UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE FARMACIA

EVALUACIÓN DE LA BIODISPONIBILIDAD RELATIVA DE UNA FORMULACIÓN NANOPARTICULADA DE NITAZOXANIDA UTILIZANDO UN MODELO MURINO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

MAESTRA EN FARMACIA

PRESENTA

L.F. ZAIRA AIDEE HERNÁNDEZ ACEVES

Director de tesis: Dr. Julio César Rivera Leyva

Codirector: Dr. Jesús Rivera Islas

Cuernavaca, Morelos. Junio 2025

Este trabajo de tesis se realizó, contando con un financiamiento de la SECIHTI, beca de maestría, (CVU 1264202). Además de contar con el apoyo del proyecto Ciencia de Frontera 2019 No. 1046617. El desarrollo de este proyectó fue realizado en el Laboratorio 4 de la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, bajo la dirección del Dr. Julio César Rivera Leyva y el Dr. Jesús Rivera Islas.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos por brindarme la formación académica.

Al comité tutoral integrado por Dr. Julio César Rivera Leyva, Dr. Jesús Rivera Islas, Dra. Adriana Valladares Méndez y la Dra. María Crystal Columba Palomares por las observaciones que contribuyeron a mejorar este proyecto.

Especialmente al Dr. Jesús Rivera Islas y al Dr. Julio César Rivera Leyva por todo el apoyo brindado, el conocimiento trasmitido, sus comentarios y haber hecho posible la realización de este proyecto

DEDICATORIAS

A Dios, por todas las bendiciones recibidas y permitirme llegar a este momento de la vida, tanto profesional como personalmente.

A mi madre por todo el apoyo recibido desde siempre.

A mi esposo, Juan Carlos, por su amor incondicional, sus palabras de aliento, abrazos y apoyo en cada aspecto de mi vida. ¡Te amo!

A mi pequeña hija, Enya Sophía, a quien agradezco cada sonrisa brindada en mis momentos de más cansancio, sonrisa por la cual cada día tengo más ganas de avanzar.

A los doctores Rivera, (Julio y Jesús) por cada regaño, palabra de aliento, más regaños, más motivación y sobre todo por la confianza depositada en mi en este periodo con ellos.

A mis amigos de la Facultad de Farmacia, por las vivencias y gratas aventuras que tuvimos.

A mí misma, porque aun cuando dudé muchas veces, pude hacerlo…

¡GRACIAS!

Índice

I. INTRODUCCIÓN 10
II. MARCO TEÓRICO 12
2.1 Virus de Ácido ribonucleico (ARN) 12
2.2 Enfermedades respiratorias virales 12
2.2.1 Covid-19 13
2.2.2 Virus sincitial 17
2.2.3. Influenza 20
2.3 Hepatitis virales 23
2.3.1. Hepatitis B 23
2.3.2 Hepatitis C 26
2.4 Reposicionamiento de fármacos 29
2.5 Nitazoxanida 30
2.5.1 Farmacocinética 31
2.5.2 Farmacodinamia 33
2.6 Formulaciones comerciales de nitazoxanida 33
2.7 Metodologías de bioevaluación de nitazoxanida 34
2.8. Nanopartículas de nitazoxanida 34
III. JUSTIFICACIÓN 36
IV. HIPÓTESIS 37
V. OBJETIVOS 37
5.1 Objetivo general 37
5.2 Objetivos particulares 38
VI. MATERIALES Y EQUIPOS 38
6.1. Materia prima utilizada 38
6.2. Reactivos y material utilizado 38
6.3 Equipos 39
6.4. Software 39
VII. METODOLOGÍA 40
7.1. Método analítico 40
7.1.1. Soluciones 40
7.1.2. Curva de calibración 41

7.1.3. Condiciones cromatográficas del método de cuantificación 41
7.1.4. Validación del método analítico 42
7.1.5. Estudio farmacocinético de NTZ 44
VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN 46
8.1 Desarrollo del método analítico 46
8.2. Validación del método analítico 50
8.3. Evaluación farmacocinética de NTZ 55
IX. CONCLUSIONES 60
X. PERSPECTIVAS 62
XI. REFERENCIAS 63
XII. ANEXOS 67
12.1. Comprobación de identidad de NFX 67

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Epidemias de la historia. Cronología de las principales epidemias de la humanidad con detalle de número de defunciones ocasionadas. [3] ____ 13
Figura 2. Muertes diarias registradas por COVID-19 [7] ____ 14
Figura 3. Cronología del Covid-19 en México. ____ 15
Figura 4. Curva epidemiológica de defunciones confirmadas por COVID-19 2020-2023 [9] ____ 16
Figura 5. Mecanismo patogénico del SARS-CoV-2.[10] ____ 17
Figura 6. Mecanismo patogénico del VSR.[12] ____ 19
Figura 7. Mecanismo patogénico de la influenza tipo A[26] ____ 22
Figura 8. Mecanismo patogénico del VHB[42] ____ 26
Figura 9. Mecanismo patogénico del VHC [53] ____ 28
Figura 10. Estructura química de Nitazoxanida [59] ____ 31
Figura 11. Metabolismo de nitazoxanida en plasma [35] ____ 32
Figura 12. Cromatograma típico de NTZ y TIZ con condiciones de flujo isocrático ____ 47
Figura 13. Cromatograma típico de NTZ y TIZ con condiciones de flujo gradiente lineal ____ 47
Figura 14. Cromatograma típico de NTZ y TIZ, columna C_{18} ____ 48
Figura 15. Cromatograma típico de NTZ y TIZ, columna C_{18}, *flujo gradiente lineal a 1mL/min Bac:ACN 90:10 (v/v)* ____ 48
Figura 16. Estructuras de Nifuroxazida (A), Nitazoxanida (B), Tizoxanida (C). ____ 48
Figura 17. Cromatograma típico de identificación de NFX. ____ 49
Figura 18. Cromatograma típico de identificación de NFX, NTZ y TIZ. ____ 50
Figura 19. Cromatograma típico correspondiente al blanco de plasma humano ____ 50
Figura 20. Cromatograma correspondiente a las señales analíticas de NFX (9.383 min), NTZ (13.063 min) y TIZ (14.440 min) en plasma humano ____ 51
Figura 21. Cromatograma comparativo del método en solución y método en plasma. ____ 51
Figura 22. Cromatograma típico de identificación de NFX y TIZ. ____ 52
Figura 23. Gráfica de la linealidad del método analítico, representativa de 2 días de trabajo ____ 53
Figura 24. Perfil farmacocinético vía oral de administración de NTZ sin formulación a dosis 7.5 y 15 mg/Kg. ____ 55
Figura 25. Perfil farmacocinético vía oral de administración de NTZ formulada con dosis de 6 mg/Kg 56

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características fisicoquímicas de Nitazoxanida [57] 31
Tabla 2. Tabla de trabajo para realizar la curva de calibración de tizoxanida 41
Tabla 3. Condiciones cromatográficas evaluadas 42
Tabla 4. Tabla de trabajo para el análisis de los puntos control 43
Tabla 5. Parámetros cromatográficos 52
Tabla 6. Resultados de la linealidad del método analítico 53
Tabla 7. Precisión del método de cuantificación 54
Tabla 8. Reproducibilidad del método de cuantificación 54
Tabla 9. Porcentaje de recobro para la evaluación de la exactitud 55
Tabla 10. Modelaje no compartimental de las tres administraciones vía oral 58
Tabla 11. Modelaje compartimental de las tres administraciones vía oral 58

ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
%CC	Porcentaje de capacidad de carga
%EE	Porcentaje de eficiencia de encapsulación
µg	Microgramos
µg/mL	Microgramos por mililitro
ABC	Área bajo la curva
ACN	Acetonitrilo
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AIC	Criterio de Akaike
ARN	Ácido ribonucleico
b_0	Pendiente
b_1	Ordenada de origen
BD	Biodisponibilidad
BDr	Biodisponibilidad relativa
Cl/F	Depuración aparente total
CLAR	Cromatografía Líquida de Alta Resolución
C_{max}	Concentración plasmática máxima
COFEPRIS	Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios
CVU	Curriculum vitae único
DMF	Dimetil Formamida
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DoE	Diseño experimental
D_{ref}	Dosis de referencia
FDA	Food and Drug Administration
GTIZ	Glucurónido de tizoxanida
GVMBFDA	Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA
HB	Hepatitis B
HBC	Hepatitis B crónica
HC	Hepatitis C
HCC	Hepatitis C Crónica
IC	Intervalo de confianza
INER	Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias
K_a	Constante de absorción
K_e	Constante de eliminación
LC	Límite de cuantificación

Abreviatura	Definición
LD	Límite de detección
MERS-CoV	Coronavirus del síndrome respiratorio del medio oriente
mg/ Kg	miligramos por kilogramo
min	Minutos
mL	Mililitro
n	Número de individuos
nCov-2019	Nuevo coronavirus 2019
NFX	Nifuroxazida
nm	Nanómetros
NP's	Nanopartículas
NTZ	Nitazoxanida
OMS	Organización Mundial de la Salud
PCL	Policaprolactona
PDI	Índice de polidispersión
PNP's	Nanopartículas poliméricas
PVA	Alcohol polivinílico
RVS	Respuesta viral sostenida
S	Desviación estándar
SARS-CoV-2	Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo
SCB	Sistema de Clasificación Biofarmacéutico
SEHCITI	Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación
$t_{1/2e}$	Tiempo de vida media de eliminación
$t_{1/2a}$	Tiempo de vida media de absorción
TIZ	Tizoxanida
T_{max}	Tiempo para alcanzar la Cmax
TMR	Tiempo medio de residencia
UAEM	Universidad Autónoma del estado de Morelos
UGT	UDP-glucuronosiltransferasa
UI	Unidades Internacionales
V_d/F	Volumen de distribución aparente
VHB	Virus de Hepatitis B
VHC	Virus de Hepatitis C
VIH	Virus de inmunodeficiencia Humana
VSR	Virus sincitial respiratorio
$\overline{X}$	Promedio

I. INTRODUCCIÓN

La Nitazoxanida (NTZ) es un medicamento aprobado por la Food And Drug Administration (FDA) para su uso antiparasitario, en años recientes, algunos estudios han demostrado que su metabolito activo, Tizoxanida (TIZ), presenta actividad antiviral contra virus como hepatitis B (HB), hepatitis C (HC), Virus de inmunodeficiencia humana (VIH), dengue, fiebre amarilla, encefalitis japonesa y virus respiratorios como Covid-19, Virus Sincitial Respiratorio (VSR) e Influenza. Sin embargo, su administración oral se ve limitada por su baja biodisponibilidad, atribuida principalmente a su baja solubilidad en agua y su escasa absorción gastrointestinal. Esta limitación representa un desafío importante en la eficacia terapéutica del fármaco, ya que se requiere administrar dosis altas para alcanzar concentraciones plasmáticas adecuadas que lleven a cabo su acción farmacológica, lo que reduce su efectividad en el tratamiento de enfermedades.

El desarrollo de formulaciones innovadoras que mejoren la biodisponibilidad (BD) de nitazoxanida es crucial para optimizar su perfil terapéutico. Una de las estrategias más prometedoras en este campo es la formulación de la NTZ en nanopartículas (NPs), las cuales, gracias a su pequeño tamaño, presentan propiedades que pueden mejorar la disolución del fármaco, facilitar su absorción a nivel intestinal y, en consecuencia, incrementar su biodisponibilidad. La formulación nanoparticulada ofrece ventajas como una mayor superficie de contacto con los fluidos biológicos y una mejora en la penetración a través de las membranas celulares, lo que podría potenciar la eficacia del fármaco y reducir la dosis necesaria.

El objetivo de este trabajo es evaluar la biodisponibilidad relativa (BDr) de una formulación nanoparticulada de nitazoxanida en comparación con el fármaco sin formulación, utilizando un modelo murino (rata Wistar). Para ello, se desarrollará y validará un método analítico confiable para cuantificar la concentración plasmática de tizoxanida, metabolito activo de nitazoxanida, que es esencial para la caracterización de la farmacocinética de ambas formulaciones.

El primer paso es el desarrollo de un método analítico adecuado para la cuantificación de tizoxanida (TIZ) en plasma, debido a su metabolismo, la NTZ no es cuantificable en plasma, por lo que se cuantifica al metabolito activo, quien además posee el efecto terapéutico viral.

Este paso es fundamental para la obtención de datos confiables sobre las concentraciones plasmáticas a lo largo del tiempo, tanto para la nitazoxanida sin formulación como para la nanoparticulada. Posteriormente, se procede a la validación del método, asegurando su exactitud, precisión, linealidad y sensibilidad para cumplir con los estándares regulatorios y científicos.

Una vez validado el método, se procede a evaluar la farmacocinética de NTZ no formulada en un modelo de rata Wistar. Este modelo permite obtener datos fundamentales sobre los parámetros farmacocinéticos básicos, como la concentración máxima en plasma (C_{max}), el tiempo hasta alcanzar la concentración máxima (T_{max}) y el área bajo la curva (ABC). Posteriormente, se evaluará la farmacocinética de la formulación nanoparticulada en el mismo modelo murino, para comparar la BDr de ambas administraciones.

El modelaje compartimental de los datos obtenidos será una herramienta clave para comprender como llega el fármaco a la circulación sistémica, dependiendo de la forma de administración, y realizar una comparación cuantitativa de los parámetros farmacocinéticos entre ambas formas de administración. Este enfoque permite determinar de manera precisa la biodisponibilidad relativa de la formulación nanoparticulada en comparación con nitazoxanida sin formulación.

La importancia de este proyecto radica en la posibilidad de mejorar la terapia con nitazoxanida, a través de una formulación que incremente su biodisponibilidad. Si se demuestra que la formulación nanoparticulada incrementa significativamente la concentración del fármaco en sangre, esto podría traducirse en una mayor eficacia terapéutica, menores dosis requeridas y mejores resultados en la administración para los nuevos usos terapéuticos del fármaco. De esta manera, este trabajo contribuye al avance en el desarrollo de formulaciones más eficientes de nitazoxanida, lo cual no solo tiene implicaciones para la mejora de su biodisponibilidad y eficacia, sino también para el diseño de nuevas formulaciones de fármacos.

II. MARCO TEÓRICO

2.1 Virus de Ácido ribonucleico (ARN)

Existen diversos virus que utilizan al ARN como medio de replicación, este tipo de virus, constituyen el grupo de entes intracelulares más extenso en su tipo. Estos pueden estar compuestos de ARN de doble hélice, segmentado o de una sola cadena.[1]

Tienen presencia y distribución en animales, plantas y bacterias, además de causar diversas enfermedades virales en los humanos, entre ellas la hepatitis, fiebre amarilla, dengue, virus respiratorios, o las encefalitis virales.

2.2 Enfermedades respiratorias virales

Las enfermedades respiratorias representan una causa primordial de mortalidad y morbilidad en el mundo, tomando en cuenta todas sus clasificaciones (agudas, crónicas, infecciosas y no infecciosas). Este hecho puede intuirse al observar que a nivel mundial varias enfermedades respiratorias aparecen entre las primeras diez causas muerte.[2]

Las enfermedades virales han estado presentes a lo largo de la historia; sin embargo, estas han tomado mayor énfasis en su investigación por la pandemia de Covid-19 que inició en el 2020. Hace poco más de 10 años, México se declaraba en epidemia por el brote del virus de la influenza AH1N1, según datos declarados, la influenza tuvo un saldo de 20 millones de casos de infección en el mundo y más de 9 mil personas fallecidas, con un saldo nacional de 72,468 infectados y 1,203 muertes, según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS).[3]

El Coronavirus 2 del Síndrome Respiratorio Agudo Severo (SARS-COV-2), es el agente causal responsable de la enfermedad denominada Covid-19, este se reportó por primera vez en noviembre del año 2019 en la ciudad de Wuhan China, afectando en sectores económicos, educativos, ambientales, científicos, entre otros.

En la historia de la humanidad, existen registros de distintas epidemias, las cuales han causado diversas complicaciones económicas, sociales y en múltiples ocasiones, cuadros clínicos graves e incluso, defunciones, algunos de los casos de mayor impacto en la historia, se representan en la Figura 1, donde se pueden observar las fechas de estas epidemias, así como su grado de impacto con relación a las defunciones generadas.

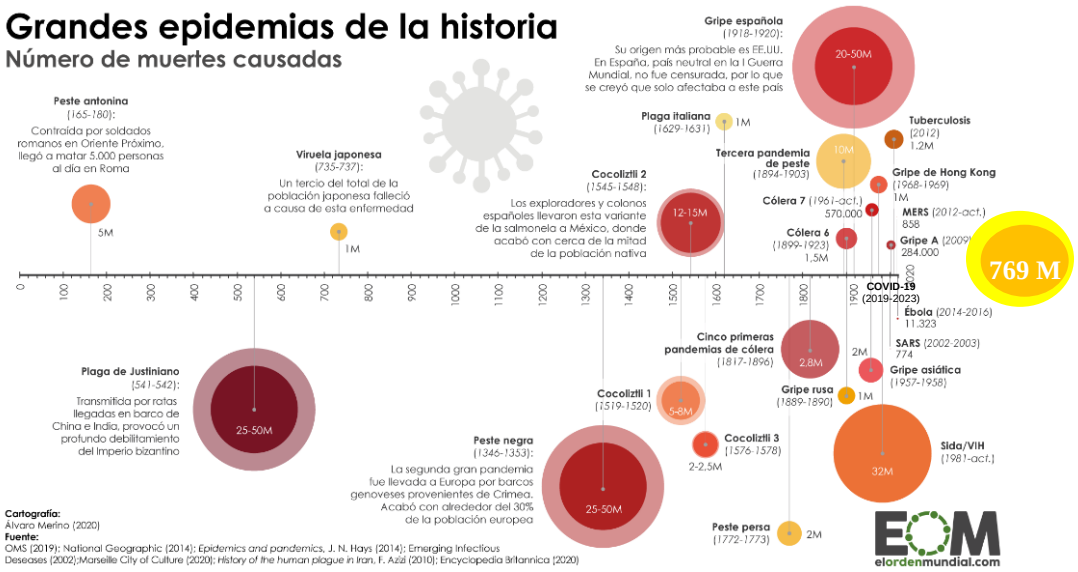


Figura 1. Epidemias de la historia. Cronología de las principales epidemias de la humanidad con detalle de número de defunciones ocasionadas. [3]

2.2.1 Covid-19

Los virus pertenecientes a la familia de los coronavirus pueden causar desde resfriados comunes hasta afecciones respiratorias graves. Estos virus se transmiten tanto entre humanos como entre animales. En ocasiones, los coronavirus que afectan a los animales sufren mutaciones y tienen la capacidad de transmitirse a los seres humanos, lo que da lugar a una nueva cepa capaz de generar enfermedades respiratorias graves en las personas.

La transmisión del virus ocurre cuando una persona infectada tose o estornuda, liberando partículas en el aire que pueden ser inhaladas por otros. También puede propagarse por contacto directo, como al estrechar la mano de alguien enfermo, tocar objetos y/o superficies contaminadas y posteriormente llevarse las manos a la boca, ojos o nariz sin haberse lavado las manos previamente. Los síntomas más comunes incluyen síntomas respiratorios como tos, estornudos, malestar general, además de dolor de cabeza, fiebre y, en casos graves, dificultad para respirar.[4]

En diciembre de 2019, en Wuhan, China, se reportaron casos de neumonía de etiología desconocida, al realizarse las investigaciones pertinentes, se observó los pacientes entrevistados, similitudes epidemiológicas, estas debido a que todos los entrevistados habían tenido contacto previo en un mercado mayorista de mariscos, en los que también se vendían al público diversas especies de animales salvajes así como aves de corral vivas..[4]

A través de la técnica de reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real y cultivo viral de muestras de lavado broncoalveolar de tres pacientes, se identificó un nuevo virus, que fue denominado "nuevo coronavirus 2019" (nCoV-2019). Basado en sus particularidades genéticas, este virus se clasificó dentro del género *Betacoronavirus Sarbecovirus*, confirmando también que poseía efectos citopáticos al observar cambios estructurales en las células hospederas. El análisis completo del genoma del virus mostró que nCoV-19 comparte un 96% de similitud con el genoma de un coronavirus encontrado en murciélagos.[5-6]

El 30 de enero de 2020, la Organización Mundial de la Salud (OMS) declaró la infección como una situación de emergencia mundial de salud pública, y el 11 de febrero, la enfermedad recibió el nombre de Covid-19. Tras el análisis genómico de las secuencias, el virus fue denominado SARS-CoV-2.[6]

2.2.1.1. Epidemiología mundial

El Covid-19, ha provocado más de 600 millones de casos a nivel mundial y más de 6.8 millones de muertes, según los datos recopilados por la Universidad Johns Hopkins, que ha estado monitoreando la situación del virus desde el inicio de la pandemia. Entre los países con más casos reportados, Estados Unidos ocupó el primer lugar con más de 100 millones de contagios, seguido de India, Francia, Alemania y Brasil. En cuanto a las muertes, Estados Unidos también lidera la lista con más de un millón de fallecimientos, seguido por Brasil, India, Rusia y México.[7]

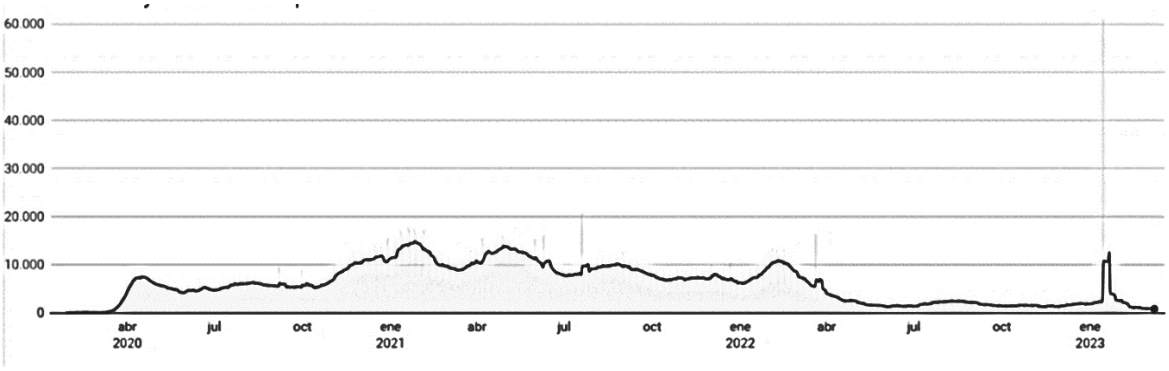
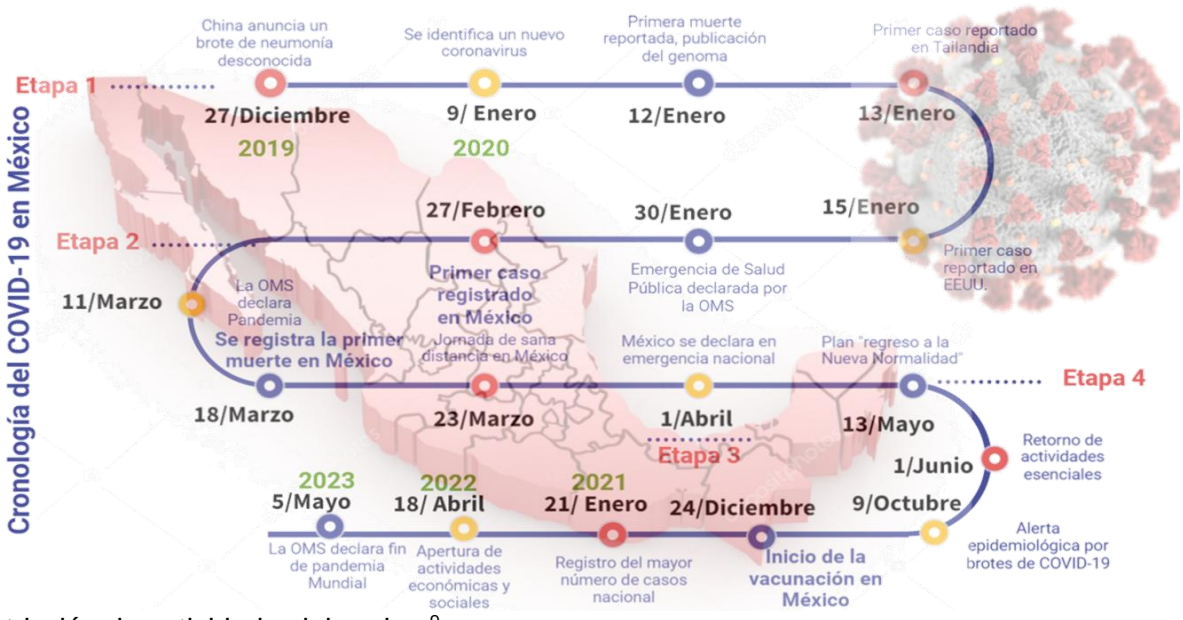


Figura 2. Muertes diarias registradas por COVID-19 a nivel mundial [7]

2.2.1.2 Epidemiología del COVID-19 en México

Como se observa en la figura 4, el inicio de la pandemia se marca en diciembre de 2019, y es hasta el 27 de febrero del 2020 que se registra en México el primer caso de Covid-19, este caso fue documentado en un paciente en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) en la Ciudad de México, reportándose un viaje previo de este a Italia. El primer fallecimiento reportado en el país debido a la enfermedad se registró el 18 de marzo de ese mismo año. El 23 de marzo, con 475 casos confirmados, se declaró la Fase 2 de "contingencia sanitaria", implementando medidas más estrictas de distanciamiento social, confinamiento y



restricción de actividades laborales.[9]

Figura 3. Cronología del Covid-19 en México. (imagen de autoría propia)

Dentro de la fase 3 se implementó la Jornada Nacional de Sana Distancia con posterior regreso a actividades esenciales, denominándose “Nueva normalidad”; este suceso se inició el primero de junio del mismo año. En México el proceso de vacunación dio inicio el día 24 de diciembre de 2020, priorizando su administración, comenzando con los grupos poblacionales de mayor riesgo, de esta manera la jerarquía en la administración comenzó con personal de salud de primera línea (médicos, enfermeras y personal en contacto directo), siguiendo con los adultos mayores y finalmente se administró a la población restante estratificada de acuerdo con disponibilidad y factores de riesgo de cada grupo etario. Esta estrategia se mantiene actualmente con la aplicación de refuerzos y esquemas iniciales a la población rezagada. [9]

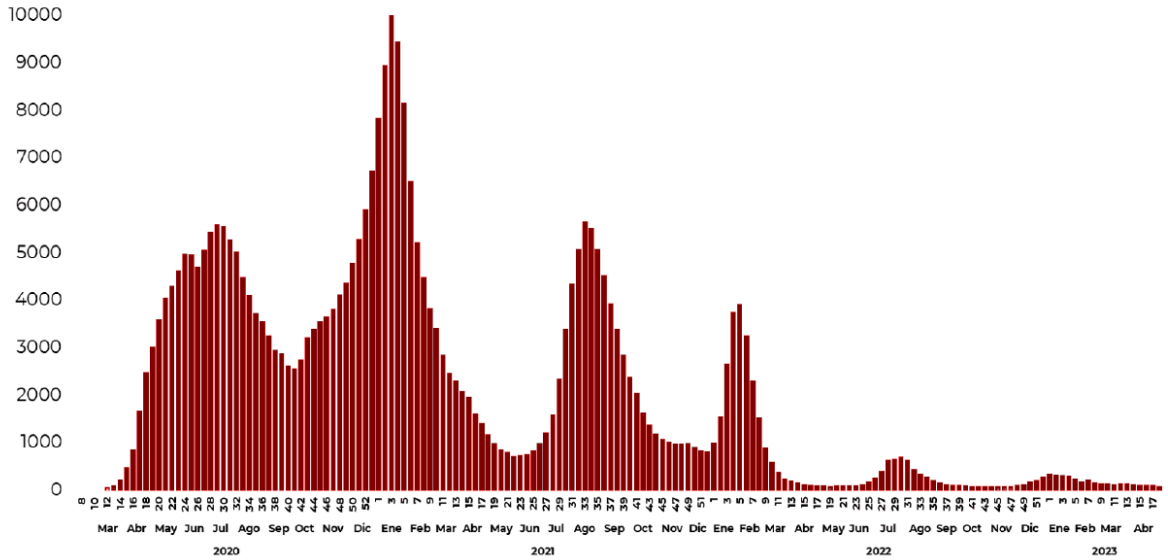


Figura 4. Curva epidemiológica de defunciones confirmadas por COVID-19 2020-2023 [9]

2.2.1.3 Tratamiento de emergencia administrado en México

En cuanto a la implementación de tratamientos médicos, el uso de tratamientos específicos, dentro del país, contra el virus SARS-CoV-2 inició en el año 2022, posterior a la aprobación del uso de Paxlovid® (Nirmatrelvir/Ritonavir) y Avifavir como tratamientos de urgencia, aprobado por la Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS) y dirigido a grupos de riesgo para Covid-19. [9]

2.2.1.4 Mecanismo patogénico del SARS-CoV-2.

La figura 5, muestra el proceso de infección por SARS-CoV-2, este comienza al momento de la entrada del virión a la célula huésped vía endocitosis, una vez realizado este proceso, se libera el material genético del virus en el citoplasma celular y se traduce en proteínas que generarán otros complejos que codificarán para la producción de proteínas estructurales y proteínas accesorias. Todas estas proteínas, serán ensambladas para formar las nuevas partículas víricas y posteriormente ser liberadas en las células infectadas.[10]

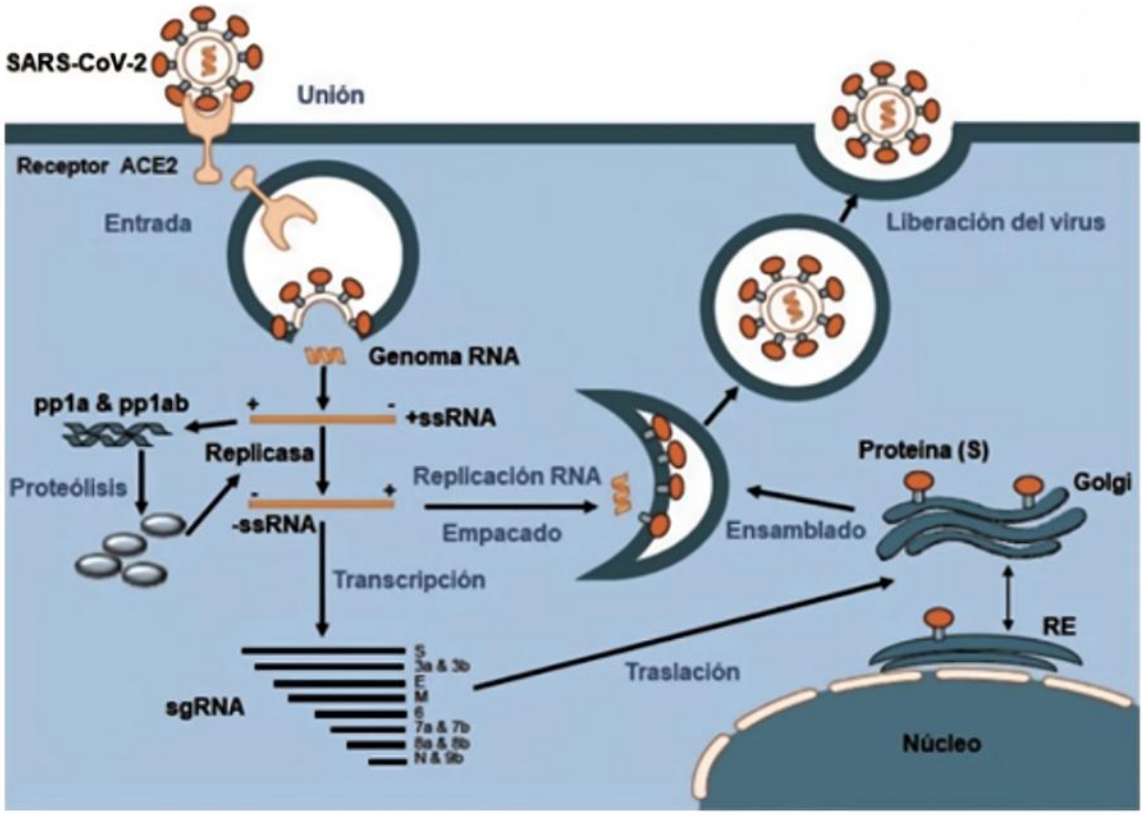


Figura 5. Mecanismo patogénico del SARS-CoV-2.[10]

2.2.2 Virus sincitial

El virus respiratorio sincitial (VSR) es un agente causal que promueve una de las múltiples enfermedades respiratorias que afectan a la población. EL VSR tiene una propagación similar al virus del resfriado, dándose la infección de persona a persona. Ingresa al organismo a través mucosas (boca, nariz y ojos), generalmente por contacto con saliva infectada así como por secreciones nasales. La temporada invernal, generalmente se asocia con el incremento de casos de esta enfermedad, comenzando a fines del otoño y frecuentemente hasta principios de los meses de la primavera. [11]

2.2.2.1 Epidemiología del virus sincitial

El VSR infecta en promedio al 50% de los niños de un año de edad y para los dos años, casi todos han estado expuestos a él. Un estimado de entre el 2% y 3% de las infecciones iniciales requieren hospitalización debido a su severidad. Debido a ello, se considera la principal causa de hospitalización infantil por infecciones respiratorias agudas bajas y un factor clave en el aumento de la demanda de atención médica cada temporada invernal.[11]

En adultos, la detección del VSR se debe en gran medida del desarrollo de métodos de diagnóstico de laboratorio, ya que la eliminación del virus en las secreciones respiratorias es menor en comparación con lactantes y niños pequeños. Durante la década de 1980, se comenzó a identificar la implicación del VSR en infecciones respiratorias bajas en adultos, comparándola con la influenza mediante técnicas serológicas, aislamiento viral e inmunofluorescencia. Los avances en diagnóstico molecular han permitido confirmar su presencia en diversas afecciones respiratorias en adultos, pacientes inmunocomprometidos y personas con factores de riesgo, en quienes la infección puede ser más grave.[11-12]

2.2.2.2. Tratamiento

Actualmente, no existen antivirales específicos con eficacia clínica comprobada. La ribavirina ha sido utilizada en casos graves en niños, aunque con resultados variables y efectos secundarios significativos, sumado a que el uso de antivirales, broncodilatadores y corticoides sigue siendo controvertido debido a su relativa utilidad.[13] El tratamiento principal se basa en mantener despejadas las vías respiratorias superiores mediante aseo nasal, asegurar una hidratación adecuada y una alimentación que el paciente pueda tolerar en los primeros días de la enfermedad. En casos de gravedad, y con dificultad respiratoria evidente, es necesario monitorear la saturación de oxígeno y administrar oxígeno si es necesario.[14]

El desarrollo de una vacuna contra el virus enfrenta varios desafíos. Uno de ellos es que la infección ocurre en los primeros tres meses de vida, cuando el sistema inmunológico aún es inmaduro. Además, los anticuerpos maternos presentes a esa edad podrían interferir con la respuesta inmunitaria a una vacuna atenuada. Aunque existen múltiples candidatos en distintas etapas de investigación, pocos han alcanzado la fase clínica III. Una de las estrategias en evaluación es la vacunación de mujeres embarazadas, con el objetivo de transferir anticuerpos al bebé y brindarle protección durante los primeros seis meses de vida.[14-15]

2.2.2.3 Mecanismo patogénico del VSR

En la figura 6, se muestra el mecanismo de infección del virus, además de la progresión de la respuesta inmunológica. Una vez que el virus entra en contacto con el huésped, se desencadena (figura 6,1a) la respuesta innata en los macrófagos, así como en las células dendríticas presentes en la mucosa, esta acción se observa en los primeros de 3 días, observándose también la producción de interferón tipo I α/β, además de promoverse también la activación de factores inductores de la producción de citoquinas proinflamatorias; posteriormente, (figura 6, 1b) las células dendríticas que se encuentran en la vía aérea transportan antígenos asociados al VSR a través de sitios asociados a mucosas(figura 6, 2) el sistema inmune promueve la respuesta adaptativa específica (LT CD4, LT CD8 y LB) a partir del día siete. Todos estos procesos, permiten la eliminación de la infección, dejando también respuesta mediada por anticuerpos y células T que protegerán contra futuras reinfecciones. [12]

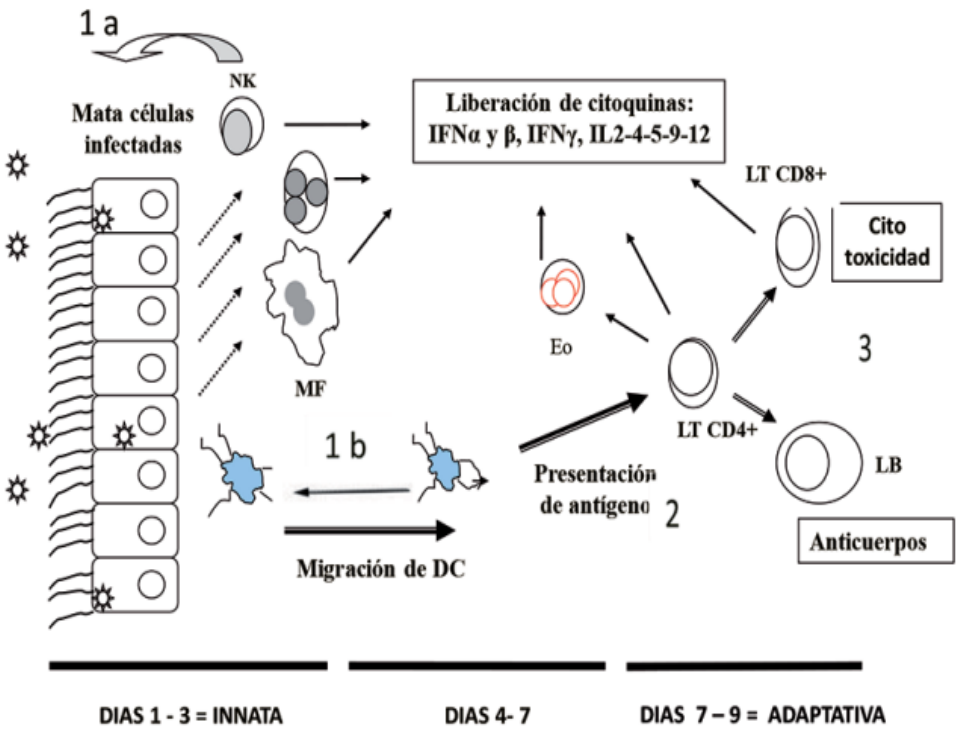


Figura 6. Mecanismo patogénico del VSR.[12]

2.2.3. Influenza

La influenza, es una enfermedad coloquialmente conocida como gripe, esta infección viral tiene efecto en las vías respiratorias superiores y también en las inferiores. Su clasificación es según el tipo de virus que afecta (serotipo A, B y C), es fácilmente contagiosa y tiene manifestación repentina. Entre los síntomas observados para esta enfermedad, se pueden incluir:

- Tos
- Dolor corporal
- Escalofríos
- Fiebre
- Dolor de garganta
- Sensación de fatiga extrema

El virus de la influenza puede propagarse durante cualquier temporada del año, teniendo mayor incidencia, como la mayoría de las enfermedades respiratorias, en invierno, mediante el contacto e interacción con una persona afectada. [16-17]

2.2.3.1. Epidemiología del virus de la Influenza

En el año 2009, la OMS declaró situación de pandemia debida a un nuevo virus influenza A catalogada como H1N1, la cual se reportó como origen porcino. El virus, se reportó de forma inicial en México, observando incidencia de casos de gripe en el mes de marzo, seis semanas después, se extendió por todo el mundo.[18]

Este virus tiene mayor transmisibilidad que las llamadas gripes estacionales, aunque su patogenicidad y virulencia son bajas. Los grupos poblacionales más afectados por la enfermedad son los niños, adolescentes y adultos menores de 30 años, mientras que la mortalidad se ha concentrado en personas entre 20 y 50 años. La pandemia generó dos olas epidémicas en los países con clima templado. La primera, que se desarrolló entre mediados de abril y agosto de 2009, afectó inicialmente a México y al país vecino, Estados Unidos, y luego se propagó a países Europeos, como España, Reino Unido, y asiáticos como Japón, además de otros países del hemisferio norte. En el inicio de la temporada invernal del hemisferio sur, llegó a los países de este, especialmente Nueva Zelanda Argentina, Chile, Australia y, donde concluyó entre septiembre y octubre.[19]

Las epidemias de influenza causan entre 36,000 y 50,000 muertes anuales en países como Estados Unidos, y afectan a todas las edades, siendo especialmente prevalentes entre niños menores de dos años y adultos mayores de 65 años.[20]

2.2.3.2 Tratamiento de la Influenza

Los medicamentos antivirales utilizados en el tratamiento y prevención de infecciones por el virus de la influenza se dividen en dos categorías: los fármacos derivados de amantadino como son amantadina y rimantidina, así como los inhibidores de la enzima neuraminidasa tales como oseltamivir y zanamivir. Los cuatro fármacos logran inducir la disminución de la sintomatología cuando estos se administran dentro de los primeros 2 días posteriores al inicio de la enfermedad. [21]

Estos medicamentos, inhiben la replicación del virus de la influenza A, pero no son efectivos contra el virus de la influenza B. Estos fármacos son administrados por vía oral. Cuando se administra en las primeras horas posteriores al inicio de los síntomas, pueden reducir la carga viral y disminuir la duración de la enfermedad. El tratamiento se recomienda durante cinco días, y su eficacia en la quimioprofilaxis alcanza entre el 70% y el 90%. Sin embargo, presentan efectos secundarios, como insomnio, alucinaciones y cefalea, que son más comunes en personas mayores. La rimantidina tiende a causar menos efectos adversos en el sistema nervioso central. No se recomienda su uso durante el embarazo debido a su potencial teratogénico. Se ha documentado resistencia viral a ambos fármacos, y desde 1965 se ha identificado resistencia a la amantadina. Las cepas del virus de la influenza AH1N1, circulantes desde 2009 son particularmente resistentes a ambos medicamentos.[22-23]

El uso de amantadina y rimantidina se recomienda en las siguientes situaciones: [24]

- Utilizarlo de forma complementaria de la vacunación en personas de alto riesgo, durante el período de dos semanas necesario para desarrollar anticuerpos.
- En individuos que no han sido vacunados contra la influenza, para reducir la transmisión del virus.
- En individuos inmunocomprometidos que puedan tener una respuesta de anticuerpos insuficiente a la vacuna.
- En personas con un riesgo elevado para quienes la vacuna contra la influenza está contraindicada.

Los fármacos inhibidores de la neuraminidasa, (zanamivir y oseltamivir), son efectivos contra los virus de la influenza en sus serotipos A y B, ya que bloquean el sitio activo de la neuraminidasa. Diversos ensayos clínicos, han mostrado que el oseltamivir tiende a disminuir las complicaciones generadas en las vías respiratorias bajas (como neumonía y bronquitis), disminuye la administración de antibióticos y las hospitalizaciones. Estos efectos han sido observados en grupos de mediano y alto riesgo.[25]

Los efectos secundarios de los inhibidores de la neuraminidasa incluyen posibles náuseas y vómitos, mientras que con zanamivir también se pueden presentar tos, mareos y en algunos casos particulares, diarrea. Se han reportado pocos efectos adversos en el sistema nervioso central.[26]

2.2.3.3. Mecanismo patogénico del virus de la influenza

Según la figura 7, el mecanismo patogénico del virus de la influenza se ve promovido debido a que la hemaglutinina reconoce al receptor celular, a través de los residuos de ácido siálico, esta acción permite la entrada del virus. Mientras tanto la neuraminidasa, es la enzima que se encarga de remover los residuos de ácido sálico, esta acción la hace necesaria para que las células infectadas puedan liberar el virus, así como también la liberación de los anticuerpos y el control de la infección. Así mismo se observa en la figura, la intervención de algunos medicamentos, inhibidores de la neuraminidasa que interfieren en el mecanismo de replicación viral, evitando así una correcta codificación y por tanto aumento de carga viral. [25-26]

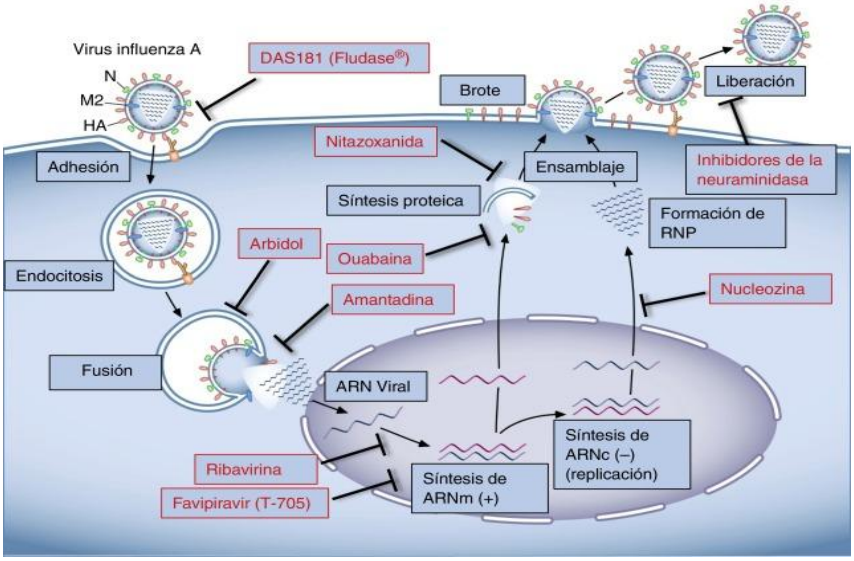


Figura 7. Mecanismo patogénico de la influenza tipo A[26]

2.3 Hepatitis virales

La hepatitis o inflamación del hígado puede tener diversas causas, tanto infecciosas como no infecciosas. Entre las causas infecciosas, la etiología viral es responsable de al menos la mitad de los casos a nivel mundial. Existen varios virus con afinidad específica por el tejido hepático, los cuales han sido denominados con letras del abecedario en el orden en que fueron descubiertos: A, B, C, D, E y G. Cada uno de estos virus no solo difiere en su estructura molecular, sino también en su forma de transmisión y en las manifestaciones clínicas que provoca. Aunque todos pueden generar una enfermedad aguda, únicamente los virus de la hepatitis B, C y D tienen la capacidad de causar una infección crónica.[27-28]

La sintomatología clínica de la hepatitis viral varía según la complejidad de la enfermedad y el virus causal. La forma aguda de la enfermedad puede ser asintomática y resolverse espontáneamente en un período de 4 a 8 semanas, sin necesidad de tratamiento, siendo más común en casos de hepatitis A. Las infeccionesrelacionadas al virus de la hepatitis B (VHB) y el virus de la hepatitis C (VHC) pueden evolucionar a una forma crónica, caracterizada por una persistencia de al menos 6 meses. En algunos pacientes, esta condición puede derivar en complicaciones graves, como fibrosis, cirrosis y cáncer hepático. [28]

A nivel mundial, las hepatitis virales representan un importante problema de salud pública, ya que se estima que cada año provocan la muerte de aproximadamente 1.4 millones de personas debido a infecciones agudas, cáncer hepático y cirrosis relacionadas con estos virus. Del total de muertes relacionadas a hepatitis virales, el VHB tiene el 47 %, VHC el 48 %, mientras que el VHA, VHD y VHE suman el 5 % restante.[29]

2.3.1. Hepatitis B

El VHB pertenece a la familia *Hepadnaviridae*, dentro del género *Orthohepadnavirus*. Su virión completo tiene un diámetro aproximado de 42 nm. Posee una doble envoltura, donde la cápside está compuesta por lipoproteínas en las que se insertan antígenos de superficie, denominados S, M y L.[30]

El VHB puede permanecer viable fuera del cuerpo humano por al menos 7 días, conservando su capacidad de infección si entra en contacto con una persona no vacunada. Su período de incubación varía entre 30 y 180 días, y puede detectarse en el organismo entre 30 y 60 días después de la infección. En algunos casos, el virus puede persistir y evolucionar hacia una

hepatitis B crónica (HBC), especialmente cuando la transmisión ocurre durante la lactancia o en la infancia. La evolución de la enfermedad aguda a su forma crónica se determina por factores como: la edad, el estado inmune (posible coinfección con VIH u otras enfermedades que afecten la inmunidad), el uso de inmunosupresores, y hábitos como la ingesta de alcohol. [31]

En los adultos, la infección aguda por el virus de la hepatitis B se resuelve en un estimado del 90% de los casos, mientras que solo el 10 % desarrolla enfermedad crónica. En contraste, en los niños, especialmente a una edad temprana, aproximadamente el 50% desarrolla hepatitis crónica. En los recién nacidos de madres infectadas, hasta un 90% puede evolucionar a casos crónicos si no se implementan medidas preventivas adecuadas.[31-32]

La infección crónica por VHB puede avanzar hacia un daño hepático progresivo en el 15 a 40% de los casos. Esta progresión puede llevar al desarrollo de cirrosis, insuficiencia hepática y/o hepatocarcinoma. En estos casos, se requiere tratamiento médico y, en algunos casos, un trasplante de hígado. Si no se trata adecuadamente, esta condición puede ser fatal.

Las formas más comunes de transmisión del virus de la hepatitis B incluyen: [32]

- Contacto sexual con una persona infectada.
- Vía parenteral, principalmente entre personas que comparten agujas, ya sea de forma consciente o inconsciente.
- Exposición de las mucosas a fluidos corporales.
- Transmisión materno-infantil durante el parto.

2.3.1.1 Epidemiología de la enfermedad en México

En el lapso del año 2010 al 2020, fue reportado un estimado de 7,745 casos anuales de HB en México, observándose una disminución de la incidencia de casos entre 2010 y 2017. Los estados con las tasas más altas de incidencia en 2020 fueron Quintana Roo, Chihuahua y Tamaulipas. En cuanto al género, la prevalencia fue mayor en hombres con un 75.3%, mientras que las mujeres representaron el 24.7%. En términos de grupos de edad, las tasas de incidencia más altas se observaron en grupos etarios de 25-44 años, seguidos por los de 50-59 años. [33]

2.3.1.2 Tratamiento

Actualmente, existen siete medicamentos aprobados para el tratamiento de la infección crónica por VHB los cuales son: lamivudina, telbivudina y tenofovir, interferón alfa-2b, adefovir, entecavir, peginterferón alfa-2a.

Sin embargo, los medicamentos de elección en la práctica clínica son el peginterferón (PEG-IFN) alfa-2a, el entecavir y el tenofovir, esto por tener un perfil de resistencia favorable en pacientes con HBC, así como una mayor eficacia y tolerabilidad lo que permite a su vez mejor adherencia a los tratamientos.

El objetivo principal del tratamiento en pacientes con HBC es mejorar la calidad de vida de los pacientes, así como la supervivencia, a través de la prevención de casos particulares de la enfermedad que llevan a descompensación, cirrosis hepática, hepatocarcinoma y en casos más graves, la muerte. Dado que la infección por VHB no es posible erradicarla de forma completa, la supresión viral de forma continua conduce a una mejoría en la bioquímica y la histología del paciente, lo que ayuda a reducir la progresión hacia la cirrosis y el hepatocarcinoma. [34]

2.3.1.3 Mecanismo de acción

En la figura 8, se muestra el mecanismo patogénico del VHB, mostrando que tras la unión y entrada del VHB en la célula, el material genético viral se deposita en el núcleo y se repara. Este material persiste en el núcleo de los hepatocitos, permitiendo la transcripción del ARN pregenómico del VHB que codificará para ARN mensajero.[35]

La transcripción del genoma viral formará complejos de ligasas y ubiquitina ligasa que mediaran la ubiquitinación. [36-38]

El ARN viral es transportado al citoplasma, donde se traduce en varias proteínas virales, como las proteínas de envoltura (S, M y L), núcleo, polimerasa y la proteína X. Las proteínas de la nucleocápside, una vez traducidas, se ensamblan en el citosol, encapsulando en su interior una partícula de ARN y el complejo de la polimerasa. A partir de este ARN, se sintetiza una nueva cadena de ADN viral, que se empareja con otra hebra para formar un ADN bicatenario incompleto.[39-41]

La nueva partícula viral, al completar su núcleo, se dirige hacia la membrana citoplasmática, donde adquiere las proteínas de envoltura. Luego, es secretada fuera de la célula, iniciando así una nueva infección localizada en el hígado, lo que da lugar a la hepatitis B.[41]

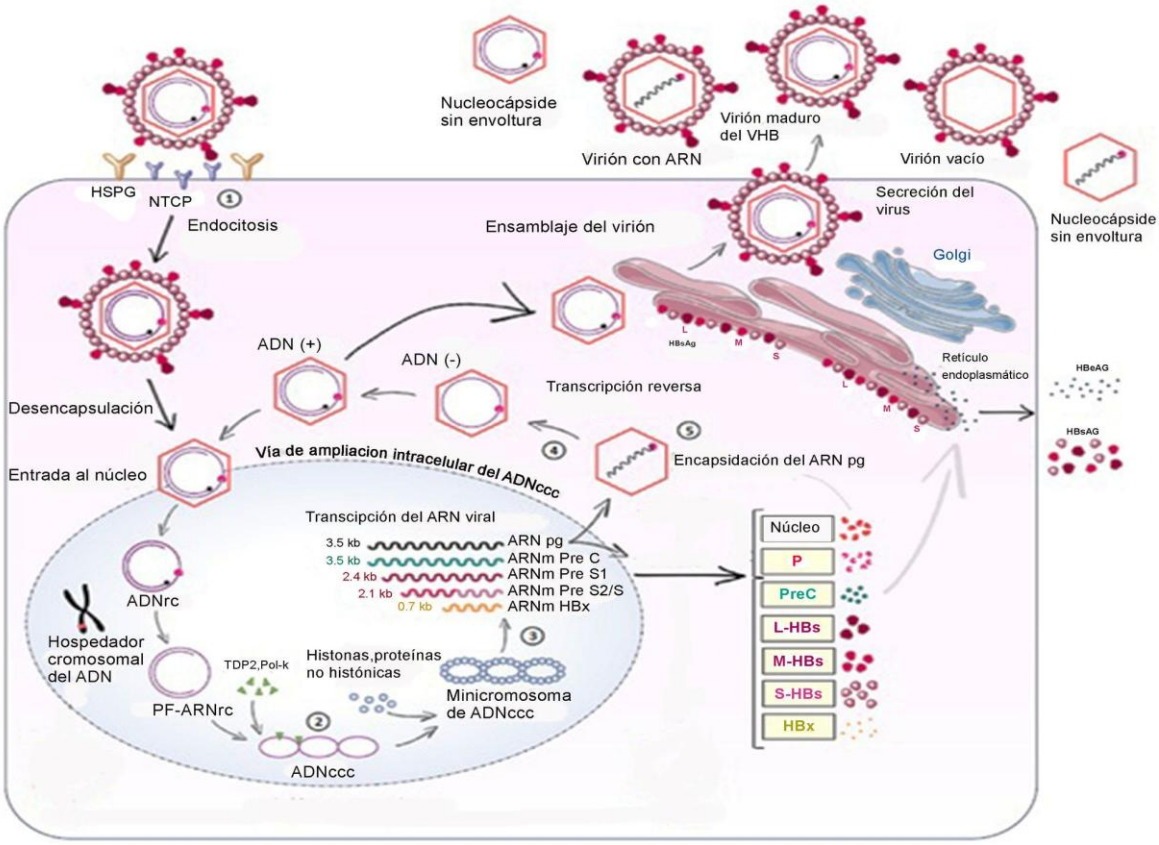


Figura 8. Mecanismo patogénico del VHB[42]

2.3.2 Hepatitis C

La enfermedad denominada como Hepatitis C, causada por el VHC, se tiene registrada como uno de los principales factores en el desarrollo de cirrosis hepática, hepatocarcinoma y enfermedad hepática crónica. Este transmite mayormente a través de la exposición a sangre y otros fluidos corporales infectados. Algunos de los riesgos de infección incluyen:[43]

- Transfusiones de sangre
- Trasplantes de órganos
- Uso de drogas intravenosas o intranasales.
- Punciones accidentales al compartir agujas contaminadas.
- Utilización de instrumental no esterilizado en Tatuajes, piercings, perforaciones, acupuntura, manicura o podología.
- Personas expuestas al contacto con sangre infectada.
- Transmisión durante el parto

- Contacto sexual.

La infección aguda por VHC puede ser asintomática, con menos del 25% de los pacientes presentando ictericia. Entre el 15% y 45% de las personas infectadas pueden experimentar una resolución espontánea de la infección dentro de los primeros seis meses, mientras que entre 25% y 30% pueden presentar síntomas como fiebre, ictericia y dolor abdominal. Sin embargo, entre 60% y 80% de los infectados desarrollan infección crónica.[43]Los factores que determinan la progresión hacia la infección crónica incluyen:[44]

- Manifestaciones de esteatosis hepática.
- Coinfección con VHB y VIH.
- Edad avanzada (mayores de 40 años).
- Género masculino.
- Coinfección con VIH.
- Consumo de alcohol.

La hepatitis crónica C (HCC) se produce debido a la persistencia del VHC en la sangre durante más de seis meses. Aproximadamente 55% a 85% de los pacientes con infección aguda desarrollan la enfermedad crónica. De estos, 20% a 30% pueden desarrollar cirrosis en un período de 10 a 30 años, lo que puede llevar a descompensación hepática, carcinoma hepatocelular y muerte relacionada con daño hepático. [45]

2.3.2.1 Epidemiología de la enfermedad

En nuestro país, existen entre 400,000 - 1,400,000 personas infectadas de VHC, de las cuales entre 200,000- 700,000 presentan aún cargas virales activas y requieren tratamiento. Entre 2010 y 2020, se registró un promedio anual estimado de 2,108 casos de hepatitis C en México.[46]

Los estados con las tasas de incidencia más altas en 2020 fueron: Baja California: 5.31 casos por cada 100,000 habitantes, Chihuahua: 2.37 casos por cada 100,000 habitantes, Colima: 2.29 casos por cada 100,000 habitantes. [47]

2.3.2.2 Tratamiento

El objetivo principal del tratamiento HCC es lograr una respuesta virológica sostenida, la cual se define como la ausencia de material genético del virus en plasma, evaluado al finalizar el tratamiento y 12 semanas posteriores a haberlo concluido. Se ha demostrado que debido a la

respuesta virológica sostenida tiene múltiples beneficios clínicos, tales como la erradicación a largo plazo de la infección viral, la mejoría histológica debido a la regresión de la fibrosis hepática, la disminución de complicaciones como tales como insuficiencia hepática, cirrosis y carcinoma hepatocelular. [48-50]

Actualmente, no existe una vacuna contra este virus, debido a la alta diversidad genética y rápida tasa de mutación del VHC. El tratamiento estándar considerado hace una década, fué el uso de interferón alfa (IFN α) por vía subcutánea (SC), dosis de 3 Unidades Internacionales (UI), 3 veces por semana y Ribavirina por vía oral, dosis de 800 a 1,200 mg/día. Con este esquema, es posible lograr que la respuesta viral sostenida se mantenga en un 38-43%. [50]

El tratamiento estándar actual consiste en peginterferón alfa combinado con ribavirina y ha mostrado efectos adversos graves, como: anemia, citopenia, trombocitopenia, neutropenia, trastornos neuropsiquiátricos: insomnio, irritabilidad, ansiedad, psicosis e incluso intentos de suicidio. [52]

2.3.2.3 Mecanismo de acción

En la figura 9, se muestra el mecanismo patogénico del VHC, el cual presenta similitud con el mecanismo ya mencionado del VHB.

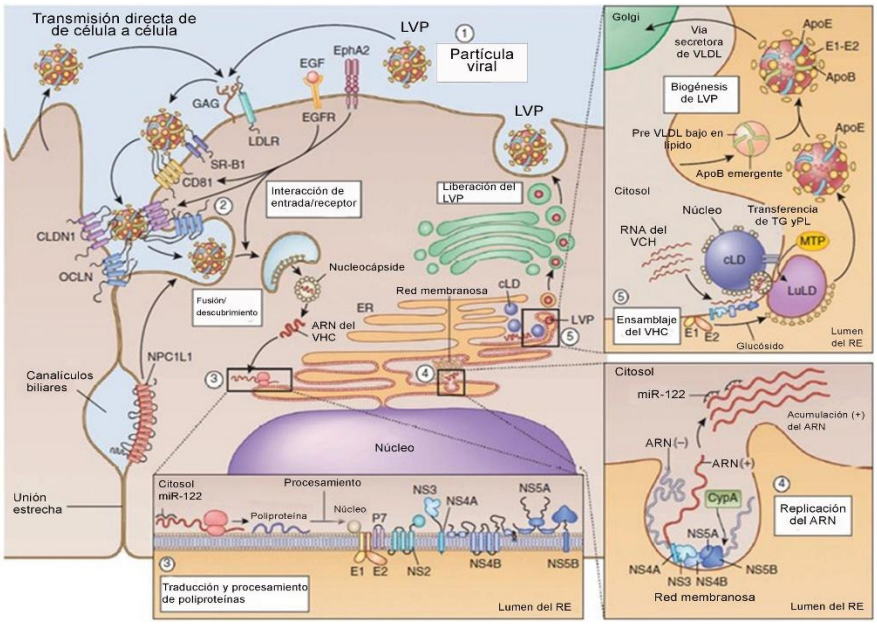


Figura 9. Mecanismo patogénico del VHC [53]

2.4 Reposicionamiento de fármacos

El reposicionamiento de fármacos consiste en la identificación de nuevos usos para medicamentos ya existentes. Este enfoque ha sido ampliamente utilizado durante décadas debido a sus ventajas significativas, tales como:

- Reducción de costos y tiempo en el desarrollo de nuevos tratamientos.
- Menor riesgo de fallos de seguridad, ya que estos fármacos tienen perfiles bien caracterizados de farmacocinética y farmacodinamia.
- Aceleración del proceso regulatorio, reduciendo el tiempo de desarrollo entre 3 y 12 años en comparación con la creación de un fármaco nuevo.

Durante la crisis sanitaria por Covid-19, esta estrategia fue clave debido a la urgencia de encontrar tratamientos efectivos. En circunstancias normales, los estudios de reposicionamiento requieren un proceso de evaluación previa; sin embargo, debido a la rápida propagación del virus y el creciente número de pacientes en estado grave, se aprobó el uso de emergencia de varios fármacos en estudios acelerados. Este enfoque permitió la investigación y aplicación de tratamientos potenciales en tiempo récord, proporcionando alternativas terapéuticas mientras se desarrollaban vacunas y tratamientos específicos. [54]

Debido a las necesidades de nuevos compuestos útiles frente a diferentes enfermedades infecciosas, la estrategia de reposicionamiento de fármacos resulta de gran utilidad por la aparición de resistencias, la propagación de diversas patologías respiratorias generadoras de eventos de pandemia entre otros, por lo cual reposicionar fármacos con fines terapéuticos distintos a los que fueron inicialmente aprobados, representa una gran ventaja en su investigación, ya sea porque conlleve menor tiempo de estudio, disminución de costos, ensayos de fase I debidamente aprobados en estudios ya realizados en la aprobación del fármaco en determinada actividad terapéutica. Así mismo la utilización en algunos casos de fármacos multiblanco que permitan el tratamiento de más de una patología a la vez.[54]

2.5 Nitazoxanida

La Nitazoxanida es un fármaco con propiedades antiinfecciosas de amplio espectro (Figura 10), cuyo desarrollo inicial se enfocó en el tratamiento de infecciones parasitarias. Fue sintetizada en la década de 1970 a partir de la niclosamida y, posteriormente, en 2004, recibió la aprobación de la FDA para tratar infecciones causadas por protozoarios como *Cryptosporidium* y *Giardia*. [55]

A lo largo del tiempo, se ha descubierto que la Nitazoxanida no solo es eficaz contra parásitos, sino también contra diversas bacterias, virus y helmintos.

Dentro de su actividad antimicrobiana, se ha identificado su eficacia contra varias especies bacterianas, entre ellas *Helicobacter pylori*, *Clostridium spp.* y *Bacteroides spp*. Además, ha demostrado ser efectiva frente a protozoarios como *Entamoeba histolytica*, *Balantidium coli* y *Blastocystis hominis*, así como contra helmintos, incluyendo *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichiura* y *Strongyloides stercoralis*. También ha mostrado actividad contra ciertos tremátodos y cestodos, como *Echinococcus spp.*, *Hymenolepis nana* y *Taenia saginata*. [55-56]

En cuanto a su acción antiviral, la NTZ ha evidenciado un impacto significativo sobre algunos tipos de virus. Dentro de ellos, destacan virus respiratorios como la influenza A y B, el virus sincitial respiratorio y distintos tipos de coronavirus, incluyendo el Coronavirus del síndrome respiratorio del medio oriente (MERS-CoV) y el SARS-CoV-2. Asimismo, ha demostrado actividad contra otros virus como los rotavirus, norovirus, dengue, fiebre amarilla, encefalitis japonesa y VIH, virus de la hepatitis B y C, el virus de la estomatitis vesicular y el virus del Ébola.

El mecanismo de acción de la NTZ radica en la inhibición de la replicación viral a través de su metabolito activo, la tizoxanida (2-hidróxi-N-(5-nitro-2-tiazolil)benzamida), interfiriendo en la glucólisis del metabolismo de diversos microorganismos. Su capacidad para afectar la replicación de múltiples patógenos ha llevado a explorar su uso en el tratamiento de enfermedades virales emergentes. [57]

Debido a su amplio espectro de acción y a su seguridad en humanos, NTZ ha despertado un gran interés en el campo del reposicionamiento de fármacos, ofreciendo una alternativa terapéutica frente a infecciones virales y otras enfermedades infecciosas emergentes.

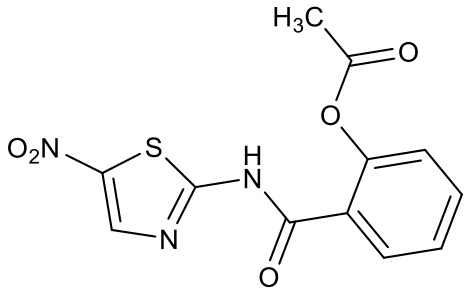


Figura 10. Estructura química de Nitazoxanida [59]

Las propiedades fisicoquímicas de NTZ, indicadas en la Tabla 1, muestran que tiene una baja solubilidad acuosa. Según el Sistema de Clasificación Biofarmacéutico (SCB), coloca a la NTZ dentro de la clase IV, lo que implica que su absorción se ve limitada por su solubilidad en agua, y además por su baja permeabilidad, la cual se ve favorecida con la ingesta de alimentos, en particular los ricos en grasas. [59-60]

Tabla 1. Características fisicoquímicas de NTZ [57]

Características fisicoquímicas de Nitazoxanida	
Fórmula química	$C_{12}H_9N_3O_5S$
Nombre IUPAC	2-acetiloxi-N-(5-nitro-2-tiazolil) benzamida.
Peso molecular	307.3 g/mol
Punto de ebullición	394 °C
Punto de fusión	202 °C
pKa	8.3
Log P	1.63
Apariencia	Polvo cristalino de color amarillo
Solubilidad en disolventes orgánicos	N, N-dimetilformamida (DMF), metanol y tolueno, Acetona, acetonitrilo (ACN), acetato de etilo, etanol, dimetilsulfóxido (DMSO), isopropanol,
Solubilidad acuosa	7.5 µg/mL

2.5.1 Farmacocinética

Posterior a la administración oral de NTZ, esta es absorbida parcialmente en el tracto gastrointestinal, en el epitelio del intestino delgado. Su biodisponibilidad es baja debido a un extenso metabolismo de primer paso en el hígado. [57,62,63]

Se distribuye en los tejidos y fluido extracelular, alcanzando concentraciones terapéuticas en el plasma y en órganos como el hígado. [66]

El principal proceso metabólico de la nitazoxanida ocurre en el hígado, donde sufre una transformación a su metabolito activo, este es mediado por enzimas del CYP (Citocromo P450), principalmente por la isoenzima CYP3A4, que está involucrada en la desmetilación del fármaco. Además, el CYP2C9 también puede tener un papel menor en este proceso. La glucuronización también ocurre en el hígado, y este proceso es facilitado por enzimas como la UDP-glucuronosiltransferasa (UGT).[66,67] Este proceso se describe en la figura 11, mostrando la biotransformación de NTZ a sus metabolitos.

Se ha reportado que NTZ tiene una vida media de aproximadamente 6 minutos, mientras que su metabolito activo, TIZ, presenta una vida media de entre1 1.6 horas. Su metabolito inactivo, el glucurónido de tizoxanida, (GTiz) tiene una vida media de aproximadamente 7 horas. No se detectan concentraciones plasmáticas de NTZ, pero la TIZ alcanza concentraciones plasmáticas máximas entre 1 a 4 horas después de una dosis oral. En cuanto a la BDr, las suspensiones orales de NTZ presentan una biodisponibilidad relativa del 70% en comparación con la administración en tabletas, las cuales presentan una biodisponibilidad significativamente menor, además de depender de la administración con alimentos para mejorar su absorción.

La administración del fármaco posterior a los alimentos aumenta la concentración plasmática máxima entre un 10%-50%, además de modificar el tiempo máximo de concentración en aproximadamente una hora. [62-63,66-67]

La TIZ se une en su mayoría a las proteínas plasmáticas (99.9%) y se elimina en un 66% por las heces y un 33% por la orina. Además, sufre conjugación con ácido glucurónido, que es eliminado a través de la orina y la bilis. [62,64,65]

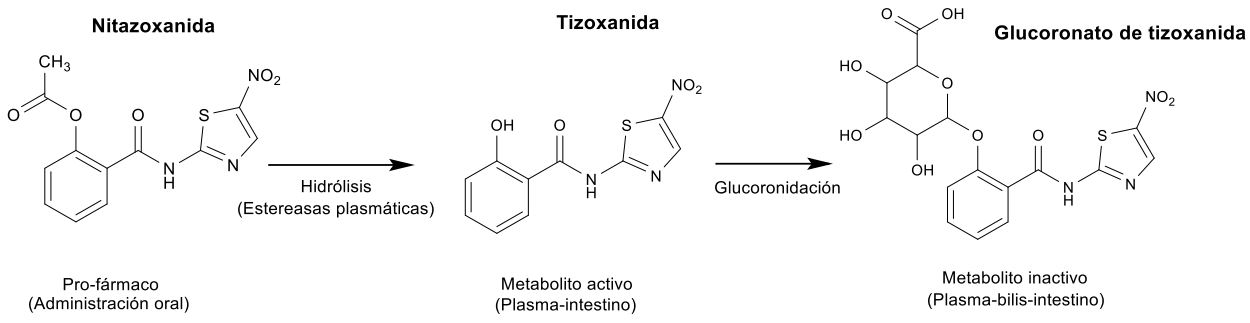


Figura 11. Metabolismo de nitazoxanida en plasma [35]

2.5.2 Farmacodinamia

La tizoxanida, actúa sobre los algunos parásitos como los protozoarios (inhibiendo las enzimas quinona-oxidorreductasa, nitrorreductasa 1 y proteína disulfuro-isomerasa), nemátodos (inhibe la glutatión-transferasa y modular el gen *Avr-14* que codifica para la subunidad α del canal iónico cloruro-glutamato y algunos tipos de bacterias anaerobias (interrumpe el metabolismo mediante la inhibición del ciclo ferredoxina-flavodoxina-oxidorreductasa, la cual tiene un papel esencial en el metabolismo anaerobio). [56-58]

En cuanto a su actividad antiviral, se ha reportado que en lugar de tener un mecanismo dirigido al virus, esta genera interferencia con las vías reguladas por el huésped involucradas en la replicación viral. Estas vías podrían incluir cuatro posibles mecanismos, según el patógeno a quien vaya dirigido: amplificación de la respuesta antiviral del huésped, vías de señalización de interferones, inhibición de la síntesis de interleucina 6 (IL-6) así como supresión de la producción de citosinas proinflamatorias en células mononucleares. Estos mecanismos hacen de NTZ un fármaco efectivo en el tratamiento de diversas infecciones virales y parasitarias. En el caso de la gripe, la TIZ interfiere en la maduración de la hemaglutinina viral. No afecta a la neuraminidasa y no tiene ningún efecto sobre la infectividad viral, la adsorción o la entrada en las células objetivo.[66-67]

La NTZ, es un tiazólido y, en contraste con los nitroimidazoles, ofrece una mayor potencia, mejor espectro de acción y una menor toxicidad.[68]

2.6 Formulaciones comerciales de nitazoxanida

Las presentaciones actuales en el mercado de NTZ comprenden tabletas, tabletas dispersables, suspensión oral y grageas, cuyos objetivos terapéuticos son el tratamiento contra parásitos y bacterias, mientras que aún no se cuenta con formulaciones dirigidas a virus.

Dentro de estas presentaciones, se pueden encontrar algunas como las siguientes:[69]

DAXON. SIEGFRIED-RHEIN. Suspensión oral de 100 mg/ 5 mL. Tabletas de 500 mg y tabletas dispersables de 200 mg.

ZOTANIXIN. SANFER. Suspensión de 100 mg o 200 mg /5 mL

PARAMIX. LIOMONT. Grageas de 500 mg, tabletas dispersables de 100, 200 o 250 mg de. Suspensión oral de 2g/ 100 mL.

MARCAS DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS. Presentaciones ya mencionadas

2.7 Metodologías de bioevaluación de nitazoxanida

Dentro de las metodologías analíticas utilizadas para la cuantificación de nitazoxanida y tizoxanida en plasma, la cromatografía líquida de alta resolución (CLAR) se ha consolidado como una técnica confiable debido a su alta sensibilidad, especificidad y reproducibilidad. Diversos estudios han desarrollado y validado métodos CLAR para la detección de TIZ, ya que, debido al metabolismo propio de este compuesto en plasma, la cuantificación de NTZ no es viable, por ello, diversos estudios han reportado ya esta situación, empleando diferentes condiciones cromatográficas y sistemas de detección.

Estos estudios han demostrado ser efectivos en estudios preclínicos en ratas, facilitando la caracterización farmacocinética del fármaco. Asimismo, se han realizado estudios en diversas matrices biológicas en donde la cuantificación de las concentraciones plasmáticas de TIZ, son las reportadas. Entre los datos reportados para TIZ, se ha encontrado una C_{max} de 0.3-1.9 microgramos por mililitro (µg/mL) y el T_{max}, se ha reportado en un rango de 10-30 minutos (min). [70-71]

Esto ha permitido también su aplicación a estudios de cultivos celulares y evaluaciones de toxicidad. Otros trabajos han validado métodos analíticos específicos para la cuantificación de nitazoxanida en formulaciones farmacéuticas como tabletas y suspensiones orales, garantizando su calidad y concentración adecuada. La implementación de nuevas estrategias cromatográficas ha contribuido a mejorar la eficiencia y rapidez de estos análisis.[71-73]

2.8. Nanopartículas de nitazoxanida

Las nanopartículas son partículas con dimensiones en la escala nanométrica, generalmente en el rango de 1 a 100 nanómetros (nm), que poseen propiedades únicas debido a su tamaño reducido y gran área superficial en comparación con su volumen. Estas propiedades incluyen una mayor reactividad química, una mayor solubilidad, y una mayor capacidad de penetración en tejidos biológicos, lo que las hace útiles en diversas aplicaciones, desde la medicina hasta la electrónica y los materiales avanzados. [74]

Entre algunas de sus ventajas, podemos mencionar algunas como[75]

Aumento de la superficie: El pequeño tamaño de las nanopartículas les otorga una superficie específica muy alta, lo que mejora la eficiencia en diversos procesos químicos y biológicos.

Mejor penetración en sistemas biológicos: Debido a su tamaño diminuto, las nanopartículas pueden atravesar barreras biológicas como la piel, membranas celulares, y la barrera hematoencefálica, lo que las hace útiles en sistemas de liberación controlada de fármacos.
Propiedades ópticas, magnéticas y eléctricas únicas:
Modificaciones funcionales: Las nanopartículas pueden ser funcionalizadas con diversas moléculas o biomoléculas, lo que permite personalizar sus propiedades para aplicaciones específicas.

Estas modificaciones funcionales, permiten en el ámbito farmacéutico, que puedan ser cargadas de fármacos con la finalidad de obtener mejoras en la solubilidad (al ser encapsulados los fármacos mejoran su biodisponibilidad), liberación controlada (disminuye la necesidad de múltiples dosis y minimiza los efectos secundarios), aumento de estabilidad (protege a los fármacos de degradación temprana), así como, dirigibilidad y especificidad (en algunos casos, las nanopartículas pueden reconocer y dirigirse a células específicas, mejorando así la precisión de los tratamientos).[57,68,75]

En 2023, alumnos del laboratorio 4 de la facultad de farmacia de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos (UAEM), desarrollaron nanopartículas de nitazoxanida como parte de un proyecto de investigación[57], con los antecedentes de NTZ, se sabe que posee una baja solubilidad acuosa, lo cual limita su efecto terapéutico debido a que esto se refleja en una baja biodisponibilidad y por tanto una disminución de la eficacia. Para superar esta barrera, fué desarrollada una formulación basada en nanopartículas poliméricas (PNPs), un sistema de liberación controlada que mejora la absorción y la actividad biológica del fármaco.

Las PNPs fueron obtenidas mediante la técnica de emulsión simple/evaporación de disolvente, utilizando policaprolactona (PCL) como polímero y alcohol polivinílico (PVA) como estabilizante. Se aplicó un diseño experimental (DoE) para optimizar la formulación, considerando variables como la concentración del polímero y el estabilizante, así como sus efectos en el tamaño de partícula, la eficiencia de encapsulación (%EE) y la capacidad de carga (%CC). La caracterización de las nanopartículas arrojó los siguientes resultados: [57]

- Tamaño promedio de partícula: 360 ± 18 nm
- Índice de polidispersión (PDI): 0.171 ± 0.01
- Potencial zeta: -10 ± 1.2 mV
- %CC: 1 ± 0.2 %
- %EE: 96 ± 2.2 %

Se llevaron a cabo estudios de liberación in vitro en un medio de pH 6.8 para simular condiciones intestinales. Se observó que las PNPs permitieron una liberación sostenida de NTZ, alcanzando un 25 % del fármaco liberado a las 72 horas, en comparación con un 5 % de la NTZ sin encapsular. Adicionalmente, se realizaron estudios de permeabilidad ex vivo utilizando un modelo de intestino de cerdo, donde se demostró que las PNPs mejoran significativamente la absorción del fármaco. La cantidad de NTZ transferida a través del tejido intestinal fue 6.5 µg desde las PNPs en comparación con 3.1 µg en su forma libre, lo que indica una mayor permeabilidad y potencial de absorción. [57]

La formulación de NTZ en nanopartículas poliméricas representa una estrategia innovadora y efectiva para mejorar la administración de este fármaco antiviral. La optimización de las condiciones de fabricación permitió obtener nanopartículas con alto porcentaje de encapsulación, liberación controlada y mejor permeabilidad intestinal. Estos resultados respaldan el potencial de esta formulación como una alternativa para mejorar el tratamiento de algunas infecciones virales respiratorias, así como VHB y VHC, ofreciendo una terapia más eficaz y con mejor perfil de seguridad.

III. JUSTIFICACIÓN

En México, las enfermedades virales, tales como las hepatitis y diversas enfermedades respiratorias virales, constituyen un problema de salud prioritario por su alta morbilidad y mortalidad. Esto se debe a su difícil control por su capacidad de infectar a grupos de personas, previo a su diagnóstico sintomático lo que se convierte en situaciones de emergencia epidemiológica y demuestran la vulnerabilidad de la población.

Debido a que NTZ ha mostrado actividad biológica contra distintos tipos de virus, se considera la posibilidad de emplearlo como tratamiento antiviral.

Uno de los principales retos que presenta su uso clínico es su baja biodisponibilidad oral, según Romero[55] esta es <70%, lo que limita la eficacia terapéutica del fármaco. Esta baja biodisponibilidad se debe a su baja solubilidad en agua, requiriendo dosis altas para lograr concentraciones plasmáticas suficientes que puedan lograr un efecto terapéutico adecuado.

Dada la necesidad de mejorar la eficacia de la nitazoxanida, una posible estrategia es el desarrollo de nuevas formulaciones que mejoren su absorción y biodisponibilidad. En este

contexto, las formulaciones nanoparticuladas emergen como una de las soluciones más prometedoras. Las nanopartículas, debido a su pequeño tamaño y características fisicoquímicas particulares, pueden aumentar la solubilidad de compuestos poco solubles, favorecer una mayor absorción en el tracto gastrointestinal e incluso mejorar estabilidad. Estas propiedades podrían permitir alcanzar niveles plasmáticos más altos y sostenidos, lo que potencialmente incrementaría la eficacia del fármaco, reduciendo la dosis necesaria y mejorando el perfil de seguridad.

El propósito de este proyecto es evaluar la biodisponibilidad relativa de una formulación nanoparticulada de nitazoxanida, desarrollada en el laboratorio 4 de la FF UAEM, comparada con el fármaco puro, a través de un modelo animal murino (rata Wistar). Teniendo como meta evaluar los parámetros farmacocinéticos de ambas formulaciones en modelo compartimental y no compartimental.

IV. HIPÓTESIS

El desarrollo de un método validado de cuantificación de NTZ y TIZ en plasma de rata, permitirá realizar cuantificaciones y evaluaciones de biodisponibilidad de NTZ en diferentes tipos de formulaciones administradas.
La fracción biodisponible de NTZ formulada en nanopartículas debe ser mayor que la fracción biodisponible de la NTZ sin formulación administrada por vía oral en un modelo murino.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Evaluar la biodisponibilidad relativa de TIZ, el principal metabolito de NTZ, mediante un estudio farmacocinético de administración oral utilizando un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución.

5.2 Objetivos particulares

i. Desarrollar del método analítico para cuantificación de TIZ en plasma.
ii. Validar del método de cuantificación de TIZ en plasma.
iii. Evaluar la farmacocinética de NTZ sin formulación en un modelo de rata Wistar.
iv. Evaluar la farmacocinética de NTZ formulada en nanopartículas en un modelo de rata Wistar.
v. Modelar los datos experimentales en sistemas compartimentales para ambas formulaciones.
vi. Establecer los parámetros farmacocinéticos y la BD relativa de ambas formulaciones.

VI. MATERIALES Y EQUIPOS

6.1. Materia prima utilizada

- Nitazoxanida, purificada de tabletas de 500 mg, Farmacias del Ahorro®.
- Tizoxanida, obtenida de síntesis en el lab. 4 de la Facultad de Farmacia, UAEM.[68]
- Nanopartículas de NTZ desarrolladas en el lab.4 de la Facultad de Farmacia, UAEM [57]
- Nifuroxazida, obtenida y purificada por Zaira Hernández Aceves a partir de tabletas de 500 mg de Farmacias del Ahorro ®.

6.2. Reactivos y material utilizado

- Agua destilada y tridestilada
- Acetato de amonio
- Acetonitrilo (grado analítico) Fermont ®
- Metanol (grado analítico) Fermont ®
- Ácido fosfórico Meyer ®
- Dimetilsulfóxido BDH ®
- Matraces aforados de 5,10 y 1000 mL
- Probetas de 100 mL
- Vidrios de reloj
- Vasos de precipitado de 50, 100 y 1000 mL

- Membranas de filtración de 0.25 µm
- Matraz fondo de balón de 250 mL
- Tubos falcón de 15 mL
- Agitadores magnéticos
- Micropipeta Multipette Eppendorf ®
- Puntas para micropipeta
- Tubos eppendorf de 2.0 mL
- Cánula metálica para administración oral

6.3 Equipos

- Sistema de filtración, Millipore ®.
- Columna Grace® Alltima HP C18 de 4.6 x 250 mm.
- Balanza analítica. OHAUS ® PA 0214
- Bomba de vacío, Millipore ®.
- Sonicador, Cole-Parmer ®.
- Cromatógrafo de Líquidos de Alta Resolución, Hitachi Elite LaChrom® modelo L-2000
- Parrilla de agitación. IKA ® C-MAG HS 7
- Vórtex. Thermo Scientific ®
- Centrífuga Minispin, eppendorf ®.
- Potenciómetro, Oakton pH700 ®.
- Rotaevaporador, Buchi ®.

6.4. Software

- Empower ® 3
- Origin ® 2019
- EZ Chrome ® 3.1.3
- Microsoft Excel ®

VII. METODOLOGÍA

7.1. Método analítico

El principal objetivo en el desarrollo del método de cuantificación es determinar las concentraciones de TIZ provenientes de muestras obtenidas del plasma de rata, posterior a la administración de NTZ, utilizando la técnica de CLAR con detector UV-Visible.

7.1.1. Soluciones

Stock de TIZ (1000 µg/mL)

En cada repetición realizada, se pesó un promedio de 10 mg de TIZ, este peso se disolvió en 3 mL de DMSO en un matraz volumétrico de 10 mL, se realizó agitación por vórtex y se procedió a aforar con 7 mL de metanol (MeOH). De esta manera se obtuvo una concentración final de 1000 μg/mL.

Soluciones de trabajo de TIZ

• Solución de 10 µg/mL: Se tomó una alícuota de 100 μL de la solución stock y se aforó a 10 mL con agua y después se agitó con vórtex.
• Solución de 1 µg/mL: Se tomó una alícuota de 0.5 mL de la solución de 10 µg/mL y se aforó a 5 mL con agua y se agitó con vórtex.

Fase acuosa: Buffer de acetato de amonio a 50 mM

La fase acuosa de la fase móvil, utilizada para la cuantificación de TIZ fue de buffer de acetato de amonio, para la preparación de un litro de buffer, en las distintas repeticiones se pesó un promedio de 3.85 g de acetato de amonio para preparar una solución 50 mM en un volumen de 1 L de agua tridestilada, filtrada, a la solución se agregó 1 mL de dietilamina y ajustando el pH de 4.0 con ácido fosfórico.

Fase orgánica: ACN: MeOH

La fase orgánica de la fase móvil, fue realizada en proporciones 50:50 v/v de ACN:MeOH grado analítico.

7.1.2. Curva de calibración

La curva de calibración de TIZ, fue preparada utilizando las soluciones de trabajo de concentración 1 y 10 µg/mL y para el aforo se utilizó acetonitrilo en el caso de las curvas de verificación de funcionamiento de sistema o plasma para el método analítico, siguiendo las condiciones de la tabla 2.

Tabla 2. Tabla de trabajo para realizar la curva de calibración de tizoxanida

Punto	Porcentaje con respecto al C_{max} (%)	Concentración (µg/mL)	Solución de trabajo utilizada (µg/mL)	Volumen tomado de la solución de trabajo (µL)	Volumen de estándar interno (µL)	Volumen de aforo de ACN/ plasma (µL)	Volumen final (µL)
1	2.5	0.05	1.0	250	100	150	500
2	5	0.1		50		350	
3	10.0	0.2		100		300	
4	25	0.5		250		150	
5	50	1	10	50		350	
6	100	2		100		300	
7	125	2.5		125		275	
8	150	3		150		250	

7.1.3. Condiciones cromatográficas del método de cuantificación

La cuantificación de TIZ se realizó por la técnica de CLAR, a través de un cromatógrafo Hitachi Elite LaChrom modelo L-2000 acoplado a un detector UV-Visible. La tabla 3, muestra las condiciones cromatográficas evaluadas.

Tabla 3. Condiciones cromatográficas evaluadas

Condición evaluada	Descripción
Fase estacionaria: columna	Grac HPLC column Alltima C18 5µm 4.6 x 250mm Part No 88056
Fase móvil	ACN:Metanol: Buffer de acetato de amonio (pH 4.0) 15:15:70
Flujo	0.7 mL/min
Tipo de flujo:	Gradiente lineal
Volumen inyectado	20 µL
Tiempo de corrida	20 min
Longitud de onda	347 nm
Temperatura	Ambiente
Rango de cuantificación	0.05-3 µg/mL

7.1.4. Validación del método analítico

Las condiciones para evaluar el desempeño del método analítico se revisaron de la Guía de Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA (GVMBFDA)[74] y la NOM-177-SSA1-2013[75], las cuales establecen los parámetros de desempeño a evaluar en un método analítico, considerando según esta guía, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección, límite de cuantificación y especificidad.

7.1.4.1. Linealidad

La linealidad de un método analítico se define capacidad que tiene este de obtener respuestas proporcionales en el comportamiento de una muestra con respecto a su concentración dentro de un intervalo de trabajo determinado. Para su determinación se prepararon tres curvas de cuantificación por duplicado por dos días, con ocho niveles de concentración establecidas en la tabla 2 de acuerdo con lo establecido en la GVMBFDA. Y posteriormente se analizaron por CLAR con las condiciones de la tabla 3, los datos resultantes fueron analizados a través del software Microsoft Excel ® y Origin Pro ®, obteniendo el intervalo de confianza de la pendiente (m), el intercepto (b), la determinación del coeficiente de correlación (r) y el coeficiente de determinación (r^2),

7.1.4.2. Precisión

Según la GVMBFDA, la precisión se define como la concordancia entre los resultados analíticos, al aplicar un procedimiento repetidamente a diferentes proporciones de la muestra. En esta prueba, fue evaluada la repetibilidad, considerando en las pruebas condiciones analíticas idénticas incluido el analista. Se utilizaron las soluciones de trabajo previamente especificadas en la tabla 2. Se trabajó con tres niveles control (bajo, medio y alto) como se especifica en la tabla 4, en donde se explica el volumen tomado en microlitros (µL). De estas muestras se realizaron cinco réplicas por cada nivel en dos días diferentes. Estas muestras fueron evaluadas por CLAR con las condiciones cromatográficas de la tabla 3. Los datos resultantes fueron analizados en Microsoft Excel ®, determinando la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Tabla 4. Tabla de trabajo para el análisis de los puntos control

Nivel de concentración	Concentración (µg/mL)	Solución de trabajo utilizada (µg/mL)	Volumen tomado de la solución de trabajo (µL)	Volumen de estándar interno (µL)	Volumen de aforo de ACN/ plasma (µL)	Volumen final (µL)
Bajo	0.4	1.0	200	100	200	500
Medio	1.5	10	75		325	
Alto	2.7		135		265	

7.1.4.3. Exactitud

Este parámetro hace referencia a la similitud entre un valor de concentración recuperada a través del método analítico utilizado y la concentración teórica, este parámetro se considera como porcentaje de recobro. Para su determinación, se realizaron cinco réplicas de cada nivel representado en la tabla 4. Y se calculó con la siguiente ecuación.

$$\%\ de\ Recobro = \frac{Concentración\ recuperada}{Concetración\ teórica} \times 100$$

7.1.4.4. Límites (Detección y cuantificación)

El límite de detección (LD) se relaciona con la concentración mínima del analito que es posible detectar en una muestra, debido a la capacidad propia del equipo, en ocasiones esta señal ya

no es posible cuantificarla. Para su evaluación se siguió lo establecido en la GVMBFDA, con base en la curva de calibración y la desviación estándar de la ordenada al origen.
De la curva de calibración se determinaron los valores de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza de la pendiente (IC (b_1)), la ordenada al origen (b_0) y se calculó su desviación estándar (Sb0); obteniendo el LD con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{3.3 \times Sb_0}{b_1}$$

El límite de cuantificación (LC) se refiere a la concentración mínima del analito que es posible determinar. De la curva de calibración se determinaron los valores de la pendiente (b_1), el coeficiente de determinación (r^2), el intervalo de confianza de la pendiente (IC (b_1)), la ordenada al origen (b_0) y se calculó su desviación estándar (Sb0); obteniendo el LD con la siguiente ecuación:

$$LD = \frac{10 \times Sb_0}{b_1}$$

7.1.4.5. Selectividad/especificidad

Esta prueba se considera necesaria, debido a que permite verificar que el método mida de forma específica y precisa los analítos de interés en presencia de otros componentes, estos pueden ser de la matriz o incluso de las fases móviles. Para su evaluación se analizaron diversas muestras de blancos correspondientes a la matriz de preparación, así como de los componentes de la fase móvil.

7.1.5. Estudio farmacocinético de NTZ

7.1.5.1. Manejo de animales

Los estudios biológicos y farmacocinéticos cumplieron con los requerimientos establecidos por los estándares internacionales para la investigación biomédica y la norma oficial mexicana NOM-062-ZOO-1999 sobre el tratamiento de animales de laboratorio.
Se utilizaron un total de 7 ratas Wistar hembra (250-300g), divididas en 3 grupos, el primero con un número de individuos (n)=2 y segundo grupo (n=2) para la evaluación farmacocinética

de NTZ y el tercer grupo (n=3) para la evaluación de la formulación nanoparticulada; las ratas se mantuvieron con acceso libre al agua y en ayuno de 12 h previo al estudio.

El primer grupo, recibió una dosis única de 7.5 miligramos por kilogramo (mg/Kg) de NTZ preparada en solución salina y administrada a través de una sonda metálica por vía oral para garantizar la llegada del compuesto al estómago. Esta dosis se tomó como dosis de referencia (D_{ref}) con base en otros trabajos de investigación previamente reportados[68,69]. Posteriormente las ratas fueron anestesiadas utilizando cloroformo, se colectaron las muestras sanguíneas a partir de la vena lateral de la cola (aproximadamente 150 µL) en tubos eppendorf conteniendo heparina 1000 UI a diferentes tiempos: 5,15, 30, 60, 120, 240, 360 min.

El segundo grupo recibió una dosis de 15 mg/Kg de NTZ en las mismas condiciones de administración y muestreo que las anteriores, a diferentes tiempo: 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 240 min.

El tercer grupo (n=3), fue administrado con una dosis de 0.250 mg/kg de NTZ (contenidas en 6.0 mg/Kg de nanopartículas), con las mismas condiciones de administración y muestreo mencionadas en los estudios previos, a diferentes tiempos: 10, 20, 30, 45, 60, 90, 120, 240, 360, 480, 600, 720, 1440, 2160, 2880 min.

Se obtuvieron muestras de plasma por centrifugación a 6000 G durante 6 minutos y se almacenaron a -5 °C hasta su posterior análisis.

7.1.5.2. Tratamiento de las muestras

El procedimiento de precipitación de proteínas utilizado se desarrolló de la siguiente manera: Un volumen de 250 µL de muestra de plasma con analito, se transfirió a tubos plásticos de 2 mL y se añadieron 250 µL de ACN, las muestras se agitaron en un vórtex durante 5 minutos y se centrifugaron durante 20 minutos a 12000 rpm. El sobrenadante se separó a un tubo plástico limpio, se transfirió una alícuota de 200 µL al autosampler y se inyectaron 20 µL en el sistema cromatográfico.

7.1.5.3. Evaluacion de parámetros farmacocinéticos

Los parámetros farmacocinéticos, concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo para alcanzar la C_{max} (T_{max}), volumen aparente de distribución (V_d/F), depuración aparente total (Cl/F), constante de absorción (k_a), constante de eliminación (k_e), vida media de eliminación

($t_{1/2e}$), vida media de absorción ($t_{1/2a}$), área bajo la curva ($ABC_{0\text{-}inf}$) y tiempo medio de residencia (TMR) fueron determinados utilizando el software Winonlin ® (Versión 2.0).

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1 Desarrollo del método analítico

Para optimizar la separación y cuantificación de TIZ mediante CLAR, se evaluaron diversas condiciones cromatográficas en términos de selectividad, resolución, eficiencia y tiempo de retención. El desarrollo del método analítico se llevó a cabo de primera instancia en un cromatógrafo Varían Pro Star 210, con flujo isocrático, posteriormente en un cromatógrafo Waters Alliance 2690 con flujo gradiente, y finalmente en un cromatógrafo Hitachi Elite LaChrom modelo L-2000 con el cual se llevaron a cabo las condiciones finales.
Las condiciones evaluadas previamente en trabajos anteriores del grupo de investigación que facilitaron el desarrollo de este método analítico se describen en la siguiente sección.

8.1.1 Selección condiciones cromatográficas

Según el método previamente evaluado en el laboratorio 4 de la facultad de farmacia por Cortés Núñez (2023) para la identificación de NTZ, se seleccionó como fase acuosa, el Buffer de acetato de amonio (pH 4.0) además se probaron diferentes composiciones de fase orgánica con mezclas de acetonitrilo-metanol, flujo isocrático a 1 mL/min. La fase estacionaria fue probada de forma inicial con una columna Zorbax CN, la cual contiene $(CH_3)_{3\text{-}}$Phe-NO_2.
Se encontró que la mezcla de Buffer-ACN proporción 45:55 (v/v), en modo de flujo isocrático, no proporciona las condiciones necesarias para la separación eficiente de NTZ y TIZ, mostrando una sola señal (8.02 min) para ambos analitos, tal como se muestra en la figura 12.

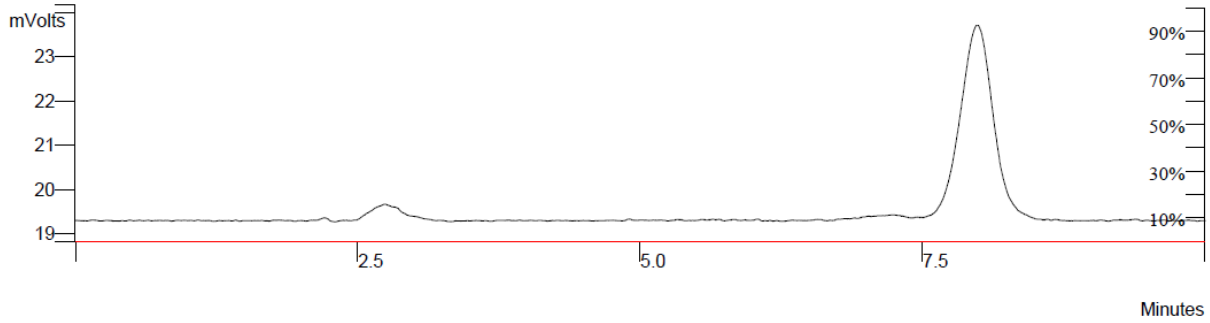


Figura 12. Cromatograma típico de NTZ y TIZ con condiciones de flujo isocrático

Por tal motivo se procedió a evaluar el cambio en el tipo de flujo a modo gradiente lineal, observando así (figura 13), que al iniciar el gradiente con proporciones de fase móvil Buffer:ACN 10:90 (v/v), es posible lograr una ligera separación de ambos analitos, observándose a NTZ en el minuto 8.92 y a TIZ en el minuto 9.03 aproximadamente, sin ser aún lo suficientemente separados para su cuantificación.

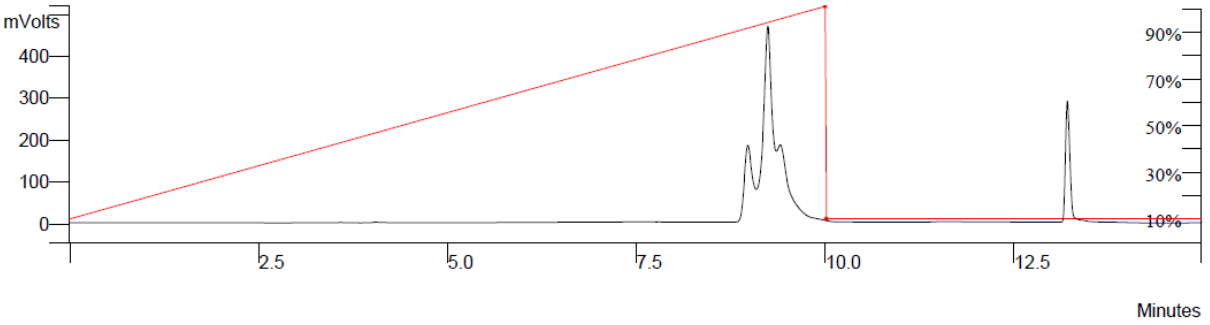


Figura 13. Cromatograma típico de NTZ y TIZ con condiciones de flujo gradiente lineal

Debido a ello, se realizó la adición de metanol en la fase orgánica, quedando esta con proporciones 50:50 (v/v) ACN:MeOH, logrando con estas modificaciones una mejor separación de los analitos. (figura 14), donde se encuentra NTZ en el minuto 7.32 y TIZ en el minuto 7.7.

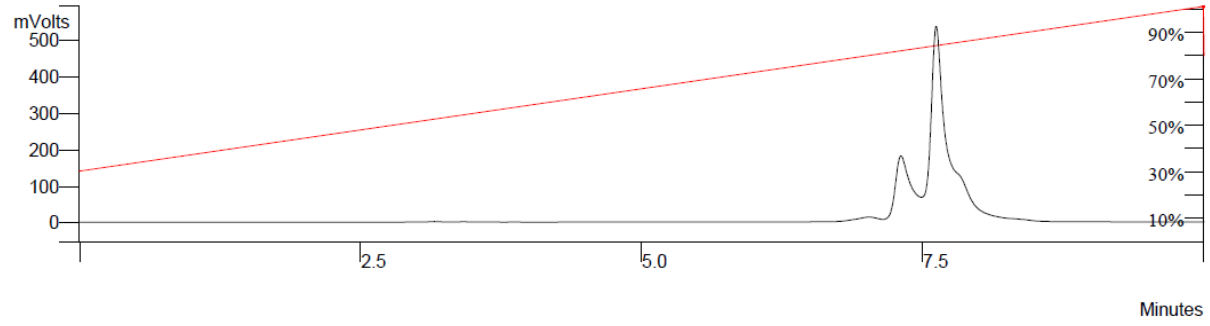


Figura 14. Cromatograma típico de NTZ y TIZ, columna C_{18}

La modificación de la fase estacionaria, utilizando una columna de tipo C_{18}, permitió mejorar la separación de ambos analitos, así como la modificación del (figura 15) obteniendo tiempos de retención de 25.408 min para NTZ y 27.023 min para TIZ, permitiendo con esta modificación integrar de forma individual a los analitos en solución.

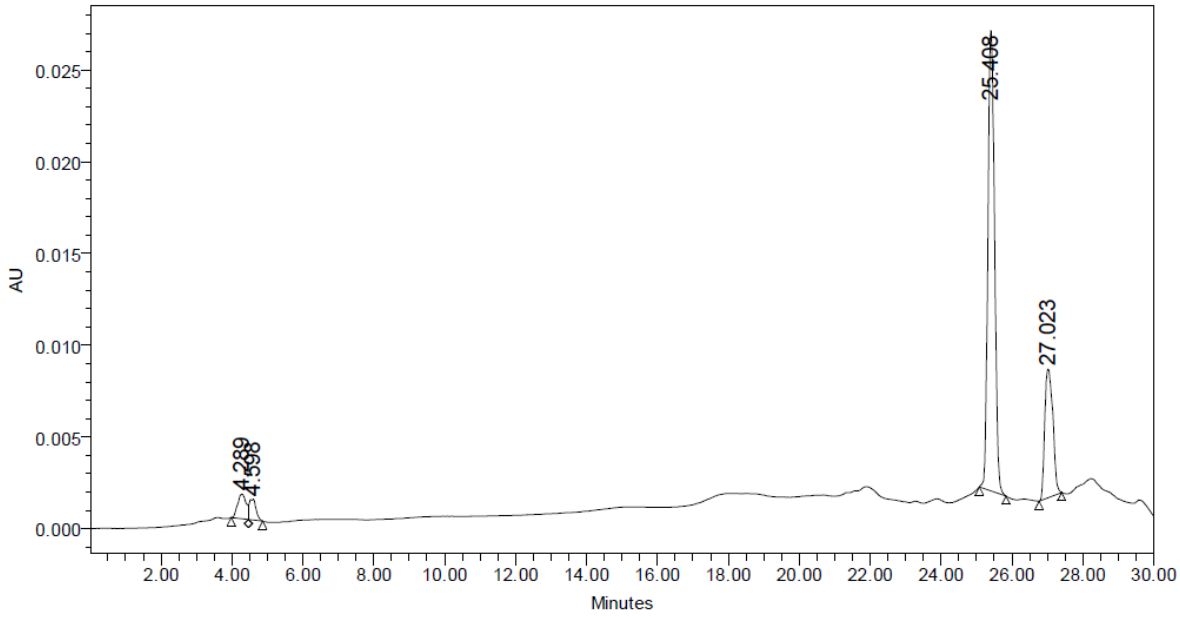


Figura 15. Cromatograma típico de NTZ y TIZ, columna C_{18}, flujo gradiente lineal a 1mL/min Bac:ACN 90:10 (v/v)

8.1.2. Elección del estándar interno

El estándar interno, luego de probar diversos candidatos, resultó que el de menor interferencia en los tiempos de retención de los analitos de interés, fue Nifuroxazida (NFX), quien además de poseer similitud estructural, no tiene interacción con los analitos.

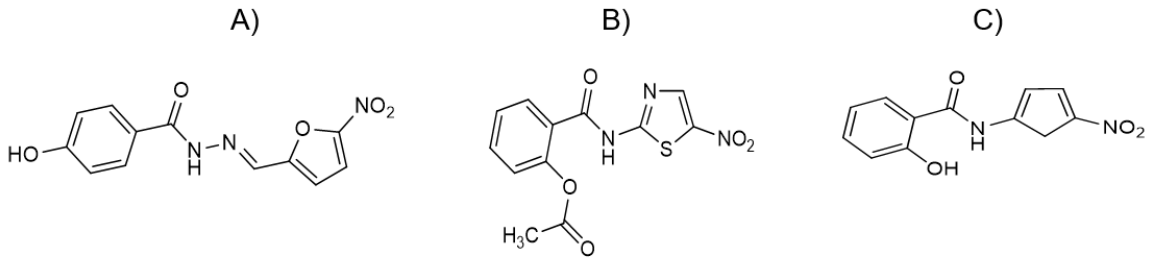


Figura 16. Estructuras de Nifuroxazida (A), Nitazoxanida (B), Tizoxanida (C).

.

En la figura 17, se observa el tiempo de retención de NFX, identificada a través del método analítico desarrollado para el estudio, en donde aparece en el minuto 17.64, notándose así la amplia separación que existe con respecto a los analitos.

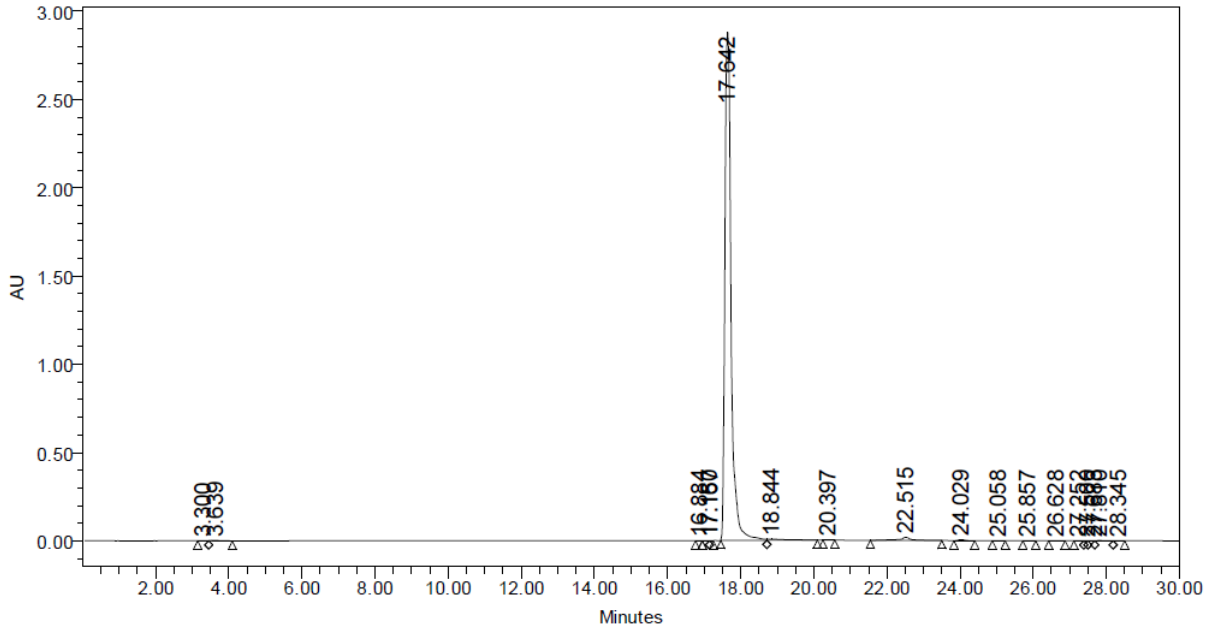


Figura 17. Cromatograma típico de identificación de NFX.

8.1.3 Condiciones finales del método analítico

Una vez evaluadas las condiciones anteriores, se procedió a establecer el método analítico, con las condiciones mostradas en la tabla 3. Las cuales permitieron la obtención del cromatograma mostrado en la figura 18, en estas condiciones, se realizó la modificación del caudal de flujo a 0.7 mL/min, las proporciones iniciales de fase fueron Buffer:ACN:MeOH 70:15:15 (v/v) hasta llegar a 0:50:50 respectivamente, así como también el tiempo de corrida a 20 min. quedando como tiempos de retención de los analitos, 9.180 min para NFX, 13.063 min para NTZ y finalmente 14.447 min para TIZ, con un volumen de inyección de 20 µL, y para el caso de esta figura, la concentración de cada uno fue de 2 µg/mL

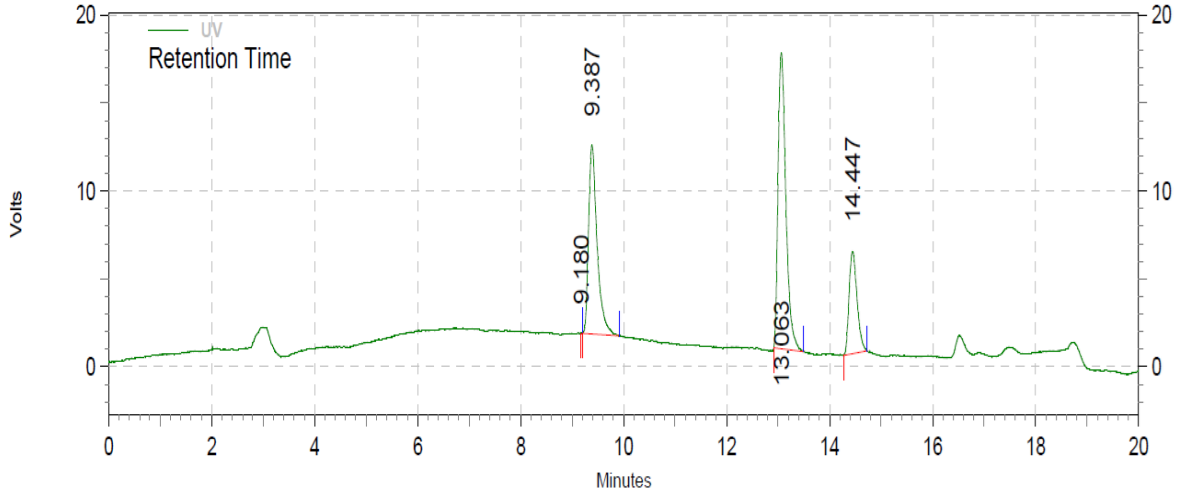


Figura 18. Cromatograma típico de identificación de NFX, NTZ y TIZ.

8.2. Validación del método analítico

Para la validación del método analítico se siguieron los criterios marcados por GVMBFDA, se evaluó la selectividad, linealidad, precisión, exactitud, límite de detección y límite de cuantificación.

8.2.1. Selectividad

La selectividad del método fue evaluada comparando los cromatogramas de muestras del blanco de plasma humano y las señales emitidas por NFX, NTZ y TIZ en plasma humano también.

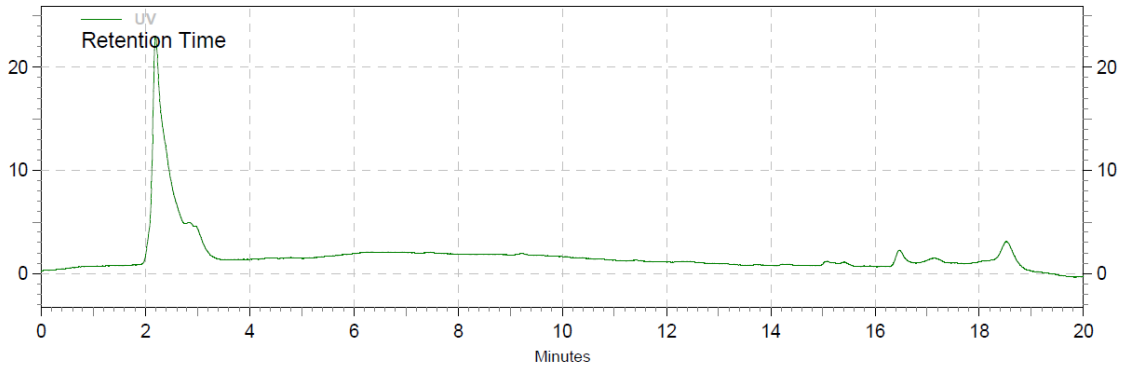


Figura 19. Cromatograma típico correspondiente al blanco de plasma humano

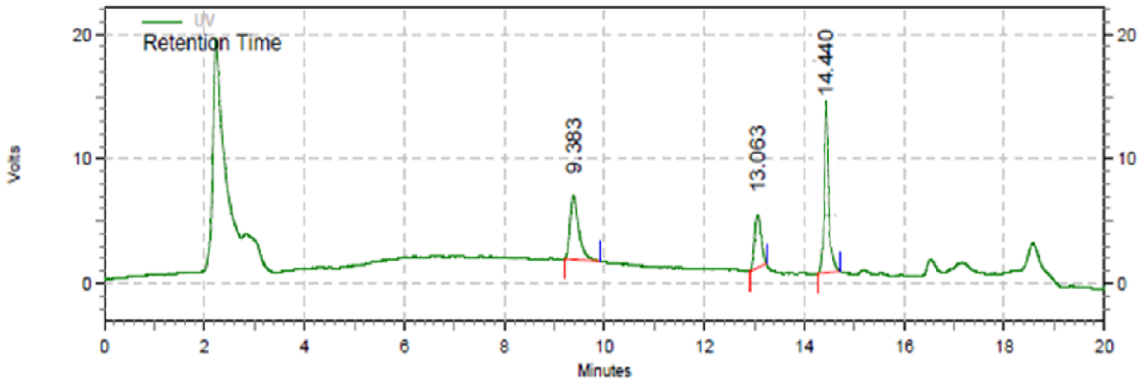


Figura 20. Cromatograma correspondiente a las señales analíticas de NFX (9.383 min), NTZ (13.063 min) y TIZ (14.440 min) en plasma humano

No se encontraron componentes del plasma que interfirieran con las señales analíticas de la NFX, NTZ y TIZ en los cromatogramas obtenidos (Figura 19 y 20). Sin embargo, debido al metabolismo inducido por las proteínas plasmáticas, la concentración inicial inyectada de NTZ, promueve el aumento de la concentración inicial inyectada de TIZ, como se observa en la figura 21, en la cual se hace la comparación de las muestras preparadas en plasma y en solución de acetonitrilo. Aquí se observan las señales obtenidas en diferentes matrices, preparadas a una misma concentración de NTZ y TIZ (2 µg/mL), con el aumento de concentración de la TIZ en matriz de plasma, promovida por la presencia de NTZ.

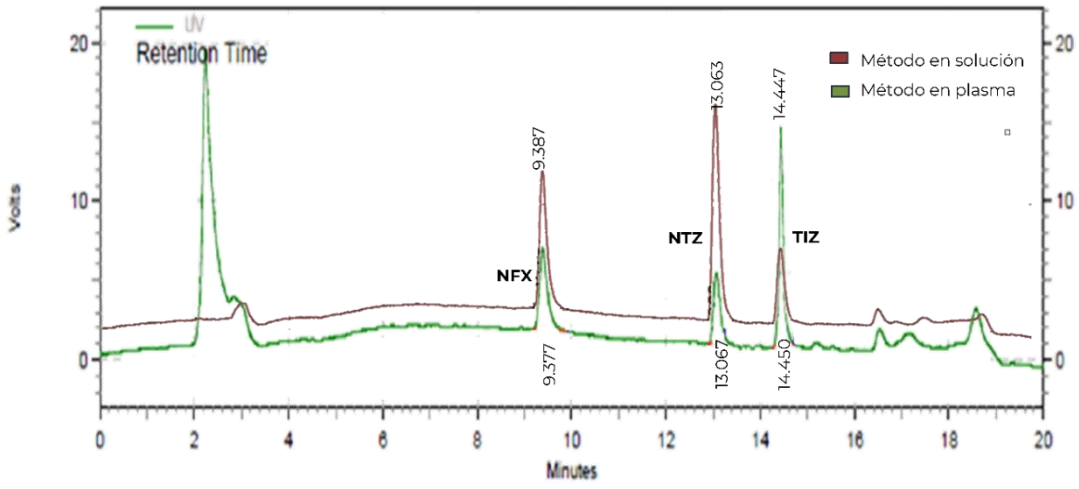


Figura 21. Cromatograma comparativo del método en solución y método en plasma.

Esta situación genera aumentos en la concentración del metabolito activo, el cual es el de principal interés en la cuantificación, por lo que se procede a excluirlo en la validación del método analítico, por lo que solo será cuantificado el estándar interno, NFX que tiene un tiempo de elución de 9.287 min y el metabolito activo de la NTZ, TIZ, quien tiene un tiempo de elución de 14.360 min. cómo se observa en la figura 22.

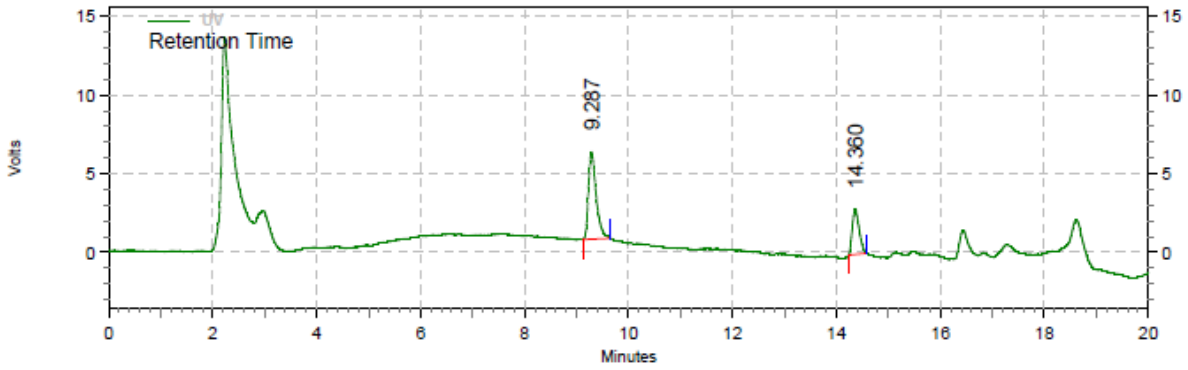


Figura 22. Cromatograma típico de identificación de NFX y TIZ.

El método analítico fue optimizado con base en los criterios de aceptación de los parámetros cromatográficos mostrados en la tabla 6.

Tabla 5. Parámetros cromatográficos

Parámetro	Criterio de aceptación	Resultado
Factor de capacidad (k´)	> 2.0	5.84
Selectividad (a)	> 1.0	1.71
Factor de asimetría (As)	< 2.0	1.3

Éstos últimos se expresan en términos de las características de retención de las moléculas que se describen por el factor de retención o factor de capacidad (k´), cuyos valores > 2 son los más aceptables. Para TIZ se obtuvo un k´= 5.84.

Se obtuvo una selectividad (a) = 1.71 entre el TIZ y el estándar interno. Ésta representa la efectividad del sistema cromatográfico para separar totalmente las dos moléculas, y sin interferencias por los componentes del plasma sanguíneo.

El factor de asimetría > 2 no es viable, ya que este denota la forma del pico, los que son simétricos tienen una proporción de 1 y con valores mayores a 1 los picos son asimétricos. TIZ tuvo un factor de asimetría de 1.3. De acuerdo con los valores obtenidos el método cumple con los parámetros de aceptación.

8.2.2. Linealidad

La linealidad del método de cuantificación fue establecida por análisis de regresión lineal de la curva de calibración, representativa de 2 día de trabajo se muestra en la figura 23. El intervalo de cuantificación se estableció de 0.05 a 3 µg/mL. El método de cuantificación muestra proporcionalidad directa entre la concentración y la respuesta. El coeficiente de correlación fue mayor a 0.999 tal como se muestra en la tabla 6, así mismo en ella se muestran los intervalos de confianza correspondientes a la pendiente.

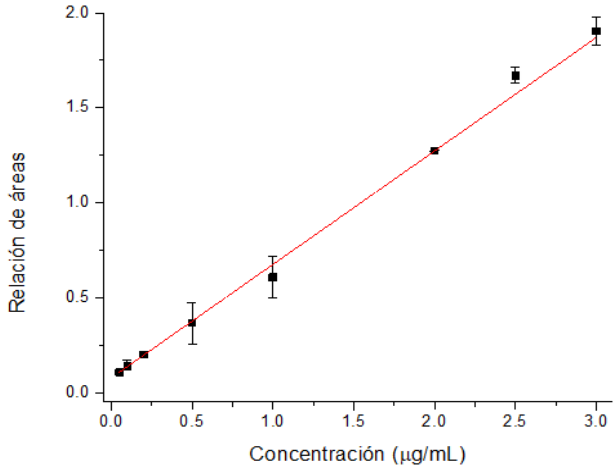


Figura 23. Gráfica de la linealidad del método analítico, representativa de 2 días de trabajo

Tabla 6. Resultados de la linealidad del método analítico

Parámetro	Especificación	Resultado	
Coeficiente de correlación (r)	≥ 0.99	0.99920	
Coeficiente de determinación (r^2)	≥ 0.98	0.99841	
Intervalo de confianza (m)	m ≠ 0	0.619644	
		Valor mínimo (α= 0.05)	0.4162
		Valor máximo (α= 0.05)	0.9302

8.2.3. Precisión

Los resultados de precisión del método de cuantificación del TIZ, se muestran en la tabla 7. Se verificó que el CV % de las concentraciones recuperadas a cada nivel fuera < 15.0 %.

Tabla 7. Precisión del método de cuantificación

Concentración nominal	Concentración recuperada µg/mL							
mg/mL	**1**	**2**	**3**	**4**	**5**	**X**	**DE**	**CV %**
0.4	0.427	0.459	0.475	0.423	0.461	0.449	0.0228	5.088
1.5	1.468	1.496	1.376	1.413	1.384	1.427	0.0525	3.683
2.7	2.629	2.475	2.553	2.595	2.613	2.573	0.0614	2.390

Tabla 8. Reproducibilidad del método de cuantificación

Concentración nominal (µg/mL)	Concentración recuperada (µg/mL)												
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	**X**	**DE**	**CV %**
0.4	0.427	0.459	0.475	0.423	0.461	0.505	0.524	0.549	0.515	0.529	0.487	0.0437	8.985
1.5	1.468	1.496	1.376	1.413	1.384	1.786	1.711	1.815	1.811	1.744	1.600	0.1880	11.750
2.7	2.629	2.475	2.553	2.595	2.613	3.040	2.883	2.946	2.845	2.928	2.751	0.1979	7.195

La tabla 8 muestra los valores de reproducibilidad del método para la cuantificación de TIZ, se puede observar que en los tres niveles de cuantificación el valor del CV % se encuentran dentro del rango aceptable menor al 15.0 % de variación, como se establece en la GVMBFDA, indicando que este método tiene una buena precisión.

8.2.4. Exactitud

La exactitud se determinó a través del porcentaje de recobro a tres niveles de concentración del TIZ en plasma humano.

Tal como se muestra en la tabla 9, el porcentaje de recobro promedio es de 97.11% estos resultados sugieren que el método desarrollado puede ser utilizado para determinar de manera exacta concentraciones diferentes de este compuesto.

Tabla 9. Porcentaje de recobro para la evaluación de la exactitud

Concentración (mg/mL)	Porcentaje de recobro (%)										
	1	**2**	**3**	**4**	**5**	**6**	**7**	**8**	**9**	**10**	
0.4	112.7	92.5	89.7	95.5	90.7	84.0	84.8	91.2	88.2	86.4	91.56
1.5	97.8	99.7	91.7	94.2	92.3	107.3	108.4	114.6	112.5	107.3	102.58
2.7	110.5	103.4	107.0	108.9	109.8	91.0	86.7	87.9	81.3	85.3	97.19
										Promedio	97.11

8.2.5. LD y LC

El LD y LC se determinaron experimentalmente a partir de las curvas de calibración. Se determinaron un LD = 0.1462 µg/mL y LC = 0.4430 µg/mL

8.3. Evaluación farmacocinética de NTZ

La evaluación de los perfiles farmacocinéticos de NTZ sin formulación y formulada en nanopartículas, se realizó en tres grupos de dosis diferentes cada uno. Al primer grupo (n=2), al cual se le administró NTZ sin formulación, se le administró una dosis de 7.5 mg/Kg de peso en ratas hembra de 250-300 g. Al segundo grupo (n=2) se le administró una dosis de 15 mg/Kg de peso en ratas hembra de 250-300 g, y al tercer grupo (n=3), se le administró una formulación nanoparticulada con dosis de 6.0 mg/Kg de peso en ratas hembra con las mismas características de peso ya mencionadas.

Los perfiles de concentración plasmática contra tiempo para la administración oral de las dosis administradas sin formulación se muestran en la figura 24.

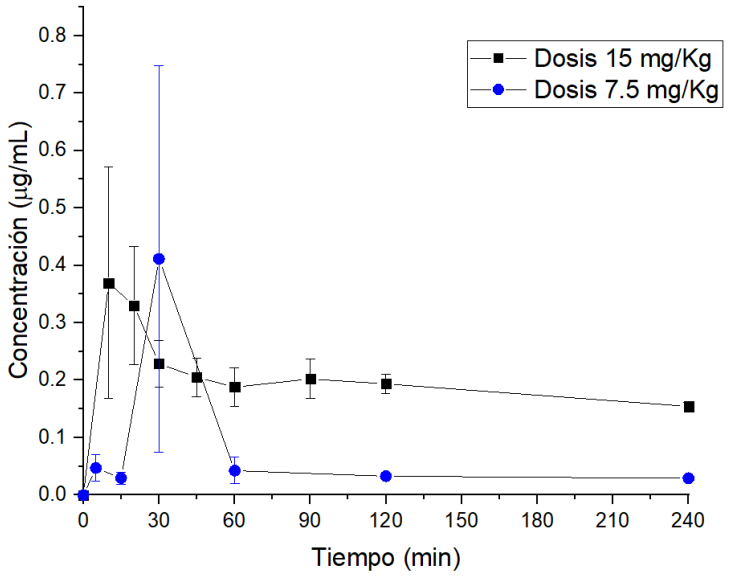


Figura 24. Perfil farmacocinético vía oral de administración de NTZ sin formulación a dosis 7.5 y 15 mg/Kg.

En azul, se muestra el perfil correspondiente a la dosis de 7.5 mg/Kg, mientras que en negro se representa la dosis de 15 mg/Kg, la dosis fue duplicada debido a que en la primera administración se observó que la mayoría de los puntos se encontraba cercano al límite de detección del método analítico.

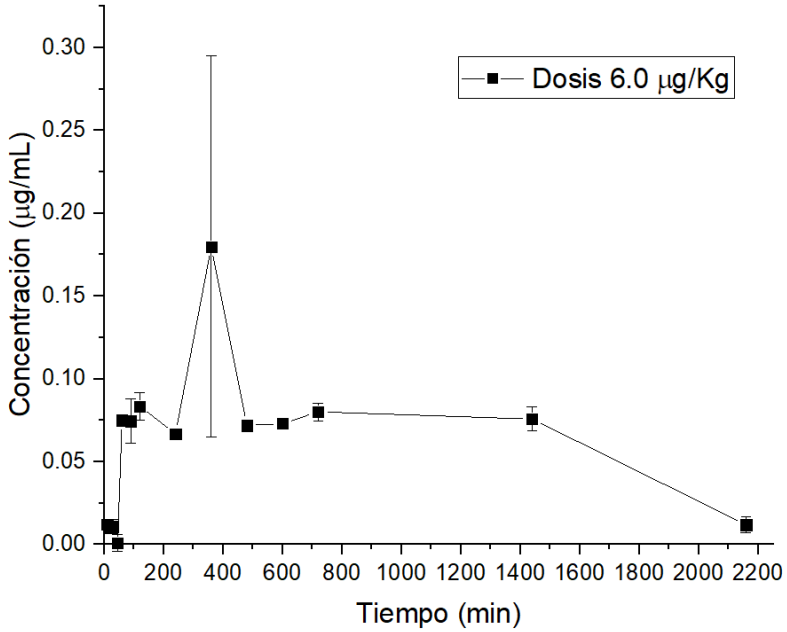


Figura 25. Perfil farmacocinético vía oral de administración de NTZ formulada con dosis de 6.0 mg/Kg

Por su parte, el perfil farmacocinético correspondiente a la administración formulada en NP's se muestra en la figura 25, en el cual se observa que en esta administración, debido a su naturaleza de nanopartículas, tiene una liberación controlada, encontrando a su T_{max} en un estimado de 400 min, y un C_{max} de aproximadamente 0.18 µg/mL, observando también una eliminación lenta, lo cual infiere que el tiempo de permanencia del fármaco en el organismo es mayor, por tanto esto podría ayudar a reducir la frecuencia de dosis, debido al aumento de vida media y tiempo medio de residencia del fármaco, logrando así también un mejor efecto terapéutico.

Para comprobar los datos mostrados en la gráfica, se realizó un análisis no compartimental de forma inicial, mostrando los resultados en la tabla 10, dicho análisis permite una noción de los datos que serán generados por el análisis compartimental, permitiendo así obtener datos primarios que indagan un acercamiento a los datos reales.

Al realizar el análisis no compartimental, en la tabla se aprecia entre los grupos 1 y 2, que el comportamiento que se obtuvo duplicando la dosis en la misma forma de administración (NTZ

sin formulación), la C_{max} incluso es más amplia en el grupo 1, esto puede deberse a cuestiones metabólicas propias de la rata, mientras que el T_{max} disminuye posiblemente por los mismos motivos.

Con respecto al ABC, se observa que este se incrementa a mas del doble, debido a los efectos de la cantidad de fármaco administrado. La k_e, disminuye a la mitad de la D_{ref}, atribuyéndose a que al ser mayor la cantidad de fármaco que ingresó al organismo, será mayor el tiempo de eliminación del mismo y por tanto la constante de eliminación más lenta, confirmándose esto con el $t_{1/2e}$.

En cuanto al Vd/F, se observa una mayor distribución en la dosis mayor, con respecto a la D_{ref}, notándose en ambas un amplio volumen de distribución que puede atribuirse al tamaño de la rata y a la amplia distribución del fármaco en el organismo de esta. Con respecto a la depuración, se observa una mayor velocidad en la dosis menor, mientras que el TMR tiene una pequeña diferencia en ambas dosis.

En el grupo dos la BDr solo llega a 5.6 con respecto a la fracción absorbida de la D_{ref}, atribuyendo este incremento a la duplicación de la dosis ya que no hubo cambio de vía de administración o formulación administrada.

Por su parte al hacer la comparativa entre la D_{ref} y la administración de NTZ formulada en NP's, se pueden observar diversos cambios significativos, comenzando con la C_{max}, aun cuando esta es menor a la D_{ref}, se justifica con los demás parámetros mostrados en el análisis realizado por el software.

En cuanto al T_{max}, se observa que es mayor, debido a que las NP's tienen liberación controlada, permitiendo que la NTZ se vaya liberando lentamente. Se muestra también un ABC 8 veces mayor con respecto a la D_{ref} esto permite identificar que la cantidad de fármaco que llega a torrente sanguíneo es mayor.

Así mismo la k_e disminuye 3.3 veces, permitiendo así que el fármaco se mantenga más tiempo en el torrente sanguíneo, dando posibilidad a un mejor efecto terapéutico, confirmando esto con $t_{1/2e}$ y TMR, estos parámetros reflejan la posibilidad de disminuir el tiempo entre dosis ya que el fármaco tiene permanencia prolongada dentro del organismo. La disminución del Vd/F, por su parte, podría indicar una mejor permanencia del fármaco dentro del torrente sanguíneo, con respecto al V_d/F de la D_{ref}.

Finalmente, en el análisis no compartimental, se estima una BDr 10.37 veces mayor con respecto a la D_{ref}, lo que permite ver que la eficiencia de la administración de la formulación nanoparticulada es notoriamente superior a la referencia.

Tabla 10. Modelaje no compartimental de las tres administraciones vía oral

Parámetros Farmacocinéticos	Unidades	NTZ sin formular		NTZ formulada en NP's
		Grupo 1 (n=2) 7.5 mg/Kg	Grupo 2 (n=2) 15 mg/Kg	Grupo 3 (n=3) 6.0 mg/Kg
$C_{máx}$	(µg/mL)	0.4114 (± 0.48)	0.3698 (± 0.24)	0.18 (± 0.18)
$T_{máx}$	(min)	30	10 (± 7.07)	360 (±165.22)
$ABC_{0\text{-}inf}$	[(µg/mL)*min]	21.098 (± 4.60)	59.17 (± 2.3)	175.04(± 65.9)
k_e	(1/min)	0.0247 (± 0.017)	0.0127 (±0.007)	0.0038 (±0.001)
$t_{1/2e}$	(h)	0.47 (± 1.6)	0.91 (± 0.47)	3.08 (±1.52)
V_d/F	(mL)	3545.42 (±13141.47)	4972.87 (± 2774.2)	2281.56 (± 2736)
Cl/F	(mL/min)	89.11 (±18.42)	63.38 (± 2.40)	0.361 (± 0.13)
TMR	(h)	2.07 (± 2.33)	2.52 (± 0.78)	19.36 (±3.68)
F	-	1	5.6	10.37

Valores promedio (±DE).$C_{máx}$, concentración plasmática máxima; $T_{máx}$, tiempo para alcanzar $C_{máx}$; $ABC_{0\text{-}inf}$, área bajo la curva contra tiempo; k_e, constante de eliminación; $t_{1/2e}$, vida media de eliminación; Vd/F, volumen de distribución aparente; Cl/F, depuración aparente total; TMR, tiempo medio de residencia; F, fracción absorbida.

En cuanto al análisis compartimental, Tabla 11, se observan las mismas tendencias de incremento y decremento en los parámetros ya explicados previamente. Agregándose a estos parámetros el criterio de Akaike (AIC), este permite establecer la calidad relativa de un modelo estadístico, para tomarlo en cuanta como un criterio viable, este debe ser un número pequeño o incluso negativo y ser parecido con la suma de cuadrados (SC), los cuales como se muestra en la tabla, coinciden con los criterios de aceptación establecidos.

En esta tabla se suma además la K_a y el $t_{1/2a}$, los cuales no pueden ser establecidos en el modelaje no compartimental. Se observa que en el grupo 2, el efecto de duplicar la dosis genera una K_a más rápida, con respecto al grupo 1, debido al metabolismo propio de las ratas, mientras que su $t_{1/2a}$, disminuye posiblemente por la cantidad de fármaco administrado. Mientras que en el grupo 3, la K_a es menor al grupo 1 al que se le administró la $D_{ref,}$ porque las NP's permiten una liberación controlada del fármaco y por tanto mayor tiempo de absorción. Con respecto a la F, el grupo 2 no tiene un aumento significativo comparado con la D_{ref} en contraste con el grupo 3 en la cual la BDr es 15.03 veces mayor que el grupo 1.

Estos resultados permiten observar que la formulación nanoparticulada de NTZ, tiene amplias ventajas versus la NTZ sin formulación.

Tabla 11. Modelaje compartimental de las tres administraciones vía oral

	Unidades	NTZ sin formular	NTZ formulada en NP's

Parámetros Farmacocinéticos		Grupo 1 (n=2) 7.5 mg/Kg	Grupo 2 (n=2) 15 mg/Kg	Grupo 3 (n=3) 6.0 mg/Kg
$C_{máx}$	(µg/mL)	0.204 (± 0.190)	0.306 (± 0.203)	0.104(±0.04)
$T_{máx}$	(min)	28.63 (± 11.61)	4.75 (± 13.17)	341.57 (± 67.9)
ABC_{0-inf}	[(µg/mL)*min]	15.93 (± 2.96)	70.3 (± 107.27)	191.97 (± 55.9)
K_e	(1/min)	0.034 (± 0.0223)	0.0044 (± 0.006)	0.0007 (±0.0001)
$t_{1/2e}$	(h)	0.33 (± 2.35)	2.6 (± 7.82)	16.8 (±4.88)
V_d/F	(mL)	3402.17 (± 18345.05)	11988.18 (± 8450.87)	11312.19 (± 8315.8)
Cl/F	(mL/min)	117.72 (± 10.4)	53.33(± 37.88)	0.33 (±.0.10)
K_a	(1/min)	0.035 (± 0.028)	1.17 (± 0.79)	0.0078 (± 0.004)
$t_{1/2a}$	(h)	1.17 (±1.78)	0.33 (± 0.21)	1.48 (± 0.55)
AIC	(±)	-12.03 (±27.07)	-26.83 (±16.37)	-60.46 (± 23.65)
SC	(±)	-12.19 (± 27.07)	-26.60 (±16.37)	-58.34 (±23.65)
F	-	1	1.7	15.03

Valores promedio (±DE).$C_{máx}$, concentración plasmática máxima; $T_{máx}$, tiempo para alcanzar $C_{máx}$; $ABC0_{-inf}$, área bajo la curva contra tiempo; k_e, constante de eliminación; $t_{1/2e}$, vida media de eliminación; Vd/F, volumen de distribución aparente; Cl/F, depuración aparente total; TMR, tiempo medio de residencia; K_a, constante de absorción; $t_{1/2a}$, tiempo de vida media de absorción; AIC, criterio de Akaike; SC, suma de cuadrados; F, fracción absorbida.

IX. CONCLUSIONES

1. Se desarrolló un método bioanalítico mejorado, confiable, sensible, selectivo basado en CLAR, para la determinación de TIZ y sus nanoformulaciones en plasma humano y de ratas.

2. El analito cuantificable es TIZ, ya que por el metabolismo propio de NTZ en presencia de plasma, no es posible cuantificarle, el método mostró sensibilidad y especificidad para la cuantificación de este metabolito.

3. Se validó el método de cuantificación del TIZ por CLAR, el cual cumplió con los requisitos de validación establecidos por la Guía de métodos bioanalíticos de la FDA, con una linealidad > 0.99, precisión y exactitud con coeficientes de variación menores al 15 %.

4. El método desarrollado puede ser útil en investigaciones farmacocinéticas en humanos, así como en el análisis de NTZ sin formulación o con formulaciones que contengan NTZ como componente principal.

5. Al realizar la comparación de los perfiles farmacocinéticos, el comportamiento de NTZ sin formular, contra el de NTZ formulada en Np’s, muestran diferencias significativas en cuanto a tiempos de eliminación, absorción, tiempo medio de residencia y áreas bajo la curva.

6. El modelaje no compartimental de ambas administraciones, confirman lo observado en los perfiles, permitiendo obtener datos primarios que nos dan un acercamiento a los

valores estimados por otros autores. K_a y t ½$_a$, no se ven reflejados en el análisis no compartimental realizado por el Winonlin®, y cuyos valores deben ser evaluados por el análisis compartimental permite observar estos datos.

7. Los parámetros farmacocinéticos del modelaje compartimental muestran de forma concreta que la administración de NTZ formulada en NP´s, tiene una F 15 veces mayor con respecto a la D_{ref}, además de una K_e 50 veces menor, lo que indica que este se elimina de forma más lenta, concordando con su alto TMR, permitiendo que se mantenga más tiempo en el organismo, manteniendo así un efecto terapéutico más prolongado con una dosis menor a la D_{ref}. Estos datos indican que la NTZ formulada en Np's, podría considerarse como una nueva alternativa de tratamiento contra enfermedades de etiología viral debido a que alcanza concentraciones plasmáticas mayores a las reportadas en otros trabajos de investigación y se mantienen por mayor tiempo dentro del organismo.

X. PERSPECTIVAS

1. Desarrollar una forma farmacéutica que permita la administración de la NTZ formulada en Np’s de forma dirigida, para facilitar su administración, garantizando la solubilidad de las nanopartículas.

XI. REFERENCIAS

1. **Ayllón Valdés, L., Valdivia Romero, Á., Mas García, M., Trespalacios Brey, L., & Cordero López, G.** (2006). Algunos aspectos básicos de evolución de virus ARN: importancia médica. *Revista Cubana de Investigaciones Biomédicas*, 25(3). Recuperado el 4 de febrero de 2025, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0864-03002006000300008&lng=es&tlng=es.
2. **Perez-Padilla, R.** (2008). Hidden respiratory disease-associated deaths. *International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*, 12(4), 458–464. Recuperado de https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18371275/
3. **Sollano Trejo, O. A**. (2022). Enfermedades virales en México. *Espacio I+D, Innovación más Desarrollo*, 11(30). Recuperado de https://espacioimasd.unach.mx/index.php/Inicio/article/view/309
4. **Li Q, Guan X, Wu P, Wang X, Zhou L, Trong Y et al.** Early transmission dynamics in wuhan, china, of novel coronavirus-infected pneumonia. *N Engl J Med*. 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2001316
5. **Zhu N, Zhang D, Wang W, Li X, Yang B, Song J**. A novel coronavirus from patients with pneumonia in China, 2019. *N Engl J Med*. 2020. doi: 10.1056/NEJMoa2001017
6. **Zhou P, Yang XL, Wang XG, Hu B, Zhang L, Zhang W et al**. A pneumonia outbreak associated with a new coronavirus of probable bat origin. *Nature*. 2020. [Internet]. Available in: https://doi.org/10.1038/s41586-020-2012-7
7. COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). https://www.arcgis.com/apps/dashboards/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6
8. **Centro de Salud Global. (s.f.).** *Plan de gestión a largo plazo para el control de la COVID-19.* Gobierno de México. Recuperado el 4 de febrero de 2025, de https://www.gob.mx/csg/articulos/plan-de-gestion-a-largo-plazo-para-el-control-de-la-covid-19
9. **Kumar, A., Narayan, R. K., Prasoon, P., Kumari, C., Kaur, G., Kumar, S., Kulandhasamy, M., Sesham, K., Pareek, V., Faiq, M. A., Pandey, S. N., Singh, H. N., Kant, K., Shekhawat, P. S., Raza, K., & Kumar, S.** (2021). COVID-19 mechanisms in the human body—What we know so far. *Frontiers in Immunology, 12*, 693938. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.693938
10. **Zhu, X., Liu, Q., Du, L., & Jiang, S. (2013). Receptor-binding domain as a target for developing severe acute respiratory syndrome vaccines. *Journal of Thoracic Disease, 5*(Suppl 2), S142–S148. https://doi.org/10.3978/j.issn.2072-1439.2013.06.03 Díaz A., P. V., & Avendaño C., L. F.** (2017). El virus respiratorio sincicial: patógeno de niños… y de grandes. *Revista Chilena de Enfermedades Respiratorias, 33*, 293–302. https://doi.org/10.4067/S0717-73482017000400005
11. **DeVincenzo, J. P., Boeckh, M., Bont, L., Crowe, J. E., Jr., Griffiths, P., et al.** (2015). Challenges and opportunities in developing respiratory syncytial virus therapeutics. *The Journal of Infectious Diseases, 211*(suppl 1), S1–S20. https://doi.org/10.1093/infdis/jiu828
12. **Rey-Jurado, E., Soto, J., Gálvez, N., & Kalergis, A. M.** (2017). A safe and efficient BCG vectored vaccine to prevent the disease caused by the human respiratory syncytial virus. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*. https://doi.org/10.1080/21645515.2017.1392033
13. **Glenn, G. M., Fries, L. F., Thomas, D. N., Smith, G., Kpamegan, H., Lu, H., Flyer, D., et al.** (2016). A randomized, blinded, controlled, dose-ranging study of a respiratory syncytial virus recombinant fusion (F) nanoparticle vaccine in healthy women of childbearing age. *The Journal of Infectious Diseases, 213*, 411–420. https://doi.org/10.1093/infdis/jiv478
14. **Solórzano-Santos, F., & Miranda-Novales, M. G.** (2009). Influenza. *Boletín Médico del Hospital Infantil de México, 66*(5), 461–473.
15. **Opfer, L. H.** (2009). El virus de la influenza. *Acta Pediátrica Costarricense, 21*(1), 5–7. https://doi.org/ISSN 1409-0090
16. **Amarelle, L., Lecuona, E., & Sznajder, J. I.** (2017). Tratamiento antigripal: fármacos actualmente utilizados y nuevos agentes en desarrollo. *Archivos de Bronconeumología, 53*(1), 19–26. https://doi.org/10.1016/j.arbres.2016.07.004
17. **World Health Organization (WHO).** (2009, June 11). *World now at the start of 2009 influenza pandemic: Statement to the press by WHO Director-General Dr. Margaret Chan.* Recuperado el 04 de octubre de 2024, de http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2009/h1n1_pandemic_phase6_20090611/en/index.html
18. **Kilbourne, E. D.** (2004). Influenza pandemics: Can we prepare for the unpredictable? *Viral Immunology, 17*, 350–357. https://doi.org/10.1089/vim.2004.17.350
19. **Hayden, F. G.** (2006). Antivirals for influenza: Historical perspectives and lessons learned. *Antiviral Research, 71*, 372–378. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2006.04.002
20. **Shiraishi, K., Mitamura, K., Sakai-Tagawa, Y., Goto, H., Sugaya, N., & Kawaoka, Y.** (2003). High frequency of resistant viruses harboring different mutations in amantadine-treated children with influenza. *Journal of Infectious Diseases, 188*(1), 57–61. https://doi.org/10.1086/375799

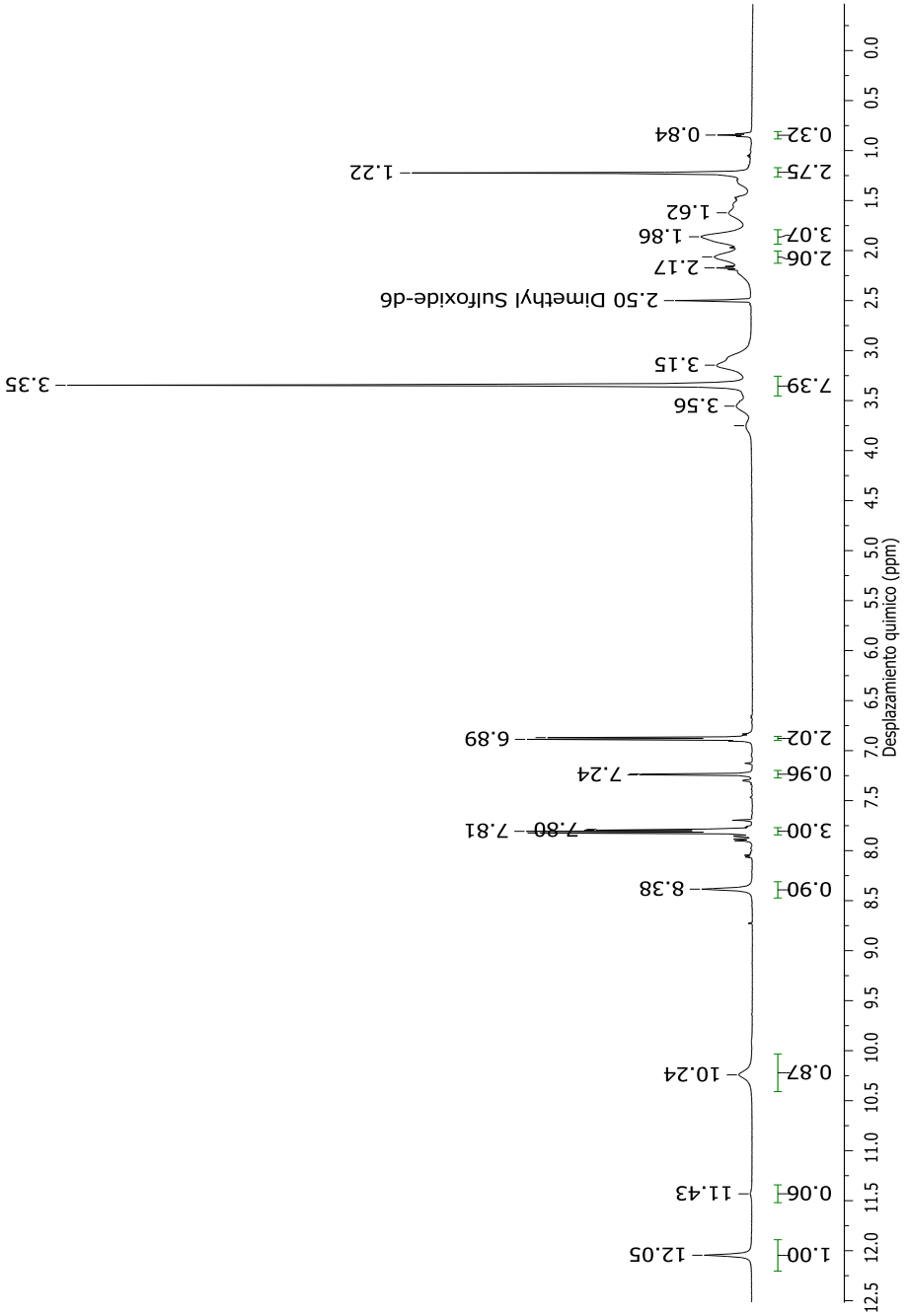
21. **Jefferson, T., Demicheli, V., Rivetti, D., Jones, M., Di Pietrantonj, C., & Rivetti, A.** (2006). Antivirals for influenza in healthy adults: systematic review. *The Lancet, 367*(9507), 303–313. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)67970-1
22. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC).** (s. f.). *Antiviral agents for influenza: Background information for clinicians.* Recuperado el 6 de febrero de 2025, de http://www.cdc.gov/flu/professionals/antiviralback.htm
23. **Kawai, N., Ikematsu, H., Iwaki, N., Maeda, T., Kanazawa, H., Kawashima, T., et al.** (2008). A comparison of the effectiveness of zanamivir and oseltamivir for the treatment of influenza A and B. *Journal of Infection, 56*(1), 51–57. https://doi.org/10.1016/j.jinf.2007.10.008
24. **Sugaya, N., Tamura, D., Yamazaki, M., Ichikawa, M., Kawakami, C., Kawaoka, Y., et al.** (2008). Comparison of the clinical effectiveness of oseltamivir and zanamivir against influenza virus infection in children. *Clinical Infectious Diseases, 47*(3), 339–345. https://doi.org/10.1086/589748
25. **Instituto Nacional de Salud Pública (INSP).** (s. f.). *Existen cinco virus causantes de la hepatitis.* Recuperado el 6 de febrero de 2025, de https://www.insp.mx/avisos/existen-cinco-virus-causantes-de-la-hepatitis
26. **Peña, A.** (2002). Hepatitis viral aguda. *Revista Chilena de Pediatría, 73*(2), 173–175. https://doi.org/10.4067/S0370-41062002000200011
27. **Organización Panamericana de la Salud (OPS).** (s. f.). *Hepatitis.* Recuperado el 6 de febrero de 2025, de https://www.paho.org/es/temas/hepatitis
28. **Moreno, D., Alegre, F., & García-González, N.** (2004). Virología, epidemiología y mecanismos de transmisión del VHB. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra, 27*(Supl. 2), 7–16. Recuperado el 7 de febrero de 2025, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272004000400002&lng=es&tlng=es
29. **Organización Mundial de la Salud (OMS).** (s. f.). *Hepatitis B.* Recuperado el 7 de febrero de 2025, de https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-b
30. **Romero, G.** (2008). Hepatitis B. *Gen, 62*(1), 68–73. Recuperado el 6 de diciembre de 2024, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0016-35032008000100019&lng=es&tlng=es
31. **Higuera-de-la-Tijera, F., Castro-Narro, G. E., Velarde-Ruiz Velasco, J. A., Cerda-Reyes, E., Moreno-Alcántar, R., Aiza-Haddad, I., Castillo-Barradas, M., Cisneros-Garza, L. E., Dehesa-Violante, M., Flores-Calderón, J., González-Huezo, M. S., Márquez-Guillén, E., Muñóz-Espinosa, L. E., Pérez-Hernández, J. L., Ramos-Gómez, M. V., Sierra-Madero, J., Sánchez-Ávila, J. F., Torre-Delgadillo, A., Torres, R., … Wolpert-Barraza, E.** (2021). Asociación Mexicana de Hepatología A.C. Guía Clínica de Hepatitis B. *Revista de Gastroenterología de México, 86*(4), 403–432. https://doi.org/10.1016/j.rgmx.2021.04.002
32. **Ortega Quiroz, R., & Garzón O, M. A.** (2009). Tratamiento de la hepatitis B. *Revista Colombiana de Gastroenterología, 24*(Suppl. 1), 21s–32s. Recuperado el 6 de febrero de 2025, de http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0120-99572009000500005&lng=en&tlng=es
33. **Asociación Catalana de Hepatitis (ASSCAT).** (s. f.). *Fármacos disponibles para el tratamiento de la hepatitis B.* Recuperado el 6 de febrero de 2025, de https://asscat-hepatitis.org/hepatitis-viricas/hepatitis-b/tratamiento-de-la-hepatitis-b/farmacos-disponibles-para-el-tratamiento-de-la-hepatitis-b/
34. **Levrero, M., Pollicino, T., Petersen, J., Belloni, L., Raimondo, G., & Dandri, M.** (2009). Control of CccDNA function in hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology, 51*(4), 581–592. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.022
35. **Livingston, C. M., Ramakrishnan, D., Strubin, M., Fletcher, S. P., & Beran, R. K.** (2017). Identifying and characterizing interplay between hepatitis B virus X protein and Smc5/6. *Viruses, 9*(4), 69. https://doi.org/10.3390/v9040069
36. **Keasler, V. V., Hodgson, A. J., Madden, C. R., & Slagle, B. L.** (2007). Enhancement of hepatitis B virus replication by the regulatory X protein in vitro and in vivo. *Journal of Virology, 81*(6), 2656–2662. https://doi.org/10.1128/jvi.02020-06
37. **Lucifora, J., Arzberger, S., Durantel, D., Belloni, L., Strubin, M., Levrero, M., Zoulim, F., Hantz, O., & Protzer, U.** (2011). Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *Journal of Hepatology, 55*(5), 996–1003. https://doi.org/10.1016/j.jhep.2011.02.015
38. **Sitterlin, D., Lee, T.-H., Prigent, S., Tiollais, P., Butel, J. S., & Transy, C.** (1997). Interaction of the UV-damaged DNA-binding protein with hepatitis B virus X protein is conserved among mammalian hepadnaviruses and restricted to transactivation-proficient X-insertion mutants. *Journal of Virology, 71*(5), 3417–3423. https://journals.asm.org/journal/jvi
39. **van Breugel, P. C., Robert, E. I., Mueller, H., Decorsiè, A., Zoulim, F., Hantz, O., & Strubin, M.** (2012). Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. *Hepatology, 56*(5), 1472–1480. https://doi.org/10.1002/hep.25928
40. **Tsukuda, S., & Watashi, K.** (2020). Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Research, 180*, 104925. https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2020.104925

41. **Kershenobich, D., Dehesa, M., Aguilar, L. M., Aguilar, R., & Ariza, A.** (2011). La hepatitis C como un problema de salud pública en México. *Salud Pública de México, 53*(1), s61–s67.
42. **Thomas, D. L., & Seeff, L. B.** (2005). Natural history of hepatitis C. *Clinical Liver Disease, 9*(3), 383–398. https://doi.org/10.1016/j.cld.2005.05.003
43. **Lingala, S., & Ghany, M. G.** (2015). Natural history of hepatitis C. *Gastroenterology Clinics of North America, 44*(4), 717–734. https://doi.org/10.1016/j.gtc.2015.07.003
44. **Alomía, J. L., Nucamendi, G., Gutiérrez, J. J., Macías, H., & Vargas, M.** (2019). *Informe epidemiológico anual de vigilancia epidemiológica de hepatitis virales, México 2019*. Dirección General de Epidemiología.
45. **Panduro, A., Escobedo Meléndez, G., Fierro, N. A., Ruiz Madrigal, B., Alfonso Zepeda-Carrillo, E., Sc, M., & Román, S.** (2011). Epidemiología de las hepatitis virales en México. *Salud Pública de México, 53*(1), s37–s45.
46. **Diago, M.** (2008). Treatment of hepatitis C virus infection: Current status and perspectives. *Gastroenterología y Hepatología, 31*(9), 596–605. https://doi.org/10.1157/13128300
47. **Morisco, F., Granata, R., Stroffolini, T., Guarino, M., Donnarumma, L., Gaeta, L., Loperto, I., Gentile, I., Auriemma, F., & Caporaso, N.** (2013). Sustained virological response: A milestone in the treatment of chronic hepatitis C. *World Journal of Gastroenterology, 19*(18), 2793–2798. https://doi.org/10.3748/wjg.v19.i18.2793
48. **Girón-González, J. A., Márquez, M. J., Márquez, M., Corchado, S., Soto, M. J., Martín-Aspas, A., Montes de Oca, M., Guerrero, F., & Fernández-Gutiérrez, C.** (2012). La valoración de RNA del virus de la hepatitis C realizada a las 12 semanas de finalizar el tratamiento predice la respuesta virológica sostenida en enfermos con coinfección por VIH y VHC. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica, 30*(1), 15–17. https://doi.org/10.1016/j.eimc.2011.07.005
49. **Mahale, P., Engels, E. A., Li, R., Torres, H. A., Hwang, L. Y., Brown, E. L., & Kramer, J. R.** (2018). The effect of sustained virological response on the risk of extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *Gut, 67*(3), 553–561. https://doi.org/10.1136/gutjnl-2017-313983
50. **Pearlman, B. L., & Traub, N.** (2011). Sustained virologic response to antiviral therapy for chronic hepatitis C virus infection: A cure and so much more. *Clinical Infectious Diseases, 52*(7), 889–900. https://doi.org/10.1093/cid/cir076
51. **Scheel, T. K. H., & Rice, C. M.** (2013). Understanding the hepatitis C virus life cycle paves the way for highly effective therapies. *Nature Medicine, 19*(7), 837–849. https://doi.org/10.1038/nm.3248
52. **Cabrera-Sánchez, C. F., Sánchez-Godínez, J. Y., & González, Y.** (2021). Fármacos de reposicionamiento y fármacos específicos en fase preclínica para la COVID-19. *Neumología y cirugía de tórax, 80*(4), 258-268. https://doi.org/10.35366/103451
53. **Cohen, S. A.** (2005). Use of nitazoxanide as a new therapeutic option for persistent diarrhea: A pediatric perspective. *Current Medical Research and Opinion, 21*(7), 999-1004. https://doi.org/10.1185/030079905X50534
54. **Romero-Cabello, R., & Romero-Feregrino, R.** (2021). Uso de nitazoxanida en infecciones virales. *Revista Latinoamericana de Infectología Pediátrica, 34*(2), 94-99. https://doi.org/10.35366/100548
55. **Rossignol, J.-F.** (2016). Nitazoxanide, a new drug candidate for the treatment of Middle East respiratory syndrome coronavirus. *Journal of Infection and Public Health, 9*(3), 227-230. https://doi.org/10.1016/j.jiph.2016.04.001
56. **Cortés Núñez, S.** (2023). *Desarrollo de un nanosistema polimérico con nitazoxanida con actividad antiviral* (Tesis de maestría, Universidad Autónoma del Estado de Morelos).
57. **Hemphill, A., Mueller, J., & Esposino, M.** (2006). Nitazoxanide, a broad-spectrum thiazolide anti-infective agent for the treatment of gastrointestinal infections. *Expert Opinion on Pharmacotherapy, 7*(7), 953–964. https://doi.org/10.1517/14656566.7.7.953
58. **Salas-Zúñiga, R., Rodríguez-Ruiz, C., Höpfl, H., Morales-Rojas, H., Sánchez-Guadarrama, O., Rodríguez-Cuamatzi, P., & Herrera-Ruiz, D.** (2020). Dissolution advantage of nitazoxanide cocrystals in the presence of cellulosic polymers. *Pharmaceutics, 12*(1). https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12010023
59. **Bharti, C., Nagaich, U., Pandey, J., Jain, S., & Jain, N.** (2020). Development of nitazoxanide-loaded colon-targeted formulation for intestinal parasitic infections: Centre composite design-based optimization and characterization. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences, 6*(1). https://doi.org/10.1186/s43094-020-00130-1
60. **Fox, L. M., & Saravolatz, L. D.** (2005). Nitazoxanide: A new thiazolide antiparasitic agent. *Clinical Infectious Diseases, 40*, 1173–1180.
61. **Matysiak-Budnik, T., Mégraud, F., & Heyman, M.** (2010). In-vitro transfer of nitazoxanide across the intestinal epithelial barrier. *Journal of Pharmacy and Pharmacology, 54*(10), 1413–1417. https://doi.org/10.1211/002235702760345518
62. **Asociación Española de Pediatría.** (2020). *Ficha técnica Nitazoxanida*. Recuperado de https://www.aeped.es/comite-medicamentos/pediamecum/nitazoxanida

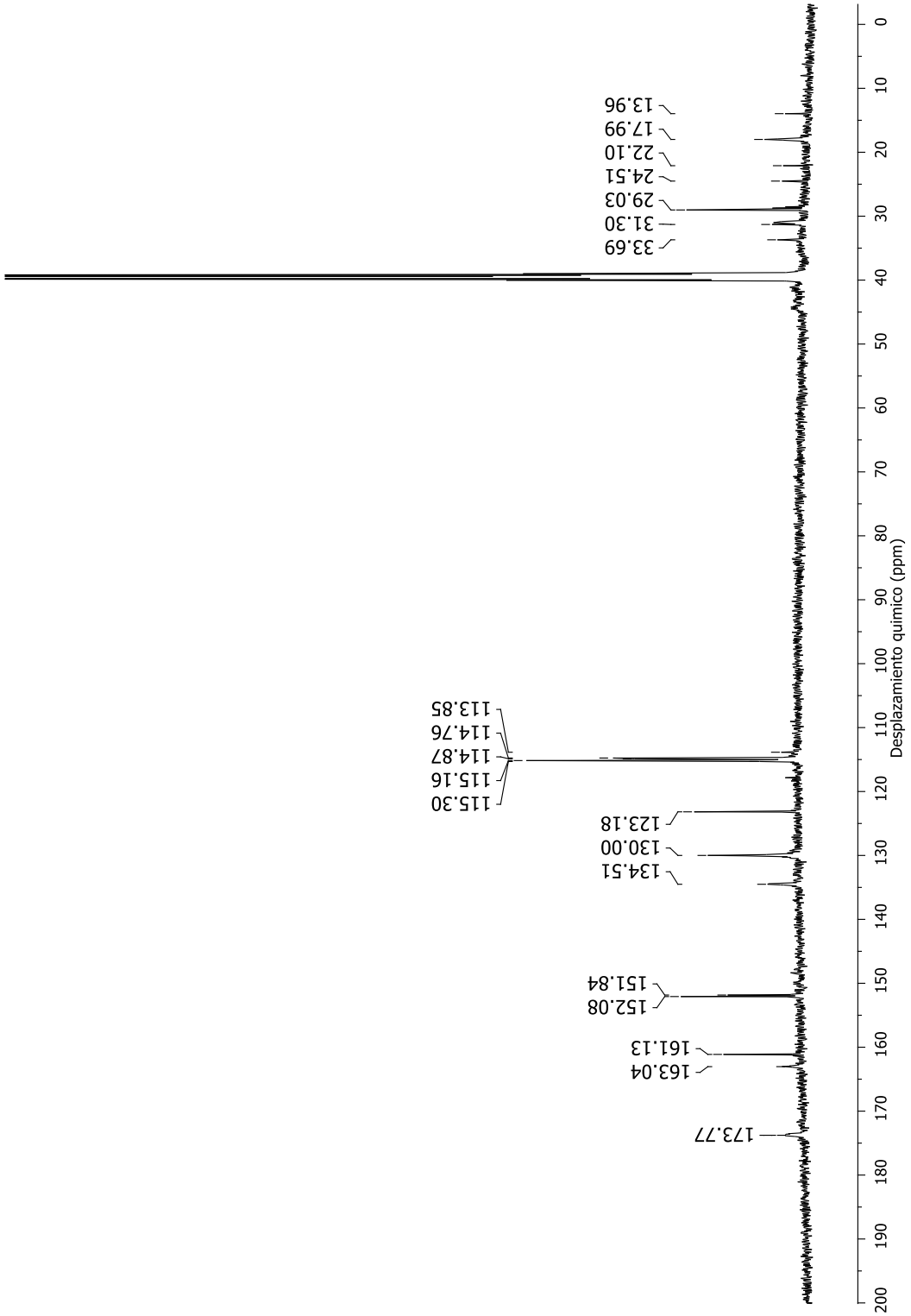
63. **Farmacia Informativa**. (2018, 13 de julio). Nitazoxanida: Qué es, para qué sirve, nombre comercial y más. *Farmacia Informativa*. https://farmaciainformativa.com/nitazoxanida/
64. **García-Tuñón, L., & al.** (2006). Nitazoxanide: A review of its pharmacokinetics and therapeutic efficacy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 50*(3), 730-737. https://doi.org/10.1128/AAC.50.3.730-737.2006
65. **Van der Horst, C.** (2007). Pharmacology of Nitazoxanide: A review. *International Journal of Antimicrobial Agents, 29*(6), 515-519. https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2007.01.013
66. **MegaLabs. (n.d.).** *Nitazoxanida*. Recuperado el 7 de febrero de 2025, de https://megalabs.global/nitazoxanida/**Salgado Bahena, E.** (2023). Desarrollo y caracterización de nanopartículas poliméricas cargadas con tizoxanida por el método de emulsión (Tesis de licenciatura, Universidad Autónoma del Estado de Morelos).
67. **Rodríguez Carranza, R. (Ed.)**. (2015). Nitazoxanida: Antiprotozoarios • antiamebianos. En Vademécum Académico de Medicamentos. McGraw Hill. Recuperado de https://accessmedicina.mhmedical.com/content.aspx?bookid=1552&sectionid=90373573
68. **Franco-Pérez, J., Gallegos-Pérez, J. L., Calderón-González, K. G., Franco-Pérez, J., & Jung-Cook, H**. (2009). Sensitive high performance liquid chromatographic assay for nitazoxanide metabolite in plasma. *International Journal of Pharmaceutics*, 364(1–2), 119–122. https://doi.org/10.1691/ph.2009.9041
69. **Hadad, G. M., Abdel Salam, R. A., & Emara, S.** (2012). Determinación validada y optimizada por cromatografía líquida de alta resolución del tizoxanida, el principal metabolito activo de la nitazoxanida en orina humana, plasma y leche materna. *Journal of Chromatographic Science, 50*(6), 509–515. https://doi.org/10.1093/chromsci/bms041
70. **Shalan, S., Nasr, J. J., & Belal, F.** (2014). Determinación de tizoxanida, el metabolito activo de la nitazoxanida, mediante cromatografía líquida micelar utilizando una columna monolítica. Aplicación a estudios farmacocinéticos. *Analytical Methods, 6*(21), 8682–8689. https://doi.org/10.1039/C4AY00310A
71. **Geng, M., Lin, A., & Nguyen, T. P.** (2020). Revisiting Antiarrhythmic Drug Therapy for Atrial Fibrillation: Reviewing Lessons Learned and Redefining Therapeutic Paradigms. *Frontiers in Pharmacology, 11*, 581837. https://doi.org/10.3389/fphar.2020.581837
72. **Nair, L. S., & Laurencin, C. T**. (2007). Nanotechnology and Nanomaterials in the Biomedical Field. *The Journal of Biomedical Nanotechnology, 3*(4), 1-16. https://doi.org/10.1166/jbn.2007.007
73. **Abbasalipourkabir, R., Fallah, M., Sedighi, F., Maghsood, A. H., & Javid, S**. (2016). Nanocapsulación de nitazoxanida en nanopartículas de lípidos sólidos como un nuevo sistema de liberación de fármacos y estudio de liberación in vitro. *Journal of Biological Sciences, 16*(4), 120–127. https://doi.org/10.3923/jbs.2016.120.127
74. **FDA.** (2018). *Bioanalytical method validation: Guidance for industry*. U.S. Food and Drug Administration. https://www.fda.gov/regulatory-information/search-fda-guidance-documents/bioanalytical-method-validation-guidance-industry
75. Diario Oficial de la Federación (DOF). (2023, 15 de septiembre). *Acuerdo por el que se modifica la Norma Oficial Mexicana NOM-177-SSA1-2013, para la validación de métodos bioanalíticos*. https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5702018&fecha=15/09/2023#gsc.tab=0

XII. ANEXOS

12.1. Comprobación de identidad de NFX



Espectro monodimensional de ^{1}H de RMN para identidad de NFX.



Espectro monodimensional de ^{13}C de RMN para identidad de NFX.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

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

Nombre del alumno: Zaira Aidee Hernández Aceves

Título de la tesis: Evaluación de la biodisponibilidad relativa de una formulación nanoparticulada de nitazoxanida utilizando un modelo murino

Grado a obtener:

x Maestría en Farmacia
____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Julio César Rivera Leyva**

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

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

E-Firma UAEM
Dr. Julio César Rivera Leyva

05 de mayo de 2025
Fecha

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 ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JULIO CESAR RIVERA LEYVA | Fecha:2025-04-28 13:33:18 | FIRMANTE

mckP7634CFvmN2hdiMKbvOvKSMYDozmzLY9zKd6dOtrYBQzU/YjmFGbymdQn5q86KGEA6uN73JNgVshYPbKLWFbNOSrmFnOi+rKkfzlnAvLw7b1HHDISvKX+sUh+mTd44camQx55Tmn3Q+07ko1JXkr6rZSwuuLuQZ1m4zYty7IhlI/lJTpXE+L0tJ6qXhj99D/5wy9d1QfS1aa+qBXh7SpDzdhf6oe2sclKRb0617W2rekPB7q2P2DP/eB0YQPHIVSjI1m+4LDFJA5JTGGNJgPog3POZhH1dd7Fnzc9WEj+AFzjmR9+fPaAFaTxVKLPWxalTYXxnxdvIzPBDxU8oQ==

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

MnY6iAojU

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/ypyFFbZJ3LLWgiWqVlOOwO5cT4tuaNrU

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

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

Nombre del alumno: Zaira Aidee Hernández Aceves

Título de la tesis: Evaluación de la biodisponibilidad relativa de una formulación nanoparticulada de nitazoxanida utilizando un modelo murino

Grado a obtener:

x Maestría en Farmacia
____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez**

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

La tesis:

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

E-Firma UAEM
Dr. Juan Gabriel Navarrete Vázquez

05 de mayo de 2025
Fecha

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 ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JUAN GABRIEL NAVARRETE VAZQUEZ | Fecha:2025-04-28 13:34:02 | FIRMANTE

Goq/m3fbH+3Xf1Q1E53hqNSqplyxCA+RDbeYwzvPx0MtxTVoLteC1nKZIyC4kOfqNsr+KIpWO7/zSjVg8uMaM6BYDKXKnokaUY47M+v2eqnUVUyI1y9trCZeYCTdDxqSPTBBylp
VDKFHZkLGPGSMzo+87yu1JySgdmjCfCQBSXyjYmVTTt7lseybGherulxUQCjDKJYHIv5DxIPexd2YyJhpQy7+wKTJxQP4O/cBB+eAR0sYcLYccTxFoF7OcWy1yEg4s0n2uM1z6Z
4V+3k7CCkElVyd+zIbzEZsqath6zr3md4+CHvBN/EoCPw+rW94ATVOhny48TTkoXF6k2i+IQ==

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

Ni5OqIwkZ

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/M2mUnKedzhhnMQCMuLmnZSMODZUxifSv

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

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

Nombre del alumno: Zaira Aidee Hernández Aceves

Título de la tesis: Evaluación de la biodisponibilidad relativa de una formulación nanoparticulada de nitazoxanida utilizando un modelo murino

Grado a obtener:

x Maestría en Farmacia
____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Juan Manuel Martínez Alejo**

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

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

E-Firma UAEM
Dra. Verónica Rodríguez López

11 de abril de 2025
Fecha

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 ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

JUAN MANUEL MARTINEZ ALEJO | Fecha:2025-04-15 16:46:40 | FIRMANTE

THM62agV0twpLtCi9Ub7t5/QA05pOm7VldXskxbnQWJAKxfLx3yAlQkmq3M1Hs+LQX2tzVT+YHivNq7UAI4/TyHG2CbiB9gKEo8h8REffAsA+Oc0nDu0lcm/7gy84p7J/TKEkcj1oQqmEyoMnJg2tgm3oJo2yk9+qcGF8Djk37jqVWo2g8hG2y7QHdoQjTJ5ZVWpjvwx90s3YVj5bh3VqZWpapyOQfeqDGpFo6eMcJyTWP1RhoXNkplznzBHJkqRdV3QQ5A8xpro1NvGBJVcv5cbLo3UDEdfOwu9H4gzzk8qiHwfLJR/Efl8danQVvTCgYem3zVJacXOgcsAOd+xYQ==

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

vIGuOhyWt

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/7sj8TVxRAuIRE54B3m4v0Jv6UujQzBiX

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

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

Nombre del alumno: Zaira Aidee Hernández Aceves

Título de la tesis: Evaluación de la biodisponibilidad relativa de una formulación nanoparticulada de nitazoxanida utilizando un modelo murino

Grado a obtener:

x Maestría en Farmacia
____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dr. Leobardo Reyes Velasco**

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

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

E-Firma UAEM
Dr. Leobardo Reyes Velasco

05 de mayo de 2025
Fecha

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 ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

LEOBARDO REYES VELASCO | Fecha:2025-05-09 23:00:46 | FIRMANTE

lr8Ukmu3hbmUi/BatMwPdAGDVm0e8KqR+pRSggG1gQ7ai8ZSu7hZzds9io39COVNRx+ouyqzIlOoDb9+xy34e7+TuzkJbIiAuD7qsMNDID/cPR6e9Shho35XDwL/kGZtdtKNmRCjg
ZCNRykxlYvCWJyCcrd1lkPd2inv0MfKdAOeUpPKwGbHbDHh6XFISwwbaJUQ3e6qqeOXV4ZTBmQZyfhf7DGW3J6uLcGI5FN5t3GVMcgI03T3fXeKNfZq5jVAbf1Uoq6pgFYLGSc
rNgzt8+tz89cdWzikj/+41UHIKKLqn6vnWfJh0Ow85D/s3BmtpdpVLtBIaGF1BpXI+1s1oA==

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

Clevm2Vk4

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/beEIk4NPPzB2os7y5yRPdMk4fPKBZwyX

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

Facultad de Farmacia
Conocimiento al servicio de la salud

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

Nombre del alumno: Zaira Aidee Hernández Aceves

Título de la tesis: Evaluación de la biodisponibilidad relativa de una formulación nanoparticulada de nitazoxanida utilizando un modelo murino

Grado a obtener:

x Maestría en Farmacia
____ Doctorado en Farmacia

Miembro del jurado: **Dra. Verónica Rodríguez López**

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

X Sí, se aprueba tal como se presenta
____ Se rechaza

Observaciones (solo en caso de rechazo): _____

E-Firma UAEM
Dra. Verónica Rodríguez López

11 de abril de 2025
Fecha

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 ÓRGANÓ INFORMATIVO UNIVERSITARIO "ADOLFO MENÉNDEZ SAMARÁ" número 117 de fecha 20 de abril de 2021.

Sello electrónico

VERONICA RODRIGUEZ LOPEZ | Fecha:2025-04-11 14:15:31 | FIRMANTE

XKMWof273ZLsGnag6yE5aqMgFHOItYGrjV60ZsAXS5W5y4c+FENxLPEZ7FZCVw2lYlgScxz2IPHEZS1Ec8iapllEiJUKZzvvuzW+yKoUVW7aGEeCsMPDYYiyvgupYBXKBQJ9/5Ie+0zw4B4hoRJU1OMtEec7VKnpi8LrQZk/4Q7eiefcGlvDhs9rQvpPQDTlxWfAi2wEsGXCX8KtILn54QnCe2fertLFsY+0AbuSbWgOlTX7Xvzu7ESd8FxAnhDaGViw0mrgnO/87jrpJNL6A1KLoueWt8DmYQDstn9oN3DtZNuhDtZp5nQUhwg18+nFg9yebJ3jjaiYy/VzCrAoOA==

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

aWBVJRbys

https://efirma.uaem.mx/noRepudio/suP8z0ZBhOyImgNg1NSmrJubsxcIOFVh