiento de la actividad transcripcional del ADNccc, es posible que estos efectos estén también asociados a una modulación indirecta de la replicación viral intracelular (Sekiba et al., 2019b).

La convergencia de los resultados obtenidos mediante tres aproximaciones complementarias: tinción AO/IP, ensayo de Anexina V-FITC/IP y análisis de fragmentación de ADN, lo que proporciona una caracterización integral del proceso de muerte celular en el modelo HepG2-HBx. Cada técnica aporta información sobre distintas fases del proceso apoptótico: la tinción AO/IP revela cambios morfológicos y actividad lisosomal; la Anexina V detecta la externalización temprana de fosfatidilserina; y la fragmentación de ADN confirma la ejecución terminal de la apoptosis. La coherencia entre los tres conjuntos de datos fortalece la validez del modelo experimental y respalda la conclusión de que

la nitazoxanida, especialmente en su formulación nanoparticulada, ejerce un efecto citoprotector significativo frente al daño celular inducido por HBx, actuando sobre un blanco molecular de alta relevancia para la persistencia y patogénesis del virus de la hepatitis B.

8. CONCLUSIONES

- La caracterización fisicoquímica y morfológica del nanosistema polimérico cargado con nitazoxanida, respaldada por microscopía electrónica de barrido y marcaje fluorescente con FITC, confirmó la formación de nanopartículas estructuralmente íntegras con capacidad de interacción e internalización en células HepG2, validando su idoneidad como vehículo de liberación intracelular para la evaluación antiviral.
- El modelo de expresión de HBx en células HepG2 transfectadas con pcDNA3.1-Flag HBx reprodujo de manera reproducible los efectos citotóxicos y proapoptóticos descritos para esta proteína viral, constituyendo un sistema experimental válido para el estudio de estrategias terapéuticas dirigidas al VHB en condiciones *in vitro*.
- La nitazoxanida libre demostró actividad antiviral y efecto modulador sobre la apoptosis inducida por HBx, evidenciada en los modelos HEK293-rAd5 y HepG2/HBx mediante ensayos de viabilidad, tinción diferencial AO/IP, detección de Anexina V-FITC/IP y análisis de fragmentación de ADN, confirmando su mecanismo de acción sobre blancos moleculares del hospedero relevantes para la persistencia viral.
- La formulación nanoparticulada de nitazoxanida superó consistentemente el efecto del fármaco libre en todos los parámetros biológicos evaluados,

restaurando en mayor proporción la viabilidad celular, reduciendo la población apoptótica y disminuyendo la fragmentación del ADN, lo que se atribuye a la mejora en la biodisponibilidad intracelular y la liberación controlada del principio activo conferidas por el sistema polimérico basado en policaprolactona.

- La convergencia de los resultados obtenidos mediante múltiples aproximaciones metodológicas complementarias proporciona evidencia sólida de que la nanoencapsulación de nitazoxanida representa una estrategia prometedora para potenciar la actividad antiviral frente al VHB, sentando las bases para estudios futuros en modelos de infección completa que permitan evaluar su impacto sobre la replicación viral y el reservorio de ADNccc con miras a su desarrollo preclínico.

9. PERSPECTIVAS

- Evaluar el efecto de la nitazoxanida libre y nanoencapsulada en modelos de infección completa por VHB, incluyendo sistemas con el genoma viral completo o hepatocitos primarios humanos, para confirmar el impacto del nanosistema sobre la replicación viral activa y la reducción del reservorio de ADNccc.
- Incorporar moléculas fluorescentes o sistemas de marcaje durante la fabricación de las nanopartículas, con el propósito de realizar estudios de seguimiento celular y biodistribución. Esta estrategia permitiría evaluar con mayor precisión la captación, localización intracelular y permanencia del nanosistema en hepatocitos, aportando información relevante para optimizar su aplicación como sistema de liberación dirigida de compuestos antivirales.
- Caracterizar cuantitativamente el mecanismo apoptótico modulado por la nitazoxanida nanoformulada mediante citometría de flujo, análisis de actividad de caspasas y medición de potencial de membrana mitocondrial, con el fin de precisar las etapas de la cascada apoptótica sobre las que actúa el nanosistema.
- Evaluar la seguridad y actividad antiviral del nanosistema en modelos *in vivo* para determinar su biodistribución hepática, farmacocinética y perfil de toxicidad sistémica, como paso indispensable hacia su desarrollo preclínico como estrategia terapéutica para la hepatitis B crónica.

ANEXOS

ANEXO I

thermo scientific

GeneJET™ Plasmid Miniprep Kit USER GUIDE

Catalog Numbers K0502, K0503

Publication Number MAN0012655

Revision B

For Research Use Only. Not for use in diagnostic procedures.

ThermoFisher
SCIENTIFIC



LVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas
Guadalajara

Impulsando el Futuro Farmacéutico
a través de Desempeño, Sinergia y Cambio en Salud

La Asociación Farmacéutica Mexicana, A.C. otorga la presente

Constancia

A:

THELMA LIEVANOS-CAMPOS, CARLOS ALBERTO
TAVIRA-MONTALVAN, JULIO CESAR RIVERA-LEYVA, MARÍA
CRYSTAL COLUMBA-PALOMARES

Por la presentación de su trabajo titulado:

**POTENCIAL ANTIVIRAL DE NANOPARTÍCULAS CARGADAS DE
NITAZOXANIDA**

en el marco del LVIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas,
Guadalajara, Jalisco, del 9 al 12 de noviembre, 2025.



Sergio Alvarado Baral
Dr. Sergio Alvarado Baral
Director de Ciencias y Tecnología
del AFM 2024 - 2025

José L. G. Hernández
Ing. José María García Hernández
Vicepresidente
del AFM 2024 - 2025

Dra. Ana María Téllez López
Dra. Ana María Téllez López
miembro
del AFM 2024 - 2025

Dr. Sergio Alcázar Acosta
Dr. Sergio Alcázar Acosta
Subdirector de Ciencias y Tecnología
del AFM 2024 - 2025

“Por la superación técnica y científica de los profesionales farmacéuticos.”

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aguilera, A., Romero, S., & Regueiro, J. (2006). *Epidemiología y manifestaciones clínicas de las hepatitis virales*. 24(4), 264–276.
- Aguillón-Osma, J., Loango-Chamorro, N., & Landazuri, P. (2019). Liver cell models for studying lipid metabolism. Literature review. In *Revista Facultad de Medicina* (Vol. 67, Number 1, pp. 109–116). Universidad Nacional de Colombia. <https://doi.org/10.15446/revfacmed.v67n1.64964>
- Allweiss, L., Giersch, K., Piroso, A., Volz, T., Muench, R. C., Beran, R. K., Urban, S., Javanbakht, H., Fletcher, S. P., Lütgehetmann, M., & Dandri, M. (2022). Therapeutic shutdown of HBV transcripts promotes reappearance of the SMC5/6 complex and silencing of the viral genome in vivo. *Gut*, 71(2), 372–381. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2020-322571>
- Arti, M., & Ashwini, A. (2019). Formulation of Nitazoxamine Sustained-Release Tablets. In *International Journal of Pharmaceutical and Phytopharmacological Research* (Vol. 9, Number 3). Mohan Arti. www.eijppr.com
- Arzumanian, V. A., Kiseleva, O. I., & Poverennaya, E. V. (2021). The curious case of the HepG2 cell line: 40 years of expertise. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Number 23). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms222313135>
- ATCC. (2024). *Hep G2*. <https://www.atcc.org/products/hb-8065>
- Bharti, C., Sharma, S., Goswami, N., Sharma, H., & Rabbani, S. A. (2021). *Role of nitazoxanide as repurposed drug in the treatment and management of various diseases*.
- Cao, L., Quan, X. B., Zeng, W. J., Yang, X. O., & Wang, M. J. (2016). Mechanism of hepatocyte apoptosis. *Journal of Cell Death*, 9, 19–29. <https://doi.org/10.4137/JCD.S39824>
- Caprifico, A. E., Foot, P., Polycarpou, E., & Calabrese, G. (2024). *Cellular uptake of Alkyl-Modified Chitosan Nanoparticles by SIM-A9 and hCMEC/D3 cells*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-4675089/v1>
- Caprifico, A. E., Polycarpou, E., Foot, P. J. S., & Calabrese, G. (2021). Biomedical and Pharmacological Uses of Fluorescein Isothiocyanate Chitosan-Based Nanocarriers. In *Macromolecular Bioscience* (Vol. 21, Number 1). Wiley-VCH Verlag. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000312>
- Carnalla, M., Vidaña-Pérez, D., Alpuche-Aranda, C., Chávez-Tapia, N. C., Romero-Martínez, M., Shamah-Levy, T., & Barrientos-Gutiérrez, T. (2022). Hepatitis B infection in Mexican adults: Results of a nationally representative survey. *Annals of Hepatology*, 27. <https://doi.org/10.1016/j.aohep.2021.100583>
- Chancham, P., & Hughes, J. A. (2001). RELATIONSHIP BETWEEN PLASMID DNA TOPOLOGICAL FORMS AND IN VITRO TRANSFECTION. In *JOURNAL OF LIPOSOME RESEARCH* (Vol. 11, Number 3). www.dekker.com

- Che, L., Du, Z. B., Wang, W. H., Wu, J. S., Han, T., Chen, Y. Y., Han, P. Y., Lei, Z., Chen, X. X., He, Y., Xu, L., Lin, X., Lin, Z. N., & Lin, Y. C. (2022). Intracellular antibody targeting HBx suppresses invasion and metastasis in hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis via protein phosphatase 2A-B56γ-mediated dephosphorylation of protein kinase B. *Cell Proliferation*, 55(11). <https://doi.org/10.1111/cpr.13304>
- Cheng, Y. H., Wu, Y. J., Shih, Y. C., Lin, Y. Q., Chang, Y. W., Wu, Y. H., Hu, E. W., Ku, R. H., Wu, C. M., Wu, S. C., Yeh, T. Y., & Chang, C. Te. (2025). The Filterprep: A simple and efficient approach for high-yield, high-purity plasmid DNA purification. *New Biotechnology*, 90, 77–87. <https://doi.org/10.1016/j.nbt.2025.09.003>
- Cojocaru, F. D., Botezat, D., Gardikiotis, I., Uritu, C. M., Dodi, G., Trandafir, L., Rezus, C., Rezus, E., Tamba, B. I., & Mihai, C. T. (2020). Nanomaterials designed for antiviral drug delivery transport across biological barriers. In *Pharmaceutics* (Vol. 12, Number 2). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12020171>
- Cortes-Mancera, F., & Navas, M.-C. (2015). *Rol of Hepatitis B virus genotype and precore/core variants on antiviral treatment response and clinical outcome*. <https://www.researchgate.net/publication/234138763>
- Cortez, S. (2023). *Desarrollo y caracterizacion de un nanosistema polimérico de nitazoxanida con potencial actividad antiviral*. UAEM.
- Dayanidhi, D. L., Watlington, W. K., Mantyh, J. B., Rupprecht, G., & Hsu, D. S. (2023). Effects and Eradication of Mycoplasma Contamination on Patient-derived Colorectal Cancer Organoid Cultures. *Cancer Research Communications*, 3(9), 1952–1958. <https://doi.org/10.1158/2767-9764.CRC-23-0109>
- Delshadi, R., Bahrami, A., McClements, D. J., Moore, M. D., & Williams, L. (2021a). Development of nanoparticle-delivery systems for antiviral agents: A review. *Journal of Controlled Release*, 331(January), 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.017>
- Delshadi, R., Bahrami, A., McClements, D. J., Moore, M. D., & Williams, L. (2021b). Development of nanoparticle-delivery systems for antiviral agents: A review. In *Journal of Controlled Release* (Vol. 331, pp. 30–44). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.017>
- Delshadi, R., Bahrami, A., McClements, D. J., Moore, M. D., & Williams, L. (2021c). Development of nanoparticle-delivery systems for antiviral agents: A review. *Journal of Controlled Release*, 331(January), 30–44. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2021.01.017>
- Demirezen, D. A., Yilmaz, Ş., Yilmaz, D. D., & Yıldız, Y. Ş. (2022). Green synthesis of iron oxide nanoparticles using *Ceratonia siliqua* L. aqueous extract: improvement of colloidal stability by optimizing synthesis parameters, and evaluation of antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *International Journal of Materials Research*, 113(10), 849–861. <https://doi.org/10.1515/ijmr-2022-0037>

- Donato, M. T., Tolosa, L., & Gómez-Lechón, M. J. (2015). Culture and functional characterization of human hepatoma HepG2 cells. In *Protocols in In Vitro Hepatocyte Research* (pp. 77–93). Springer New York. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2074-7_5
- Dyawanapelly, S., Koli, U., Dharamdasani, V., Jain, R., & Dandekar, P. (2016). Improved mucoadhesion and cell uptake of chitosan and chitosan oligosaccharide surface-modified polymer nanoparticles for mucosal delivery of proteins. *Drug Delivery and Translational Research*, 6(4), 365–379. <https://doi.org/10.1007/s13346-016-0295-x>
- Floyd, T. G., Gurnani, P., & Rho, J. Y. (2025). Characterisation of polymeric nanoparticles for drug delivery. In *Nanoscale*. Royal Society of Chemistry. <https://doi.org/10.1039/d5nr00071h>
- Friedman, L. S. (2023). Hepatitis B aguda. In *Diagnostico clínico y tratamiento* (16).
- Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco, D. (2021a). Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology*, 12(February), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>
- Gagliardi, A., Giuliano, E., Venkateswararao, E., Fresta, M., Bulotta, S., Awasthi, V., & Cosco, D. (2021b). Biodegradable Polymeric Nanoparticles for Drug Delivery to Solid Tumors. *Frontiers in Pharmacology*, 12(February), 1–24. <https://doi.org/10.3389/fphar.2021.601626>
- Geng, X., Huang, C., Qin, Y., McCombs, J. E., Yuan, Q., Harry, B. L., Palmer, A. E., Xia, N. S., & Xue, D. (2012a). Hepatitis B virus X protein targets Bcl-2 proteins to increase intracellular calcium, required for virus replication and cell death induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(45), 18471–18476. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204668109>
- Geng, X., Huang, C., Qin, Y., McCombs, J. E., Yuan, Q., Harry, B. L., Palmer, A. E., Xia, N. S., & Xue, D. (2012b). Hepatitis B virus X protein targets Bcl-2 proteins to increase intracellular calcium, required for virus replication and cell death induction. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(45), 18471–18476. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204668109>
- González, D. (2022). *Elaboración de nanopartículas para silenciamiento génico*.
- Gupta, N. (2019). DNA extraction and polymerase chain reaction. *Journal of Cytology*, 36(2), 116–117. https://doi.org/10.4103/JOC.JOC_110_18
- Güvenir, M., & Arikan, A. (2020). Hepatitis b virus: From diagnosis to treatment. In *Polish Journal of Microbiology* (Vol. 69, Number 4, pp. 391–399). Polish Society of Microbiologists. <https://doi.org/10.33073/PJM-2020-044>
- He, W., Zheng, Z., Zhao, Q., Zhang, R., & Zheng, H. (2024). Targeting HBV cccDNA Levels: Key to Achieving Complete Cure of Chronic Hepatitis B. In *Pathogens* (Vol. 13, Number 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/pathogens13121100>

- Hu, L., Chen, L., Yang, G. Z., Li, L., Sun, H. Y., Chang, Y. X., Tu, Q. Q., Wu, M. C., & Wang, H. Y. (2011a). HBx Sensitizes Cells to Oxidative Stress-induced Apoptosis by Accelerating the Loss of Mcl-1 Protein via Caspase-3 Cascade. *Molecular Cancer*, 10. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-43>
- Hu, L., Chen, L., Yang, G. Z., Li, L., Sun, H. Y., Chang, Y. X., Tu, Q. Q., Wu, M. C., & Wang, H. Y. (2011b). HBx Sensitizes Cells to Oxidative Stress-induced Apoptosis by Accelerating the Loss of Mcl-1 Protein via Caspase-3 Cascade. *Molecular Cancer*, 10. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-43>
- Hu, X. M., Li, Z. X., Lin, R. H., Shan, J. Q., Yu, Q. W., Wang, R. X., Liao, L. S., Yan, W. T., Wang, Z., Shang, L., Huang, Y., Zhang, Q., & Xiong, K. (2021). Guidelines for Regulated Cell Death Assays: A Systematic Summary, A Categorical Comparison, A Prospective. In *Frontiers in Cell and Developmental Biology* (Vol. 9). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634690>
- Huang, C. Y., Ng, M. Y., Lin, T., Liao, Y. W., Huang, W. S., Hsieh, C. W., Yu, C. C., & Chen, C. J. (2023). Quercetin ameliorates advanced glycation end product-induced wound healing impairment and inflammaging in human gingival fibroblasts. *Journal of Dental Sciences*, (xxxx). <https://doi.org/10.1016/j.jds.2023.04.014>
- Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2025). *Estadísticas de defunciones registradas (EDR), enero-septiembre de 2024 (preliminar)*.
- Jiang, T., Liu, M., Wu, J., & Shi, Y. (2016). Structural and biochemical analysis of Bcl-2 interaction with the hepatitis B virus protein HBx. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(8), 2074–2079. <https://doi.org/10.1073/pnas.1525616113>
- Kachkin, D. V., Khorolskaya, J. I., Ivanova, J. S., & Rubel, A. A. (2020). An efficient method for isolation of plasmid DNA for transfection of mammalian cell cultures. *Methods and Protocols*, 3(4), 1–9. <https://doi.org/10.3390/mps3040069>
- Kalikias, Y., Mohammadpour, Z., & Sharifi, L. (2016). Determining population doubling time and the appropriate number of HepG2 cells for culturing in 6-well plate. In *Article in International Journal of Sciences Basic and Applied Research*. <https://www.researchgate.net/publication/312631977>
- Khan, M., Yamasta, A., Parvin, M., Ferdaus, J., Ahmed, H., & Arbab, A. S. (2024). Experimental study of processing of PCL (polycaprolactone)-peptides nanoparticles and its biodistribution analysis for drug delivery system. In *Micro and Nano Systems Letters* (Vol. 12, Number 1). Society of Micro and Nano Systems. <https://doi.org/10.1186/s40486-024-00208-y>
- Korba, B. E., Montero, A. B., Farrar, K., Gaye, K., Mukerjee, S., Ayers, M. S., & Rossignol, J. F. (2008). Nitazoxanide, tizoxanide and other thiazolides are potent inhibitors of hepatitis B virus and hepatitis C virus replication. *Antiviral Research*, 77(1), 56–63. <https://doi.org/10.1016/J.ANTIVIRAL.2007.08.005>

- Kumar, V. (2025). HBx protein as a therapeutic target for functional cure of hepatitis B virus infection. In *Virology* (Vol. 604). Academic Press Inc. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2025.110438>
- La Vega, J. De, Braak, B. Ter, Azzoni, A. R., Monteiro, G. A., & Prazeres, D. M. F. (2013). Impact of plasmid quality on lipoplex-mediated transfection. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 102(11), 3932–3941. <https://doi.org/10.1002/jps.23709>
- Li, D., Hamadalnil, Y., & Tu, T. (2024a). Hepatitis B Viral Protein HBx: Roles in Viral Replication and Hepatocarcinogenesis. *Viruses*, 16(9), 1361. <https://doi.org/10.3390/v16091361>
- Li, D., Hamadalnil, Y., & Tu, T. (2024b). Hepatitis B Viral Protein HBx: Roles in Viral Replication and Hepatocarcinogenesis. In *Viruses* (Vol. 16, Number 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v16091361>
- Lin, Y. C., Lin, J. F., Tsai, T. F., Chen, H. E., Chou, K. Y., Yang, S. C., Tang, Y. M., & Hwang, T. I. S. (2017). Acridine orange exhibits photodamage in human bladder cancer cells under blue light exposure. *Scientific Reports* 2017 7:1, 7(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-13904-0>
- Lira, B. S. de M. M., Sousa, V. C. de, Brito, F. Í. de S., & Carvalho, A. L. M. (2021a). Nitazoxanida: aspectos gerais, sistemas de liberação e potencial de reposicionamento da molécula. *Research, Society and Development*, 10(1), e42610111766. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11766>
- Lira, B. S. de M. M., Sousa, V. C. de, Brito, F. Í. de S., & Carvalho, A. L. M. (2021b). Nitazoxanida: aspectos gerais, sistemas de liberação e potencial de reposicionamento da molécula. *Research, Society and Development*, 10(1), e42610111766. <https://doi.org/10.33448/rsd-v10i1.11766>
- Liu, M. (2021). Nascent perspectives on COVID-19 treatments. In *Side Effects of Drugs Annual* (1st ed., Vol. 43). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/bs.seda.2021.07.001>
- Lu, X. Y., Wu, D. C., Li, Z. J., & Chen, G. Q. (2011). Polymer nanoparticles. In *Progress in Molecular Biology and Translational Science* (Vol. 104, pp. 299–323). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416020-0.00007-3>
- Mahmoud, D. B., Shitu, Z., & Mostafa, A. (2020). Drug repurposing of nitazoxanide: can it be an effective therapy for COVID-19? In *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* (Vol. 18, Number 1). Springer. <https://doi.org/10.1186/s43141-020-00055-5>
- Mazumdar, S., Chitkara, D., & Mittal, A. (2021). Exploration and insights into the cellular internalization and intracellular fate of amphiphilic polymeric nanocarriers. In *Acta Pharmaceutica Sinica B* (Vol. 11, Number 4, pp. 903–924). Chinese Academy of Medical Sciences. <https://doi.org/10.1016/j.apsb.2021.02.019>
- Mironova, M., & Ghany, M. G. (2024). Hepatitis B Vaccine: Four Decades on. In *Vaccines* (Vol. 12, Number 4). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/vaccines12040439>

- Mishra, R., Mir, S. R., & Amin, S. (2017). POLYMERIC NANOPARTICLES FOR IMPROVED BIOAVAILABILITY OF CILNIDIPINE. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(4), 129. <https://doi.org/10.22159/ijpps.2017v9i4.15786>
- Mitchell, M. J., Billingsley, M. M., Haley, R. M., Wechsler, M. E., Peppas, N. A., & Langer, R. (2021). Engineering precision nanoparticles for drug delivery. In *Nature Reviews Drug Discovery* (Vol. 20, Number 2, pp. 101–124). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41573-020-0090-8>
- Nelemans, L. C., & Gurevich, L. (2020). Drug delivery with polymeric nanocarriers-cellular uptake mechanisms. *Materials*, 13(2). <https://doi.org/10.3390/ma13020366>
- OMS. (2023, July 18). *Hepatitis C*. <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>
- OMS. (2024). *Hepatitis B*. <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b>
- Parikh, P. K., Parikh, N. H., B, M., Ranch, K. M., Boddu, S. H. S., R, J. B., & Tiwari, A. K. (2023). Developments in small molecule antiviral drugs against hepatitis B and C viruses: FDA approved therapies and new drugs in clinical trials. In *Arabian Journal of Chemistry* (Vol. 16, Number 8). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2023.105013>
- Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., Diaz-Torres, L. A., Grillo, R., Swamy, M. K., Sharma, S., Habtemariam, S., & Shin, H. S. (2018). Nano based drug delivery systems: Recent developments and future prospects. In *Journal of Nanobiotechnology* (Vol. 16, Number 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s12951-018-0392-8>
- Piacentini, S., Riccio, A., Santopolo, S., Pauciullo, S., La Frazia, S., Rossi, A., Rossignol, J. F., & Santoro, M. G. (2023). The FDA-approved drug nitazoxanide is a potent inhibitor of human seasonal coronaviruses acting at postentry level: effect on the viral spike glycoprotein. *Frontiers in Microbiology*, 14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1206951>
- Ridolfo, R., Tavakoli, S., Junnuthula, V., Williams, D. S., Urtti, A., & Van Hest, J. C. M. (2021). Exploring the Impact of Morphology on the Properties of Biodegradable Nanoparticles and Their Diffusion in Complex Biological Medium. *Biomacromolecules*, 22(1), 126–133. <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.0c00726>
- Rodríguez-Frias, F., & Jardi, R. (2008). Molecular virology of the hepatitis B virus. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 26(SUPPL. 7), 2–10. [https://doi.org/10.1016/S0213-005X\(08\)76514-5](https://doi.org/10.1016/S0213-005X(08)76514-5)
- Romero-Cabello, R., Romero-Feregrino, R., Romero-Feregrino, R., & Amancio Chassin, O. (2021a). Uso de nitazoxanida en infecciones virales. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 34(2), 94–99. <https://doi.org/10.35366/100548>
- Romero-Cabello, R., Romero-Feregrino, R., Romero-Feregrino, R., & Amancio Chassin, O. (2021b). Uso de nitazoxanida en infecciones virales. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica*, 34(2), 94–99. <https://doi.org/10.35366/100548>

- Rossignol, J. F. (2014). Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent. In *Antiviral Research* (Vol. 110, pp. 94–103). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.07.014>
- Rossignol, J. F., & Bréchet, C. (2019). A Pilot Clinical Trial of Nitazoxanide in the Treatment of Chronic Hepatitis B. *Hepatology Communications*, 3(6), 744–747. <https://doi.org/10.1002/hep4.1339>
- Rossignol, J.-F. (2014). *Nitazoxanide: A first-in-class broad-spectrum antiviral agent*. 110, 94–103. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2014.07.014>
- Roth, J. S., Lee, T. D., Cheff, D. M., Gosztyla, M. L., Asawa, R. R., Danchik, C., Michael, S., Simeonov, A., Klumpp-Thomas, C., Wilson, K. M., & Hall, M. D. (2020). Keeping It Clean: The Cell Culture Quality Control Experience at the National Center for Advancing Translational Sciences. *SLAS Discovery*, 25(5), 491–497. <https://doi.org/10.1177/2472555220911451>
- Saadat, Y. R., Saeidi, N., Vahed, S. Z., Barzegari, A., & Barar, J. (2015). An update to DNA ladder assay for apoptosis detection. *BiolImpacts*, 5(1), 25–28. <https://doi.org/10.15171/bi.2015.01>
- Schollmeier, A., Glitscher, M., & Hildt, E. (2023a). Relevance of HBx for Hepatitis B Virus-Associated Pathogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 24(5), 4964. <https://doi.org/10.3390/ijms24054964>
- Schollmeier, A., Glitscher, M., & Hildt, E. (2023b). Relevance of HBx for Hepatitis B Virus-Associated Pathogenesis. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Number 5). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms24054964>
- Secretaría de Salud. (2020a). *Informe Anual de Vigilancia Epidemiológica de Hepatitis Virales, México 2020*. 11.
- Secretaría de Salud. (2020b). *Informe Anual de Vigilancia Epidemiológica de Hepatitis Virales, México 2020*. 11. <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/615926/HepatitisViralesInformeAnual2020.pdf>
- Sekiba, K., Otsuka, M., Ohno, M., Yamagami, M., Kishikawa, T., Suzuki, T., Ishibashi, R., Seimiya, T., Tanaka, E., & Koike, K. (2019a). Inhibition of HBV Transcription From cccDNA With Nitazoxanide by Targeting the HBx–DDB1 Interaction. *CMGH*, 7(2), 297–312. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.010>
- Sekiba, K., Otsuka, M., Ohno, M., Yamagami, M., Kishikawa, T., Suzuki, T., Ishibashi, R., Seimiya, T., Tanaka, E., & Koike, K. (2019b). Inhibition of HBV Transcription From cccDNA With Nitazoxanide by Targeting the HBx–DDB1 Interaction. *CMGH*, 7(2), 297–312. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.010>

- Shakya, A., Bhat, H. R., & Ghosh, S. K. (2017). Update on Nitazoxanide: A Multifunctional Chemotherapeutic Agent. *Current Drug Discovery Technologies*, 15(3), 201–213. <https://doi.org/10.2174/1570163814666170727130003>
- Sharmin, S., Rahaman, M., Sarkar, C., Atolani, O., Torequl, M., & Stephen, O. (2021a). Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents : A literature-based perspective study. *Heliyon*, 7(3), e06456. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06456>
- Sharmin, S., Rahaman, M., Sarkar, C., Atolani, O., Torequl, M., & Stephen, O. (2021b). Nanoparticles as antimicrobial and antiviral agents : A literature-based perspective study. *Heliyon*, 7(3), e06456. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06456>
- Sivasudhan, E., Blake, N., Lu, Z., Meng, J., & Rong, R. (2022a). Hepatitis B Viral Protein HBx and the Molecular Mechanisms Modulating the Hallmarks of Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Review. *Cells*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/CELLS11040741>
- Sivasudhan, E., Blake, N., Lu, Z., Meng, J., & Rong, R. (2022b). Hepatitis B Viral Protein HBx and the Molecular Mechanisms Modulating the Hallmarks of Hepatocellular Carcinoma: A Comprehensive Review. In *Cells* (Vol. 11, Number 4). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells11040741>
- Stachulski, A. V., Pidathala, C., Row, E. C., Sharma, R., Berry, N. G., Lawrenson, A. S., Moores, S. L., Iqbal, M., Bentley, J., Allman, S. A., Edwards, G., Helm, A., Hellier, J., Korba, B. E., Semple, J. E., & Rossignol, J. F. (2011). Thiazolides as novel antiviral agents. 2. Inhibition of hepatitis c virus replication. *Journal of Medicinal Chemistry*, 54(24), 8670–8680. https://doi.org/10.1021/JM201264T/SUPPL_FILE/JM201264T_SI_001.PDF
- Stelitano, D., La Frazia, S., Ambrosino, A., Zannella, C., Tay, D., Iovane, V., Montagnaro, S., De Filippis, A., Santoro, M. G., Porotto, M., & Galdiero, M. (2023). Antiviral activity of nitazoxanide against Morbillivirus infections. *Journal of Virus Eradication*, 9(4). <https://doi.org/10.1016/j.jve.2023.100353>
- Su, L. (2019). Disruption of HBx-DDB1 by NTZ: New Mechanistic Insight Into an Old Drug With Broad Anti-infective Activities. In *CMGH* (Vol. 7, Number 2, pp. 289–290). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/j.jcmgh.2018.10.013>
- Tanaka-Yachi, R., Aizawa, K., Shimizu, K., Akutsu, H., & Nakamura, K. (2022). Low-density cell culture enhances hepatic function through tight junction formation in HepG2 cells. *Biology of the Cell*, 114(9), 225–236. <https://doi.org/10.1111/boc.202200002>
- Teixeira, R. F. da C., Antunes-Araújo, L., & Barros de Araújo, G. L. (2024). Exploratory study on physicochemical properties of nitazoxanide nanocrystalline suspension obtained by evaporative solvent-antisolvent technique. *International Journal of Science and Research Archive*, 13(1), 1232–1239. <https://doi.org/10.30574/ijrsra.2024.13.1.1807>
- Thermo Fisher scientific. (2025). *GenJET Plasmid Miniprep Kit User Guide*. 1–15.
- Tobagar, M., Sadaqat, S. K., & Tobagar, K. (2023). Viral Hepatitis. *Journal for Research in Applied Sciences and Biotechnology*, 2(6), 232–240. <https://doi.org/10.55544/jrasb.2.6.33>

- Toro Montoya, A. I., Carlos, J., & Gutiérrez, R. (2011). *Hepatitis B* (Vol. 17).
- Torres, H., & Gonzáles, M. (2022). *Nitazoxanida/Niridazol (antiparasitarios) síntesis introducción*. (May). <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.30325.24809/1>
- Tsuji, T., Morita, S. ya, Nakamura, Y., Ikeda, Y., Kambe, T., & Terada, T. (2021). Alterations in cellular and organellar phospholipid compositions of HepG2 cells during cell growth. *Scientific Reports*, 11(1). <https://doi.org/10.1038/s41598-021-81733-3>
- Tyagi, P., Singh, A., Kumar, J., Ahmad, B., Bahuguna, A., Vivekanandan, P., Sarin, S. K., & Kumar, V. (2024). Furanocoumarins promote proteasomal degradation of viral HBx protein and down-regulate cccDNA transcription and replication of hepatitis B virus. *Virology*, 595. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2024.110065>
- Uday, S., Jha, B. C., Gupta, D., Gupta, R., & Gupta, T. K. (2023). Functional nanoparticles as novel emerging antiviral therapeutic agents. *Smart Nanomaterials to Combat the Spread of Viral Infections: Advanced Strategies for the Prevention of Viral Infections*, 171–193. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-99148-3.00013-3>
- Vakurov, A., Pchelintsev, N. A., Gibson, T., & Millner, P. (2012). Development of polymeric nanoparticles showing tuneable pH-responsive precipitation. *Journal of Nanoparticle Research*, 14(12). <https://doi.org/10.1007/s11051-012-1302-x>
- Verónica, L., Orozco, S., Adrián, D., Galindo, F., María, J., Cruz, V., Armendáriz Borunda, J., Orozco, S., Galindo, F., & Cruz, V. (2016). Bases moleculares de la hepatitis B. In *Biología molecular. Fundamentos y aplicaciones en las ciencias de la salud* (26).
- Wang, P., Li, J., & Wei, Q. (2023). Understanding the interplay between cell force and cell adhesion processes. In *Engineered Regeneration* (Vol. 4, Number 3, pp. 277–288). KeAi Communications Co. <https://doi.org/10.1016/j.engreg.2023.04.002>
- Weiskirchen, S., Schröder, S. K., Buhl, E. M., & Weiskirchen, R. (2023). A Beginner's Guide to Cell Culture: Practical Advice for Preventing Needless Problems. In *Cells* (Vol. 12, Number 5). MDPI. <https://doi.org/10.3390/cells12050682>
- WHO. (2024). *Global Hepatitis Report 2024. Action for Access in Low- and Middle-Income Countries*. World Health Organization.
- Yang, B., & Bouchard, M. J. (2012). The Hepatitis B Virus X Protein Elevates Cytosolic Calcium Signals by Modulating Mitochondrial Calcium Uptake. *Journal of Virology*, 86(1), 313–327. <https://doi.org/10.1128/jvi.06442-11>
- Yuen, M. F., Chen, D. S., Dusheiko, G. M., Janssen, H. L. A., Lau, D. T. Y., Locarnini, S. A., Peters, M. G., & Lai, C. L. (2018). Hepatitis B virus infection. In *Nature Reviews Disease Primers* (Vol. 4). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2018.35>
- Zhang, J., & Xu, M. (2002). Separation of propulsive and adhesive traction stresses in locomoting keratocytes. In *TRENDS in Cell Biology* (Vol. 12, Number 2). [http://tcb.trends.com0962-8924/02/\\$-seefrontmatter](http://tcb.trends.com0962-8924/02/$-seefrontmatter)

- Zhuang, A. Q., Chen, Y., Chen, S. M., Liu, W. C., Li, Y., Zhang, W. J., & Wu, Y. H. (2023). Current Status and Challenges in Anti-Hepatitis B Virus Agents Based on Inactivation/Inhibition or Elimination of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA. In *Viruses* (Vol. 15, Number 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/v15122315>
- Zielinska, A., Carreiró, F., Oliveira, A. M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Massimo, L., Piot, E., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25, 3731.
- Zielinska, A., Carreiró Filipa, Oliveira Ana M., Neves, A., Pires Bárbara, Nagasamy D., Eder Piotr, Silva Amélia M., Santini Antonello, & Souto Eliana B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. In *Molecules* (Vol. 25, Number 16). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules25163731>
- Zielinska Aleksandra, Carreiró Filipa, Oliveira Ana M., Neves, A., Pires, B., Venkatesh, D. N., Durazzo, A., Massimo Lucarini, Piot, E., Silva, A. M., Santini, A., & Souto, E. B. (2020). Polymeric Nanoparticles: Production, Characterization, Toxicology and Ecotoxicology. *Molecules*, 25, 3731.
- Zoulim, F., & Testoni, B. (2023). Eliminating cccDNA to cure hepatitis B virus infection. In *Journal of Hepatology* (Vol. 78, Number 4, pp. 677–680). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2023.01.017>



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: L.F. Thelma Lievanos Campos

Título de la tesis: "Potencial antiviral de nanopartículas cargadas con nitazoxanida"

Grado a obtener:

☒ Maestría en Farmacia
☐ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Efrén Hernández Baltazar

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Sí, se aprueba tal como se presenta
☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-Firma UAEM
Dr. Efrén Hernández Baltazar

[16/06/2026]
Fecha



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio C, Tercer piso,
Facultad de Farmacia, Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 7986 / posgrado_ff@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

EFREN HERNANDEZ BALTAZAR | Fecha: 2026-06-18 23:04:38 | FIRMANTE

XOUIM6ZYR4Lz1rb5rOjNFOfgDXL2S7bzzGA5OIYDucXvNmr8hMw2ibFI/N1opkHvdXRHDd1p0vUW1wGCK3EHUtmMhPMTBk0wTNOK3Eo9vPI0b1Hfn7pqQIAzuJ7WSEFQv
64bRCQbdSPU8vVPR2uNdACGNrRTHbcPpObZ884ZRAVqmMRqeHdf8b92HbpxtDcy4pC8dzyC9eP1pLldpmUSb3l82tgdxtZTGRLGK6boyrlJlrm9UuOquenwMuVH5mGR1A
sg0Bv835vtUE2k6XN5jJNZl8ATNaM+IOTD+6oiH5NbQG1xM9BIUG+TswLzAUDzay9HC5MBFQ==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



3LXmJ/RseM

<https://efirma.uaem.mx/inoRepudio/VWJH3eGmTy2ZP8EiheF73X6Dj3Te7m3h>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: L.F. Thelma Lievanos Campos

Título de la tesis: "Potencial antiviral de nanopartículas cargadas con nitazoxanida"

Grado a obtener:

☒ Maestría en Farmacia
☐ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. Jessica Nayelli Sánchez Carranza

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Sí, se aprueba tal como se presenta
☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-Firma UAEM
**Dra. Jessica Nayelli Sánchez
Carranza**

[16/06/2026]

Fecha



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio C, Tercer piso,
Facultad de Farmacia, Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 7986 / posgrado_ff@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JESSICA NAYELLI SANCHEZ CARRANZA | Fecha:2026-06-16 19:36:42 | FIRMANTE
d7d3/E9pvY/hSQNfwDRic9vAMVllUVh0OShbDxF+nFYI2doQFb36acYlucBOpr4QNzE5r95edt0vwt2XrIZip07qItadzZkg7OV05d5ZlaZnDf57m0lkXgoek9NnWoQb53LYSPWpftgq
Bala/NovNcH1rgpC6Z4q/Qh2eecPWwtf5ZAwCmfVqQUAx+izffeX47veufvOHY9Vnve9Gw2o8kyzm6M1b0wdmcb39MdVb/mzneVpSaYmD/7yfl/3OVuoY/a9An0lo/aV3wtAkkusT6
pEdb4jll/haEJPMFqA7xL84PmE474hTBkCB9wq0znrgVwEx036hwB29to7pZtw==



Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:

GaOByuq79

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/vqToTxKNEYzYcThie32IsPICf0z02L99>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: L.F. Thelma Lievanos Campos

Título de la tesis: "Potencial antiviral de nanopartículas cargadas con nitazoxanida"

Grado a obtener:

☒ Maestría en Farmacia
☐ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Antonio Bernabé Antonio

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Sí, se aprueba tal como se presenta
☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-Firma UAEM
Dr. Antonio Bernabé Antonio

[16/06/2026]
Fecha



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio C, Tercer piso,
Facultad de Farmacia, Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 7986 / posgrado_ff@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

ANTONIO BERNABÉ ANTONIO | Fecha:2026-06-16 19:54:10 | FIRMANTE

TxWeWxjHzWULrG0WugQttVa12fdR9h7kS2zUBs1WG6c0n7RfBFxuecd0AZib64IQIWusuRVeDAhI8N0KTIXFs1LcNkh4Uv1CdnXIVILTBPy8/704aZOWm6PW11IHB1uGkvzKFA+N71kQJJBg6mDWWG/Wb8V0hEoAdSLSyLcRp6mgpET2y7xaKGjp+3BI7F+53mTtF5/VxjDri3KKmoNfoHOKn3vsOdxOHxRFxSe7f5HmSB0okMQnAj4py6js10E45+1JhbiqjlgQ/L+a+wBGyC9Z9IOcYmwwopLZYqn3cpTJXUp7Hq5sTJi6NDX4hhcbLURTsnnhW2e8D/Mj/tw--

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR Ingresando la siguiente clave:



hpTTQxVwF

<https://efirma.uaem.mx/moRepudio/t0DDUQy5asAoHG7vLuGi5Q5AaLTokDSm>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: L.F. Thelma Lievanos Campos

Título de la tesis: "Potencial antiviral de nanopartículas cargadas con nitazoxanida"

Grado a obtener:

☒ Maestría en Farmacia
☐ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dr. Luis Manuel Orozco Castellanos

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Sí, se aprueba tal como se presenta
☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-Firma UAEM
**Dr. Luis Manuel Orozco
Castellanos**

[16/06/2026]
Fecha



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio C, Tercer piso,
Facultad de Farmacia, Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 7986 / posgrado_ff@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LUIS MANUEL OROZCO CASTELLANOS | Fecha:2026-06-16 16:50:13 | FIRMANTE

DV81YeUN3e1KBfK7NsVEkTmM4nKbnQPXc5ySTLYXURyY4CxUkc1OaR0pOmQbm1RfADrmj+eg0MSdXTnGsZ16VXTVwY9ziS0YSDYDf00SiXoFXQKM/di5vVVad3slixiztX;
WTZS2FpRXQWW37toW+bMEY8SMpE2ekuJMWcHqQlOmfaKo7h1sgqPJRfOrKvVWE/8dkF+ZZlc8wS9vf3DqBHEWzfVxA3gc9BGzbdMoo2P6GxeUCuUL0yWRXIESeFKxa2D116
B3KC0MgRk1Bq5in6st2thyHe3sp5by+Sa+s0FMNW3hdqMstB2JkogO+4KgkOGLBCgyfBCFOlkPMow==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



Xqc7Hhn8l

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/fZvrtbzRLBsz2XCspbVqu9TQev3pAb7>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS



FACULTAD DE FARMACIA

**VOTO APROBATORIO
PROGRAMA DE POSGRADO EN FARMACIA
FACULTAD DE FARMACIA DE LA UAEM**

Nombre del alumno: L.F. Thelma Lievanos Campos

Título de la tesis: "Potencial antiviral de nanopartículas cargadas con nitazoxanida"

Grado a obtener:

☒ Maestría en Farmacia
☐ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: Dra. María Crystal Columba Palomares

La tesis fue leída y se le hicieron las observaciones pertinentes, de tal forma que mi decisión es:

La tesis:

☒ Sí, se aprueba tal como se presenta
☐ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

e-Firma UAEM

**Dra. María Crystal Columba
Palomares**

[16/06/2026]

Fecha



Av. Universidad 1001 Col. Chamilpa, Cuernavaca Morelos, México, 62209, Edificio C, Tercer piso,
Facultad de Farmacia, Tel. (777) 329 701 1, 329 70, 00, Ext. 7986 / posgrado_ff@uaem.mx

UAEM
RECTORÍA
2023-2029



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento con firma electrónica UAEM, soportada por el certificado vigente a la fecha de su elaboración y con efectos plenos de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS PUBLICADOS en el ÓRGANO INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

MARIA CRYSTAL COLUMBA PALOMARES | Fecha: 2025-06-16 20:17:09 | FIRMANTE

A/7VUWHaET9FB118oqM4jISFg+AL5eKvgp9qPHuaXez1CYY+jynY6NPCaROeEuWC0d2oITR1lp2JhZJ9FuopxxkIZ8JUrfTLatp5RbwSTFsb73Elo8C+br0yllh8HTsnAX/95mj1Do1kPWjShjJaDEPmZ1kczYynli/MkUEo7qsO3/MTqEgmqRuFvk5fIcAeWCYrp/QALx+9yJhQZxr8+xYihKBZJcMssQMbEgvLR7YnHMeoLYBFKXZ1xHy/Tka/voatZiswvs2LEhgXyumBsMMJqIzr3H+/chAmDY54NSF59LJ3FIVQv7ZghIicRZXHcoPgpYHXKTKBKYGSmmg--

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o
escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



17U8qAJdP

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/TTNIV6GthJKGgpx2CQrz5WwpouCzFjIt>



UAEM
RECTORÍA
2023-2029