



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS QUÍMICAS

“ESTUDIO FARMACOCINÉTICO Y NEUROFARMACOCINÉTICO
DE LA COMBINACIÓN DE ALBENDAZOL Y NITAZOXANIDA
EN PLASMA Y LÍQUIDO CEFALORRAQUÍDEO”

TESIS
PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA

Q.F.B. María Isabel Ruiz Olmedo



TUTOR: Dra. Helgi Jung Cook

AÑO: 2011



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

AGRADECIMIENTOS

A mi escuela, la *Universidad Nacional Autónoma de México*
Facultad de Química

- Agradezco especialmente a mi asesora, *Dra. Helgi Jung Cook*, haberme guiado en el camino del conocimiento y del aprendizaje. Solo un comentario más, usted para mí es la mejor maestra que he conocido.
- Al *Dr. José Luis Gallegos*, gracias por tus sugerencias y todo el inmenso apoyo que me brindaste para el desarrollo de mi proyecto doctoral.
- A todos los miembros de mi comité tutelar: *Dra. del Razo, Dr. Martínez, Dra. Ganem y Dr. Hernández* y especialmente a la *Dra. Vera* y al *Dr. Quintanar* por sus atinados consejos a lo largo de cada tutorial.
- A mis *padres, hermanas, sobrinos y cuñados*, por la comprensión y el apoyo constante para cumplir esta meta.
- A *Iliana, Lulú, Raúl, Ing Paulo Muñoz, Héctor y Don Maurilio*, por sus consejos y compañía.
- Al *CONACYT* y a la *DGEP* por la becas otorgadas para la realización de mis estudios.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPIRITÚ”

“Cuando creáis haber encontrado un hecho científico importante y os apremie el deseo de publicarlo, esperad unos días o unas semanas, o años; es preciso luchar, comprobar e incluso destruir los experimentos propios, es preciso agotar todas las hipótesis contrarias antes de proclamar el descubrimiento. Pero luego, al cabo de esfuerzos tan arduos, cuando la certeza llega, vuestra alegría será una de las más grandes que puede experimentar el alma humana.”

Luis Pasteur (1788-1824)

- A mi querido *Juan Pablo*, gracias por tu amor, cariño, respeto, inteligencia y comprensión. Finalmente un Doctor siempre entiende a una Doctora “cierto”. Con cariño esta tesis te la dedico solo a tí.

Este trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Helgi Jung Cook en el
Laboratorio 112 del Conjunto “E” de la Facultad de Química
en colaboración con el Dr. José Luis Gallegos Pérez
del Instituto Nacional de Medicina Genómica en México D.F. y
fue presentado en el XLIII Congreso de la Asociación Farmacéutica Mexicana
y en las Reuniones Anuales XIII, XXIV y XXV
del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía
“Manuel Velazco Suarez”

ÍNDICE GENERAL

	<i>Página</i>
Índice general	I
Índice de tablas	IV
Índice de figuras	VI
Índice de abreviaturas	VIII
Resumen	1
Abstract	4
Introducción	5
1. Antecedentes	6
1.1. Neurocisticercosis	6
1.1.1. Ciclo de vida	6
1.1.2. Patología y diagnóstico	7
1.1.3. Factores de riesgo y prevalencia	8
1.1.4. Tratamiento	9
1.2. Albendazol	10
1.2.1. Propiedades fisicoquímicas del albendazol	10
1.2.2. Farmacodinamia	11
1.2.3. Farmacocinética	12
1.2.4. Régimen de dosificación	14
1.2.5. Efectos adversos	14
1.3. Nitazoxanida	15
1.3.1. Propiedades fisicoquímicas de la nitazoxanida	15
1.3.2. Farmacodinamia	15
1.3.3. Farmacocinética	16
1.3.4. Régimen de dosificación	17
1.3.5. Efectos adversos	17
1.4. Fármacos para el sistema nervioso central	18
1.5. Helmintiasis y la combinación de fármacos para su tratamiento	20
2. Justificación	22
3. Hipótesis	23
4. Objetivo general	24
4.1 Objetivos particulares	24
5. Parte experimental	25
5.1. Validación de métodos analíticos	26
5.1.1. Método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma de rata	26
5.1.1.1. Condiciones analíticas	26
5.1.1.2. Validación del método analítico	31
5.1.2. Método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo de rata	35

	<i>Página</i>
5.1.2.1. Condiciones analíticas	35
5.1.2.2. Validación del método	38
5.1.3. Método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma de rata	39
5.1.3.1. Condiciones analíticas	40
5.1.3.2. Validación del método	44
5.1.4. Cuantificación de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo de rata	47
5.1.4.1. Evaluación del método	48
5.2. Estudio farmacocinético en plasma y líquido cefalorraquídeo de albendazol y nitazoxanida	49
5.2.1. Procedimiento experimental	52
5.2.2. Microcirugías	53
5.2.3. Tratamientos y desarrollo del estudio	54
5.2.4. Parámetros farmacocinéticos	55
5.2.5. Análisis estadístico	55
6. Resultados y discusión	56
6.1. Validación y desarrollo de métodos analíticos	56
6.1.1. Método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma de rata	56
6.1.2. Método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo	63
6.1.3. Método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma de rata	67
6.1.4. Cuantificación de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo de rata	74
6.2. Estudio farmacocinético	76
6.2.1. Nitazoxanida	76
6.2.1.1. Niveles de tizoxanida en plasma	76
6.2.1.2. Niveles de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo	78
6.3.2. Albendazol	79
6.3.2.1 Niveles de sulfóxido de albendazol en plasma	79
6.3.2.2 Niveles de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo	81
6.3.3. Combinación de albendazol y nitazoxanida	83
6.3.3.1. Niveles de sulfóxido de albendazol en plasma después de la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida	84
6.3.3.2. Niveles de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo después de la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida	86
6.3.4. Comparación de perfiles farmacocinéticos de la administración de albendazol vs la combinación albendazol-nitazoxanida	87

	<i>Página</i>
7. Conclusiones	91
8. Perspectivas	92
9. Bibliografía	93
10. Anexos	99

ÍNDICE DE TABLAS

		<i>Página</i>
Tabla 1	Preparación de la curva de calibración en plasma para sulfóxido de albendazol	29
Tabla 2	Preparación de puntos control en plasma de sulfóxido de albendazol	29
Tabla 3	Condiciones de detección de los iones	31
Tabla 4	Preparación de la curva de calibración en LCR para sulfóxido de albendazol	37
Tabla 5	Preparación de puntos control en LCR para sulfóxido de albendazol	37
Tabla 6	Gradiente para sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo	38
Tabla 7	Preparación de la curva de calibración de tizoxanida en plasma	42
Tabla 8	Preparación de puntos control de tizoxanida en plasma	42
Tabla 9	Gradiente del método para la cuantificación tizoxanida	43
Tabla 10	Preparación de la curva de calibración en LCR para tizoxanida	48
Tabla 11	Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación en plasma de sulfóxido de albendazol	59
Tabla 12	Linealidad. Concentraciones cuantificadas de sulfóxido de albendazol en plasma	59
Tabla 13	Recobro absoluto de sulfóxido de albendazol	60
Tabla 14	Precisión del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma	61
Tabla 15	Exactitud del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma	61
Tabla 16	Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación en líquido cefalorraquídeo de sulfóxido de albendazol	66
Tabla 17	Linealidad. Concentraciones cuantificadas de sulfóxido de albendazol en LCR	66
Tabla 18	Precisión del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en LCR	66
Tabla 19	Exactitud del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en LCR	67
Tabla 20	Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación en plasma para tizoxanida	69
Tabla 21	Linealidad. Concentraciones cuantificadas de tizoxanida en plasma	70
Tabla 22	Recobro absoluto de tizoxanida en plasma	70
Tabla 23	Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma	71
Tabla 24	Exactitud del método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma	71
Tabla 25	Estabilidad de tizoxanida a corto y largo plazo	72

		<i>Página</i>
Tabla 26	Estabilidad de tizoxanida a corto y a largo plazo (continuación)	73
Tabla 27	Linealidad. Concentraciones cuantificadas de tizoxanida en LCR	76
Tabla 28	Valores promedio de la concentración plasmática de tizoxanida después de la administración de una dosis de 7.14 mg/Kg de nitazoxanida	76
Tabla 29	Parámetros farmacocinéticos de tizoxanida después de la administración oral de nitazoxanida a una dosis de 7.14 mg /Kg de nitazoxanida	77
Tabla 30	Valores promedio de la concentración plasmática de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis oral de 15 mg/Kg de albendazol	79
Tabla 31	Parámetros farmacocinéticos de sulfóxido de albendazol en plasma después de la administración de albendazol a una dosis de 15 mg/Kg de albendazol	80
Tabla 32	Valores promedio de la concentración en LCR de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de 15 mg/Kg de albendazol	81
Tabla 33	Parámetros farmacocinéticos de sulfóxido de albendazol en LCR después de la administración de albendazol a una dosis de 15 mg/Kg	83
Tabla 34	Valores promedio de la concentración plasmática de sulfóxido de albendazol después de la administración de 15 mg/Kg de albendazol conjuntamente con 7.14 mg/Kg de nitazoxanida	84
Tabla 35	Parámetros farmacocinéticos de sulfóxido de albendazol en plasma después de la administración de 15 mg/Kg de albendazol conjuntamente con 7.14 mg/Kg de nitazoxanida	85
Tabla 36	Valores promedio de la concentración de sulfóxido de albendazol en LCR de después de la administración conjunta de 15 mg/Kg de albendazol y 7.14 mg/Kg de nitazoxanida	86
Tabla 37	Parámetros farmacocinéticos de sulfóxido de albendazol en LCR después de la administración de 15 mg/Kg de albendazol y 7.14 mg/Kg de nitazoxanida	87
Tabla 38	Parámetros farmacocinéticos de sulfóxido de albendazol después de la administración de 15 mg/Kg de albendazol solo y en combinación con 7.14 mg/Kg de nitazoxanida	88

ÍNDICE DE FIGURAS

		<i>Página</i>
Figura 1	Ciclo de vida de <i>Taenia solium</i>	7
Figura 2	Fórmula estructural del albendazol	11
Figura 3	Fórmula estructural de la nitazoxanida	15
Figura 4	Representación de las constantes y compartimentos del cerebro que se relacionan con la eficacia y penetración de un fármaco al cerebro	19
Figura 5	Diagrama experimental de la investigación	25
Figura 6	Diagrama experimental del estudio farmacocinético en plasma y LCR	52
Figura 7	Implantación quirúrgica de la cánula guía	54
Figura 8	Cromatograma típico de un blanco de plasma	56
Figura 9	Cromatograma típico de una muestra de plasma a una concentración de 3000 ng/mL de sulfóxido de albendazol	57
Figura 10	Selectividad del método analítico	58
Figura 11	Linealidad del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma de 20 a 3000 ng/mL	59
Figura 12	Prueba de contaminación cruzada	62
Figura 13	Prueba de supresión iónica	63
Figura 14	Cromatograma típico de una muestra blanco de LCR	64
Figura 15	Cromatograma típico de sulfóxido de albendazol en LCR en concentraciones de 25 (A), 250 (B) y 1250 (C) ng/mL	64
Figura 16	Linealidad del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en LCR de 10 a 1500 ng/mL	65
Figura 17	Cromatograma típico de un blanco de plasma	68
Figura 18	Cromatograma típico de tizoxanida en plasma en concentraciones de 70 (A), 400 (B) y 1000 (C) ng/mL	68
Figura 19	Linealidad del método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma de 20 a 1280 ng/mL	69
Figura 20	Cromatograma típico de un blanco de LCR	74
Figura 21	Cromatograma típico de tizoxanida en LCR en concentraciones de 10 (A), 40 (B) y 320 (C) ng/mL	75
Figura 22	Linealidad del método analítico para la cuantificación de tizoxanida en LCR de 10 a 320 ng/mL	75
Figura 23	Perfil de concentración vs tiempo de tizoxanida después de la administración de una dosis de 7.14 mg/Kg de nitazoxanida en plasma	76
Figura 24	Perfil de concentración vs tiempo de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de albendazol de 15 mg/Kg en plasma	80

		<i>Página</i>
Figura 25	Perfil de concentración vs tiempo de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de 15 mg/Kg de albendazol en LCR	82
Figura 26	Perfil de concentración vs tiempo de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de 15 mg/Kg de albendazol y 7.14 mg/Kg de nitazoxanida en plasma	85
Figura 27	Perfil de concentración vs tiempo de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de 15 mg/Kg de albendazol y 7.14 mg/Kg de nitazoxanida en LCR	86
Figura 28	Perfil de tiempo contra concentración en plasma y LCR de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de 15 mg/Kg de albendazol y 7.14 mg/Kg de nitazoxanida	88

INDICE DE ABREVIATURAS

ABZ	Albendazol
AUC	Área bajo la curva del perfil de concentraciones plasmáticas en función del tiempo
C _{max}	Concentración plasmática máxima
CV	Coefficiente de variación
EE	Error estándar
HPLC-UV/Vis	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a un detector con lámpara ultravioleta-visible.
LC/MS-MS	Cromatógrafo de líquidos de alta resolución acoplado a un espectro de con detección masas-masas
LCR	Líquido cefalorraquídeo
NTZ	Nitazoxanida
SOALB	Sulfóxido de albendazol
t _{1/2}	Vida media de eliminación
t _{max}	Tiempo para alcanzar la concentración máxima del fármaco
TMR	Tiempo medio de residencia
TZO	Tizoxanida

Resumen

El albendazol es un fármaco ampliamente utilizado en el tratamiento de la neurocisticercosis. Se sabe que presenta una baja solubilidad, lo cual da lugar a diferencias en la absorción y por ende los niveles plasmáticos y la respuesta terapéutica presentan gran variabilidad interindividual en pacientes bajo tratamiento con este fármaco. Recientemente, se demostró que la nitazoxanida y su metabolito activo, la tizoxanida, presentan eficacia cisticida en el modelo de *T. crassiseps* encontrándose que el efecto de la combinación de tizoxanida-sulfóxido de albendazol, metabolito activo del albendazol, fue aditivo y más rápido que el observado con cada fármaco por separado, lo cual sugiere que la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida podría ser útil en el tratamiento de la cisticercosis.

Con el fin de continuar con la investigación, se llevó a cabo el presente proyecto cuyo objetivo fue comparar “*in vivo*” la farmacocinética de la administración a dosis única de albendazol y nitazoxanida con la resultante de la administración conjunta en plasma y líquido cefalorraquídeo.

El estudio se llevó a cabo en ratas de la cepa Sprague-Dawley las cuales se dividieron en diferentes grupos de acuerdo a un esquema aleatorio. Se tomaron muestras de plasma y líquido cefalorraquídeo durante 16 horas, empleando técnicas de canulación en cola y cisterna magna de manera simultánea. Para la cuantificación de los fármacos, se desarrollaron métodos analíticos por cromatografía de líquidos con detección UV-Vis para sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo y para tizoxanida en plasma y líquido cefalorraquídeo, mientras que, para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma se desarrolló un método por cromatografía de líquidos acoplado a espectrometría de masas-masas. Los métodos fueron validados siguiendo los lineamientos que marca la Norma Oficial Mexicana 177 de la Secretaría de Salud.

Los resultados del estudio demostraron que después de la administración conjunta de albendazol-nitazoxanida los valores de los parámetros farmacocinéticos correspondientes a C_{max} y $AUC_{(0 \rightarrow t)}$ en

líquido cefalorraquídeo (LCR) para el sulfóxido de albendazol fueron 2.1 y 2.4 veces más altos ($p < 0.05$) respectivamente comparados con aquellos obtenidos después de la administración única de albendazol, mientras que el t_{\max} no se vio modificado. Los resultados de este trabajo sugieren que la combinación de albendazol con nitazoxanida podría ser benéfica en aquellos pacientes que no responden a la terapia de albendazol.

Abstract

Albendazole is a widely used drug in the treatment of neurocysticercosis. It is known to have low solubility, which results in large inter-individual variability in absorption and hence plasma levels and therapeutic response in patients treated with this drug. Recently, it has been demonstrated that nitazoxanide and the active metabolite tizoxanide, show antiparasitic efficacy in a *T. crassiseeps* model. Furthermore it was found that the effect of the combination of tizoxanide-albendazole sulfoxide, the active metabolite of albendazole, was additive and faster than observed with either agent alone, suggesting that co-administration of albendazole and nitazoxanide may be useful in the treatment of neurocysticercosis.

In order to continue our research the present study was done with the objective of comparing “*in vivo*” the pharmacokinetics of single dose administration of albendazole and nitazoxanide and the result of the co-administration.

The study was conducted in Sprague-Dawley rats which were divided into different groups according to a random pattern. Samples of plasma and cerebrospinal fluid were taken during 16 hours using cannulation techniques in tail and cistern magna simultaneously. For sample quantification, analytical methods were developed by liquid chromatography UV-Vis detection for albendazole sulfoxide in cerebrospinal fluid and tizoxanide in plasma and cerebrospinal fluid and for albendazole sulfoxide in plasma an analytical methodology was carried-out using high performance liquid chromatography coupled to mass spectrometry. All these methods were validated following the guidelines marks of the Norma Oficial Mexicana 177.

The results showed that after co-administration of albendazole-nitazoxanide, C_{max} and $AUC_{(0 \rightarrow t)}$ values of albendazole sulfoxide in cerebrospinal fluid were 2.1 and 2.4 times higher ($p < 0.05$) respectively compared with values obtained after administration of albendazole, while t_{max} were not

affected . In conclusion, the results of this study suggest that the combination of albendazole-nitazoxanide may be beneficial in patients who do not respond to albendazole therapy.

Introducción

La neurocisticercosis representa una de las parasitosis más frecuentes del sistema nervioso central la cual es producida por la larva del platelminto de *Taenia solium*. Su alta incidencia en países en vías de desarrollo, así como en naciones industrializadas con gran afluencia de inmigrantes, ha transformado a esta enfermedad en un problema de salud pública mundial (Sotelo y col., 2010). En México, la importancia esta enfermedad radica en que existen más de 1.5 millones de transmisores potenciales de huevos de *Taenia* los cuales causan que esta enfermedad sea propagada con una frecuencia relativamente alta. (Flisser y cols., 2003).

En la actualidad, el albendazol, un potente antihelmíntico, es el fármaco de elección para la neurocisticercosis, sin embargo, debido a su baja solubilidad presenta problemas de absorción a nivel gastrointestinal y de metabolismo ya que sufre una biotransformación por medio del conjunto de citocromos de la superfamilia de proteínas del P450, lo cual da lugar a una gran variabilidad interindividual en los niveles plasmáticos del sulfóxido de albendazol, metabolito activo, razón por la cual se siguen realizando protocolos enfocados a mejorar la terapia convencional. Para ello se han propuesto diferentes alternativas, como son: síntesis de nuevos análogos de albendazol, desarrollo de nuevas formulaciones de albendazol y evaluación de fármacos en combinación.

En relación a esta última propuesta, estudios *in vitro* (Palomares-Alonso y cols., 2007), han documentado que la combinación de albendazol con nitazoxanida presenta un efecto aditivo en cisticercos de *Taenia crassiceps*, lo cual hizo pensar que la combinación podría llegar a ser de utilidad para el tratamiento de esta enfermedad.

En el presente trabajo se evaluó si el efecto de la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida en plasma y líquido cefalorraquídeo influirían en los niveles del sulfóxido de albendazol al ser comparado con respecto a la administración de albendazol

1. Antecedentes

1.1. Neurocisticercosis

1.1.1. Ciclo de Vida

La neurocisticercosis producida por la larva del platelminto de *Taenia solium* es una de las parasitosis más frecuentes a nivel del sistema nervioso central. El parásito alterna entre el ser humano como huésped definitivo y el cerdo como principal huésped intermediario (figura 1). En su estado adulto, el platelminto habita en el intestino humano, infección conocida como teniasis. La tenia o solitaria produce miles de huevos, que se expulsan en la materia fecal, el cerdo se infecta al ingerir las heces donde hay segmentos (proglótidos) o huevos del parásito adulto y cada huevo tiene el potencial para convertirse en un cisticerco, forma larvaria del parásito, ocasionando la cisticercosis porcina. El ciclo se completa cuando el hombre consume carne de cerdo insuficientemente cocida infectada con cisticercos y a nivel del intestino estos se desarrollan y se fijan en las paredes hasta convertirse en gusanos adultos. Por otro lado la falta de higiene y la convivencia con el portador del parásito adulto, pueden ocasionar la ingestión de huevos produciéndose la cisticercosis humana ya que, al igual que en el cerdo, estos eclosionan con la ayuda de las enzimas proteolíticas y las sales biliares del intestino del humano logrando entrar al sistema circulatorio para alojarse en tejidos sólidos como el cerebro. (Morales y cols., 2006)

Esta enfermedad es una zoonosis de distribución universal y endémica en países de bajo nivel socioeconómico de América Latina, África y sureste Asiático. A pesar de que en México dicha enfermedad no es una de las causas más frecuentes de morbilidad y mortalidad humana como lo es la hipertensión o la diabetes, es un hecho que la neurocisticercosis impacta a la economía de nuestro país ya que al ser una enfermedad crónica y de difícil manejo, requiere de instrumentos especializados para su diagnóstico, consultas frecuentes y en ocasiones, internado y cirugías mayores afectando directamente con ello al presupuesto de salud pública. (Sotelo y col., 2010)

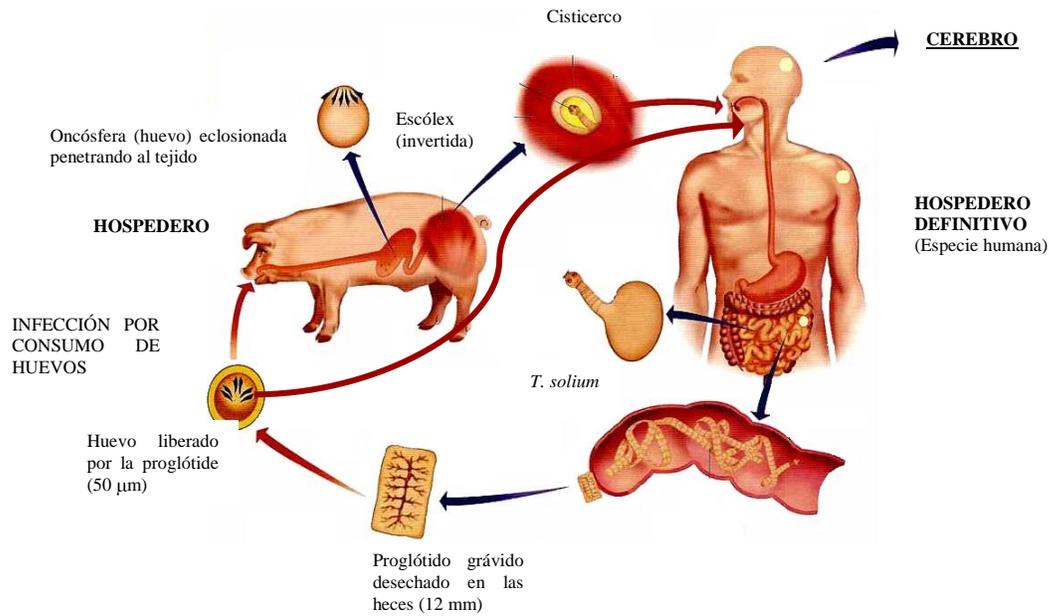


Figura 1. Ciclo de vida de *Taenia solium*.

1.1.2. Patología y diagnóstico

La enorme variabilidad de sus manifestaciones clínicas y amplio espectro patológico son algunas de sus principales características, debido a ello, se le denomina como enfermedad pleomórfica, esto significa que posee diferencias individuales en el número, fase evolutiva y localización de los cisticercos. En cuanto a la fase evolutiva la clasificación existente es la siguiente: vesicular, coloidal, nodular granular y nodular calcificado y según su localización en las distintas regiones del cerebro se clasifica en: forma meníngea (espacio subaracnoideo), forma ventricular (ventrículos cerebrales) y forma parenquimatosa (parénquima del encéfalo y médula espinal). (Alarcón y cols., 2006)

En la actualidad, el diagnóstico de esta afección se realiza mediante técnicas modernas de imagenología neurológica como la tomografía computarizada y resonancia magnética lo cual permite la visualización de la localización, el número y el estadio evolutivo de los cisticercos. Aunado a esto, también se han desarrollado técnicas de diagnóstico inmunológico por medio de

ensayos inmunoabsorbentes o de inmunoblot en suero o líquido cefalorraquídeo en donde por lo general el 80% de pacientes enfermos son detectados. (Larralde y cols., 2006)

El cuadro clínico se relaciona con la respuesta inmunológica individual; en la mayoría de los casos se genera una reacción inflamatoria del tejido nervioso adyacente al parásito, que puede llegar a ser muy intensa por la presencia de macrófagos. Se sabe que, del 50 al 80% de los casos esta respuesta inflamatoria causa convulsiones e intenso dolor de cabeza asociado a mareos, vértigo así como trastornos visuales y en el caso de que el cisticercos se localice en lugares como el cuarto ventrículo del cerebro por ejemplo, impide el libre tránsito de líquido cefalorraquídeo causando hipertensión endocraneal, alteraciones mentales y en casos extremos hidrocefalia. (Jung y cols., 2008)

1.1.3. Factores de riesgo y prevalencia

En México el riesgo de adquirir la infección es causado principalmente por la ingesta de alimentos contaminados o mal cocidos en vías públicas siendo la causa más frecuente en zonas urbanas y en zonas rurales, se sabe que se ocasiona debido al riego de los cultivos con aguas negras y al constante contacto que existe entre los animales de crianza y los humanos denominándose como “zoonosis traspatio”. El último factor de riesgo es causado por la autoinfección, es el de mayor prevalencia ya que mediante la vía ano-mano-boca, los alimentos se contaminan y por ende la enfermedad llega a propagarse rápidamente. (Larralde y cols., 2006)

Por otro lado en cuanto a la prevalencia se sabe que la neurocisticercosis es una enfermedad de baja prevalencia pero con un índice significativamente importante en las estadísticas de morbilidad de nuestro país, el Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica publicó que en el 2008 la incidencia en el caso de la cisticercosis fue mayor a 0.54 en adultos de más de 65 años y 0.73 para teniasis en niños de 1 a 4 años por cada 100 000 habitantes en territorio nacional (SINAVE, 2010). En el caso de las estadísticas reportadas por el sector hospitalario, se sabe que en centros especializados de neurología, esta enfermedad es la quinta causa más frecuente de consulta

(4.3%) (Jiménez y Velázquez, 2004; Jung y cols., 2008), y que el 25% de las craneotomías realizadas en estas instituciones son realizadas por esta enfermedad. Además, existe la evidencia de que el 2% de las autopsias evaluadas desde los años ochentas reportadas por instituciones no especializadas como el Centro Médico Siglo XXI y el Hospital General de México (Vega y cols., 2003) al realizarse confirman que la causa de muerte de los individuos evaluados es debida a este padecimiento.

1.1.4. Tratamiento

El tratamiento para esta enfermedad debe ser individualizado tomando en cuenta 6 factores principalmente que son: la viabilidad, el número, la localización y el tamaño de los parásitos, además de la intensidad de la reacción inflamatoria asociada y el estadio clínico del paciente (García y cols., 2003 y Riley y White., 2003) dividiéndose en 3 rubros. En el caso del tratamiento sintomático, que es el primer rubro, se utilizan fármacos antiepilépticos de primera línea como lo es la fenitoina, y la carbamazepina indicados para el control de crisis convulsivas de acuerdo a la severidad y al número de convulsiones presentadas por el individuo. Para cisticercos calcificados si están localizados en el parénquima o en la región subaracnoidea se utilizan los fármacos antiepilépticos ya mencionados junto con corticoesteroides, como la dexametasona para la disminución de la inflamación en conjunción con analgésicos comunes y diuréticos osmóticos como el manitol para la encefalitis. Por lo regular los fármacos ya mencionados administrados con algunos fármacos cestocidas que serán mencionados posteriormente complementan la terapia de la enfermedad.

El tratamiento quirúrgico, segundo caso, consiste en la extirpación de los quistes. Actualmente debido a la eficacia de fármacos cestocidas este procedimiento casi no se utiliza, sin embargo, la importancia de éste se incrementa cuando existe la necesidad de la realización de derivaciones

ventrículo-peritoneales para el control de hidrocefalia precedente a la aplicación del tratamiento cestocida. (Sotelo y cols., 2010)

El tercer rubro está basado en la aplicación de fármacos cestocidas. Este corresponde al tratamiento específico y está regido principalmente por el prazicuantel y el albendazol (Del Brutto y cols., 2006; Alarcón y cols., 2006; Jung y cols., 2008). El prazicuantel es una isoquinolona que actúa dañando los tegumentos del parásito produciendo una parálisis espástica del escólex. Del 60 al 70% de los cisticercos parenquimatosos desaparecen después de 15 días de tratamiento a dosis de 50 mg/kg; (curso largo) pero se sabe que, en estudios de curso ultracorto de 1 día a dosis de 75 mg/Kg, presenta la misma efectividad que en el curso largo (López-Gómez y cols., 2001). El fármaco de elección en la terapia es el albendazol; es un benzimidazol que se caracteriza por ser el fármaco más potente a la fecha en el mercado en el caso de la neurocisticercosis. Dentro de sus principales ventajas, se sabe que es un fármaco de bajo costo que no interacciona con corticoesteroides y presenta una buena permeación a través de la barrera hematoencefálica. Por lo regular se administra a una dosis de 15 a 30 mg/kg/día durante 8 días y se sabe que un ciclo puede llegar a tener una efectividad de 75 a 90% en el caso de cisticercos parenquimatosos. (Sotelo y cols., 2010)

1.2. Albendazol

1.2.1. Propiedades fisicoquímicas del albendazol

El albendazol es un polvo blanco amorfo con peso molecular de 265 gr/mol, punto de fusión entre los 208-210°C estable a temperatura ambiente. Se prepara mediante síntesis química. Su nombre químico es [5-(Propiltio)-1*H*-benzimidazol-2-il] carbamato de metilo y su fórmula molecular es $C_{12}H_{11}N_3O_2S$, los nombres comerciales de los productos en los que se encuentra este principio activo en México son: Zentel (Glaxo Smith Kline), Eskazole (Amstrong), Vermin-plus (Streger), Digenazol (Hormona), Lurdex (Liferpal), en dos presentaciones farmacéuticas, tabletas y suspensión.

Este compuesto es prácticamente insoluble en agua y alcohol, ligeramente soluble en éter y diclorometano y completamente soluble en ácido fórmico, acético, dimetilsulfóxido y cloroformo. Es una molécula anfiprótica lo cual quiere decir que presenta dos valores de pKa: 10.47 y 2.9; el primer valor de pKa se atribuye a la pérdida del protón del grupo amino de la posición 1 del anillo benzimidazólico y el segundo valor se atribuye a la protonación del nitrógeno en la posición 3 del anillo benzimidazólico (Jung y col., 1998)

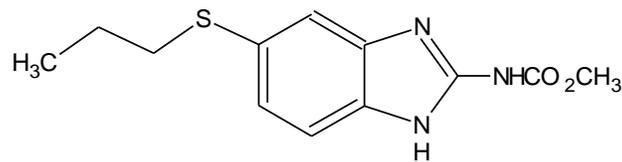


Figura 2. Fórmula estructural del albendazol.

1.2.2. Farmacodinamia

El albendazol es un antihelmíntico de amplio espectro aprobado desde 1982 para uso humano, se caracteriza por presentar acción antiparasitaria múltiple asociada a un amplio margen de seguridad. Presenta efecto vermícida, larvícida y ovícida frente a varias especies de nemátodos, céstodos y tremátodos (Mares., 2004). Es útil en dosis única en infecciones como ascariasis, trichuriasis, enterobiasis e infecciones contra gusanos planos. En dosis múltiples, se usa para el tratamiento de infecciones por céstodos como hidatidosis así como teniasis y desde 1987 demostró ser efectivo en la terapia contra la neurocisticercosis.

Este principio activo provoca cambios degenerativos en las células tegumentarias de los helmintos y protozoarios, se ha propuesto que al tener alta afinidad por la tubulina inhibe la polimerización para formar el microtúbulo nuclear y así se interrumpe la división mitótica de la célula junto con la captación de la glucosa con una posterior depleción de glucógeno, lo cual ocasiona que los niveles energéticos del parásito sean insuficientes para su supervivencia. Además de este efecto, se ha

reportado que el segundo blanco de acción está asociado a una enzima que cataliza una importante reacción fermentativa en la síntesis de adenintrifosfato, la fumarato reductasa, fuente de energía indispensable para que la célula pueda llevar a cabo sus múltiples funciones. La supresión de estos dos mecanismos bioquímicos explica el efecto letal no sólo en parásitos adultos sino también para las larvas en sus diferentes estadios y para los huevos. (Sotelo y cols., 1998).

1.2.3. Farmacocinética

La absorción se lleva a cabo en el estómago y en el intestino delgado siguiendo una cinética de orden cero y un proceso de difusión pasiva (Mares., 2004) y se sabe que solo entre el 1 y el 5% de la dosis administrada se absorbe en humanos debido a su baja solubilidad acuosa (Jung y col., 1998). Estudios farmacocinéticos en humanos confirman que existe una gran variabilidad (Jung y cols., 1998; Castro y cols., 2009) intra e interindividual, ya que los niveles oscilan entre 0.45 y 2.96 µg/mL después de la administración oral de 15 mg/Kg. Recientemente, se ha demostrado que la biodisponibilidad del fármaco puede mejorar al ser administrado junto con una dieta rica en grasas ya que los niveles plasmáticos aumentan hasta 7 veces más después de la administración conjunta con alimentos en población mexicana (González-Esquivel y cols., 2005). En algunos pacientes, se observa la presencia de un doble pico en los perfiles plasmáticos, las posibles explicaciones son que el albendazol no absorbido es solubilizado por la bilis (De Estal y cols., 1991; Redondo y cols. 1998) o que la disolución del principio activo in vivo es lenta y errática (Jung y cols. 1992). En el año 2009, Castro y cols., llevaron a cabo un estudio de farmacocinética poblacional, en el cual se encontró que la variabilidad en las concentraciones plasmáticas de albendazol se debe a diferencias relacionadas con la biodisponibilidad lo cual podría repercutir en la baja exposición asociando a esto la falta de efectividad del tratamiento.

El metabolismo de este compuesto esta mediado por dos vías enzimáticas las cuales involucran el sistema microsomal flavin-monoxigenasa y el citocromo P450 (CYP3A4), esta última genera una reacción de oxidación del átomo de azufre de la cadena alquílica formando el sulfóxido de

albendazol, el cual es considerado como el metabolito activo, esté a su vez, sufre una reacción de *S*-oxidación vía la CYP1A1 dando lugar a la sulfona, metabolito que no presenta ni actividad farmacológica ni tóxica.

El sulfóxido de albendazol se distribuye ampliamente a través del organismo, su unión a proteínas plasmáticas oscila entre el 60 y el 70% en proporciones iguales tanto para el caso de la albumina como de la α -glicoproteína, este grado de unión es independiente de la concentración y no es de importancia clínica. Además se sabe que alcanza su máxima concentración entre las 2 y las 4 horas después de ser administrado. (Jung y cols.1998; Marrier y cols.1986)

Se han realizado pocos estudios en relación a los niveles de fármaco en líquido cefalorraquídeo, Jung y cols. en 1998 documentaron que la proporción de fármaco existente en este fluido con respecto a los niveles plasmáticos se encuentra a razón de 1:2 confirmando que el fármaco es capaz de atravesar la barrera hematoencefálica pero presenta una amplia variabilidad interindividual la cual no está relacionada a la edad, sexo o la eficacia terapéutica.

Existen reportes en donde se afirma que el sulfóxido de albendazol penetra mejor la barrera hematoencefálica en comparación con el prazicuantel, presentando una mejor respuesta terapéutica. (Jung H y cols., 1998) Las conclusiones obtenidas del artículo anterior se confirman con la publicación de Takayanagi y cols. del 2002 quien encontró que, la proporción plasma/líquido cefalorraquídeo de sulfóxido de albendazol en un estudio realizado en humanos fue de 2.6:1.

Por otro lado en cuanto a la vida media de eliminación se sabe que oscila entre 8 y 12 horas. La excreción urinaria es la vía menor de eliminación siendo la eliminación biliar predominante. (Marrier y cols., 1980)

1.2.4. Régimen de dosificación

La dosis actualmente recomendada es de 15 mg/Kg/día durante una semana, cuando los cisticercos se localizan en el parénquima (Sotelo y cols., 2010) pero para el caso de cisticercos ventriculares y subaracnoideos la dosis de 30 mg/Kg/día es más efectiva. (Márquez y cols., 2004)

1.2.5. Efectos adversos

El tratamiento con albendazol puede provocar durante el primer día de administración, un aumento de la sintomatología neurológica causando una reacción inflamatoria acompañada de dolor de cabeza y vómito, dicha reacción inflamatoria es debida a la destrucción del parásito. (Márquez y cols., 2004)

La agencia regulatoria de alimentos y fármacos de Estados Unidos cataloga al albendazol como un fármaco clase “C” debido a la teratogenicidad que presenta en estudios preclínicos de rata. Considerando que a la fecha no se han realizado estudios en mujeres; el uso durante el primer trimestre del embarazo debe ser monitoreado. (De Silva y col., 1997)

En cuanto a la hepatotoxicidad se sabe que está relacionada con los niveles de sulfóxido en el cuerpo. Además el metabolito activo así como la sulfona son menos citotóxicos que el albendazol y existen pocos casos que reportan infarto cerebral y/o muerte ante una reacción severa. (Jung y cols., 1998)

1.3. Nitazoxanida

1.3.1. Propiedades fisicoquímicas de la nitazoxanida

La nitazoxanida es un fármaco con peso molecular de 307 gr/mol. Es un polvo cristalino amarillo cuyo punto de fusión es de 202 °C. Es estable a temperatura ambiente y se prepara mediante síntesis química. Su nombre químico es [2-(acetiloxi)-N-(5-nitro-2-tiazolil)] benzamida y su fórmula molecular es C₁₂H₉N₃O₅S; los nombres comerciales de este fármaco son: Daxon (Siegried Rhein), Kinonax (Unipharm), Padovanton (Rayere), Paramix (Liomont) y Parsenida (Raam de Sahuayo) y se encuentra en tres presentaciones farmacéuticas: grageas, tabletas y suspensión. Es prácticamente insoluble en agua, ligeramente soluble en éter y completamente soluble en dimetilsulfóxido y tetrahidrofurano. Computacionalmente se ha determinado que su pKa oscila alrededor de 10.16 calculado con ALOGPS.

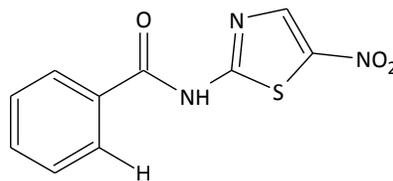


Figura 3. Fórmula estructural de la nitazoxanida.

1.3.2. Farmacodinamia

La nitazoxanida fue descrita por primera vez por Rosignol y cols. en 1975. Es un agente de amplio espectro, particularmente eficaz contra bacterias anaeróbicas del género *Clostridium* y *Helicobacter pylori* y como antihelmíntico contra *Ascaris lumbricoides*, *Trichuris trichuria*, *Fasciola hepática* entre otras (Fox y cols., 2005). En contraste con otros agentes, la nitazoxanida se desarrolló para el tratamiento de infecciones parasitarias humanas. Estudios iniciales reportados en 1984 demostraron su eficacia contra *T. saginata* e *H. nana*, sin embargo su desarrollo clínico progresó una vez demostrada su actividad antiprotozoaria contra *B. hominis*, *C. parvum*, *E. histolytica*, *G. lamblia* y *T. vaginalis* a principio de la década de los 90's. Es el primer agente aprobado por la agencia

regulatoria de alimentos y comida de los Estados Unidos (FDA) para *Cryptosporidiosis parvum* y *Gardia lamblia* en niños. (White, 2004)

A diferencia de los nitroimidazoles, como el metronidazol, el blanco principal de la nitazoxanida en protozoarios y bacterias anaerobias parece estar relacionado con la vía energética del metabolismo anaerobio, directamente con la piruvato ferredoxín óxido reductasa enzima dependiente de la transferencia de electrones. La nitazoxanida, es un inhibidor no competitivo de esta enzima ya que se ha propuesto que inhibe el primer paso de la reacción de la enzima interfiriendo con la unión del piruvato al cofactor de la tiaminopirofosfatasa, obstruyendo la interacción del sitio catalítico o sustrato. Por otro lado se sabe que este fármaco no crea resistencia. (Vanessa y cols., 2007)

1.3.3. Farmacocinética

Las propiedades farmacocinéticas de la nitazoxanida y su metabolito activo tizoxanida, han sido evaluadas en voluntarios sanos después de administración única y múltiple vía oral (Broekhuysen y cols., 2000). La absorción se lleva a cabo en el intestino. Se sabe que la ingesta de alimentos incrementa la biodisponibilidad ya que el área bajo la curva se incrementa en más del 50% y la concentración máxima en un 25% cuando el fármaco se administra en tabletas, en el caso de la suspensión se sabe que el incremento en el área bajo la curva es igual que en el caso de las tabletas pero la concentración máxima incrementa solo en 10% (Vanessa y cols., 2007).

El metabolismo hepático se lleva a cabo mediante dos vías, una de ellas es la hidrólisis en la cual da lugar a la formación de la tizoxanida, y la segunda es una reacción de glucoronidación del metabolito anterior. Estudios realizados *in vitro* e *in vivo* han reportado que la tizoxanida no inhibe a las enzimas del citocromo P450 pero se sabe que la reacción de hidrólisis es tan rápida que la nitazoxanida no se detecta en plasma; en consecuencia el metabolito tizoxanida es el que se

distribuye en el organismo. Su unión a proteínas plasmáticas es de 99% por lo que se debe tener precaución al administrarlo con fármacos que también presentan un alto grado de unión a proteínas. Estudios *in vitro* demuestran que el 95 % de está se une a la albúmina. (Prod Info Alinia, 2005). Después de una administración oral a dosis única y múltiple de 500 mg, la constante de formación de tizoxanida es de 0.57 h^{-1} y presenta una vida media de eliminación de 1.3 a 1.8 horas. Se excreta principalmente en heces fecales en un 66.2% y vía urinaria en un 31.5%. (Broekhuysen y cols., 2000)

1.3.4. Régimen de dosificación

La dosis recomendada para infecciones parasitarias (amibiasis, giardiasis, helmintiasis, tricomoniasis) es de 100 o 200 mg dos veces al día durante 3 días en niños menores a 11 años y de 500 mg dos veces al día por 3 días para personas mayores de 12 años. Se recomienda la administración del fármaco con alimentos. (Anderson y cols., 2007)

1.3.5. Efectos adversos

En general la nitazoxanida es bien tolerada sin embargo, se han reportado efectos adversos como dolor abdominal (7.8%), diarrea (2.1%), vómito (1.1%) y dolor de cabeza (1.1%) que son de naturaleza transitoria. Los efectos gastrointestinales pueden incrementarse al aumentar las dosis. (White, 2004). Además se sabe que este fármaco puede provocar rinitis y mareo, en la piel puede llegar a causar comezón y sudoración, en algunos sujetos provoca decoloración tanto en los ojos como en la orina.

La agencia regulatoria de alimentos y fármacos de Estados Unidos cataloga a la nitazoxanida como un fármaco clase “B” ya que a dosis de más de 10 mg/Kg en ratas no se encontró ningún tipo de daño al feto ni se afectó la fertilidad, aunque hoy en día aun no se ha evaluado esto en mujeres

embarazadas. A la fecha no se han reportado estudios sobre carcinogénesis y genotoxicidad así como en pacientes con daño renal o hepático. (Prod Info Alinia, 2005)

1.4. Fármacos para el sistema nervioso central

Aunque en los últimos años ha existido un gran avance en la investigación de nuevas moléculas en la industria farmacéutica, el número de productos lanzados al mercado no ha correspondido ni con las expectativas ni con la demanda de fármacos necesarios para los padecimientos que afectan al sistema nervioso central. Los costos elevados que implica el descubrimiento de un nuevo fármaco, al igual que el desarrollo subsecuente de ensayos clínicos, han limitado este avance. A lo anterior se le suma la poca comprensión acerca de la biología de la enfermedad, la falta de comprensión de la fisiología del cerebro y el gran abanico de factores que contribuyen a la buena liberación de un principio activo en el sistema nervioso, lo cual limita aun más el desarrollo de nuevos fármacos. (Pardridge, 2002). Otros factores que deben de ser tomados en cuenta además de un coeficiente de permeabilidad son la unión inespecífica a tejidos y la velocidad con la que el fluido extracelular viaja dentro del cerebro. (Van Deusen y cols., 2005)

A diferencia de otros órganos, el cerebro está protegido por la barrera hematoencefálica y la barrera cerebroespinal, la conformación de estas barreras a nivel celular las hace impermeables ya que poseen uniones estrechas que evitan el paso de compuestos hacia el cerebro y además se encargan de regular el flujo de transportadores denominados como “reflujo”, factor principal que restringe la permeación, ya que dichos transportadores son altamente selectivos en el transporte de compuestos exógenos y endógenos y por si fuera poco son metabólicamente competentes.(Abbott y cols., 2008)

Aunado a lo anterior existen otros dos factores de gran relevancia, el primero considera las uniones no específicas del fármaco con el tejido cerebral ya que debido a esto se puede reducir la concentración necesaria para la eficacia del principio activo en el sitio de acción, y en segundo

1.5. Helmintiasis y la combinación de fármacos para su tratamiento

Las parasitosis intestinales son de las enfermedades que en nuestro tiempo juegan un papel muy importante, ya que mantienen permanentemente infectadas a las personas y causan la autoinfección. En los últimos años la investigación de nuevos fármacos antihelmínticos se ha detenido. El reducido desarrollo de metodologías es debido a que se presentan en países subdesarrollados en individuos de nivel social bajo, por lo que la recuperación de la inversión es poco viable en países del primer mundo.

Una posible alternativa es la combinación de fármacos, ya que se sabe que el desarrollo de tratamientos de dosis combinadas ofrecen un mayor beneficio clínico y al mismo tiempo cumplen y extienden el ciclo de vida de las terapias establecidas. La combinación de fármacos ha permitido cubrir múltiples necesidades y simplificar el régimen de tratamiento mostrando mejores beneficios asociados a la salud y la aceptación de los consumidores, lo cual disminuye los costos y simplifica el tratamiento. Implica también una disminución en la toxicidad y efectos secundarios, ya que puede aumentar la biodisponibilidad del fármaco e incrementar su eficacia.

La FDA aprueba la investigación fase I cuando se ha identificado una población que padezca una afección particular para quienes la combinación de fármacos a una dosis fija es segura y efectiva o cuando los activos contribuyen en su conjunto al efecto terapéutico. Esta información debe estar basada en estudios preclínicos y en general al ser fármacos ya aprobados desde hace varios años, se espera que no modifiquen sus efectos adversos. (Wechsler y cols., 2005)

Según la fracción 21 de CFR (Code of Federal Regulations), se aprueba la combinación particular de activos cuando ésta ha demostrado ser segura y eficaz y cuando cada uno de los fármacos contribuye al efecto terapéutico global. Otras ventajas de los productos en combinación son una administración más sencilla, lo que da lugar a la mejora de la adherencia del paciente y en algunos casos, la disminución de dosis. En todos los casos, es necesario llevar a cabo una justificación de los

principios activos de la propuesta basada en principios terapéuticos válidos, por lo tanto la combinación de éstos debe estar enfocada en la eficacia, la seguridad y la calidad de éstos.

Los fármacos en terapia combinada que están aprobados para su uso a nivel mundial, se emplean principalmente para el tratamiento de enfermedades infecciosas, como el HIV, malaria y tuberculosis además del tratamiento de la diabetes y la hipertensión. En el caso de fármacos antirretrovirales la combinación ha resultado ser muy efectiva prolongando la duración del efecto y por ende mejora la calidad de vida de los pacientes. (Wechsler y cols., 2005)

En el caso del albendazol reportes existentes en la literatura documentan que existe una relación directa entre los niveles plasmáticos de sulfóxido de albendazol y el efecto farmacológico en especies como *Trichinella spiralis* y *Echinococcus granulosus* (Cassulli y cols., 2006; Kalaiselvan y cols, 2007; Stettler y cols., 2004) y que un incremento en la concentración plasmática máxima de sulfóxido de albendazol de 1.64 veces, logra incrementar la eficacia del 19.9% a 55.1% para la forma enquistada de *Trichinella spiralis*, mientras que si la concentración plasmática máxima incrementa en 2.36 veces la eficacia incrementa de 33% a 97.5%. (García y cols., 2002).

Sabiendo que la combinación de fármacos puede ayudar a mejorar la eficacia de las terapias en contra de infecciones parasitarias, nuestro grupo ha demostrado que la combinación del albendazol con nitazoxanida es eficaz y ejerce una acción más rápida que cada fármaco por separado contra cisticercos *T. crassiceps* (Palomares y cols., 2007). El hecho de que los fármacos posean distintos mecanismos de acción sugiere la posibilidad de su uso en combinación para enfermedades cestocidas. Aunado a lo anterior, existe un reporte indicando que la combinación de albendazol a dosis de 3 mg con nitazoxanida junto con 1 mg de albendazol aumentan los niveles plasmáticos de sulfóxido de albendazol en ratones. (Stettler y cols., 2004)

Es por ello que se requiere llevar a cabo estudios enfocados a enfermedades como la neurocisticercosis en donde aún se desconoce la farmacocinética en cerebro de la combinación.

2. Justificación

Aún cuando el albendazol es el fármaco de elección para el tratamiento de la neurocisticercosis, es bien sabido que algunos pacientes requieren de más de un ciclo de tratamiento y que algunos más, no responden a la terapia aún después de varios ciclos, por lo que es necesario continuar con la búsqueda de tratamientos seguros y efectivos.

A la fecha no se conoce si la tizoxanida atraviesa la barrera hematoencefálica así como tampoco existe información de la influencia de la nitazoxanida sobre los niveles de sulfóxido de albendazol en plasma y en líquido cefalorraquídeo.

El presente proyecto está enfocado a la evaluación del efecto de la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida sobre la farmacocinética en plasma y líquido cefalorraquídeo del sulfóxido de albendazol y con ello determinar si puede contribuir a la eficacia del tratamiento.

3. Hipótesis

H_0 . Los niveles de sulfóxido de albendazol en plasma y en líquido cefalorraquídeo no aumentarán al ser administrado conjuntamente con la nitazoxanida.

H_a . Los niveles de sulfóxido de albendazol en plasma y en líquido cefalorraquídeo aumentarán al ser administrado conjuntamente con la nitazoxanida.

4. Objetivo general

Caracterizar la relación farmacocinética en plasma y líquido cefalorraquídeo de la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida.

4.1 Objetivos particulares

1. Desarrollar y validar el método analítico por LC/MS-MS para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma.
2. Desarrollar y validar el método analítico por HPLC-UV/Vis para cuantificar tizoxanida en plasma.
3. Desarrollar y validar los métodos analíticos por HPLC-UV/Vis para la cuantificación de tizoxanida y sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo.
4. Desarrollar técnicas para el muestreo directo de sangre y líquido cefalorraquídeo en rata.
5. Evaluar los parámetros farmacocinéticos en plasma y líquido cefalorraquídeo de sulfóxido de albendazol después de la administración individual y conjunta de albendazol y nitazoxanida.

5. Parte experimental

El presente diagrama de flujo (figura 5) muestra el desarrollo experimental empleado para llevar a cabo la presente investigación.

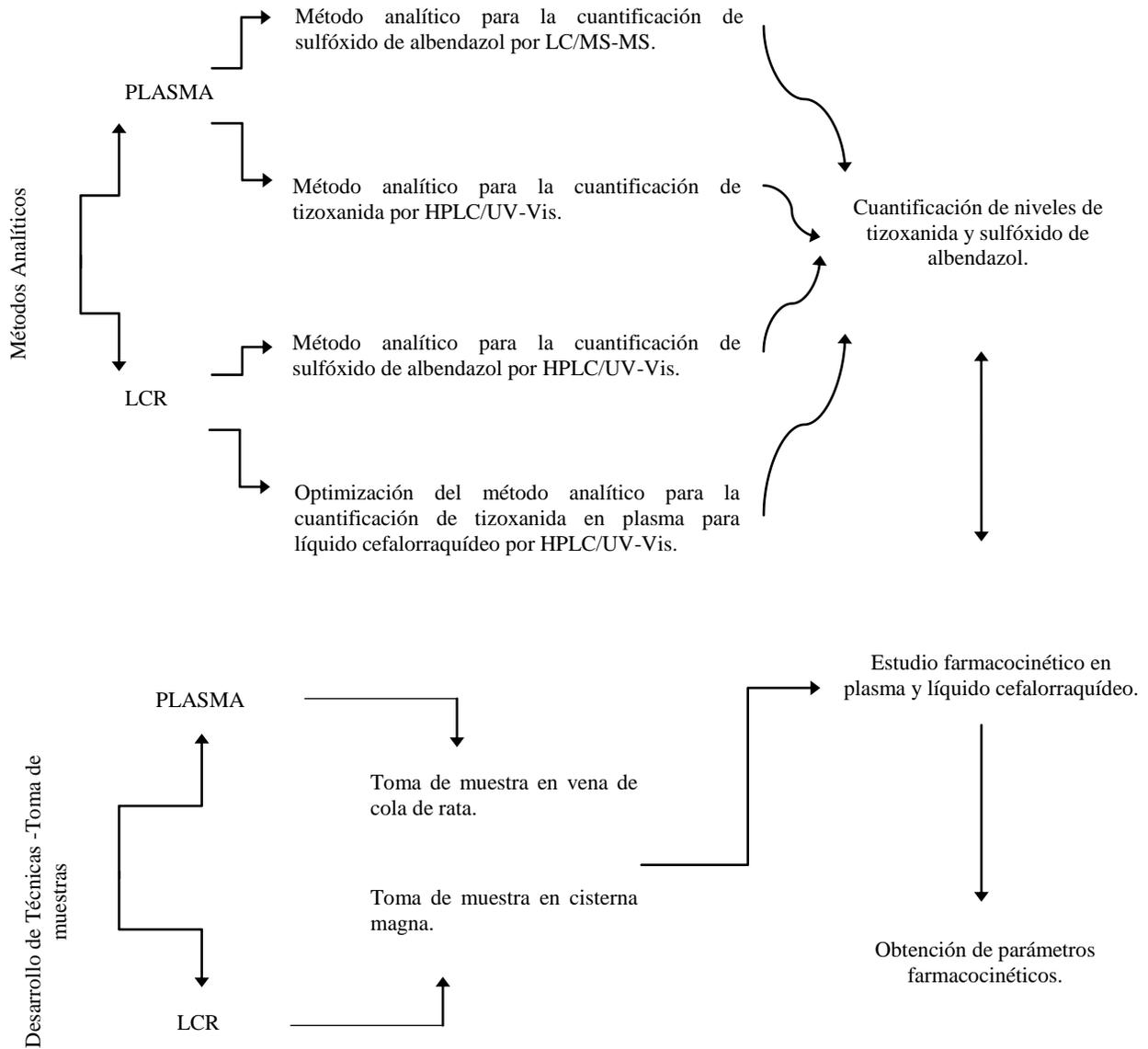


Figura 5. Diagrama experimental de la investigación.

5.1. Validación de métodos analíticos

La primera etapa de la parte experimental consistió en el desarrollo de los métodos analíticos para la cuantificación de niveles de los metabolitos activos de los fármacos a evaluar: sulfóxido de albendazol y tizoxanida. Los métodos fueron validados tanto en plasma como en líquido cefalorraquídeo.

A continuación se describe la metodología y los parámetros que se evaluaron.

5.1.1. Método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma de rata

El método analítico empleado para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma fue realizado por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a espectrometría de masas-masas.

5.1.1.1 Condiciones analíticas

Material y equipo

- Balanza analítica Sartorius, modelo i-1800
- Centrífuga Beckman, modelo TJ-6
- Agitador vortex Thermolyne, modelo M37615
- Agitador vortex de pulso Thermolyne, modelo WZ-51601-05
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con bomba cuaternaria marca Finnigan, modelo Surveyor
- Espectrómetro de masas con trampa de iones Finnigan, modelo LCQ Advantage Max
- Análisis cuantitativo en software Xcalibur 1.1 Finnigan

Reactivos

- Estándar secundario de sulfóxido de albendazol (99% de pureza, donado gentilmente por la M. en C. Alicia Hernández Campos de la Facultad de Química de la UNAM)
- Estándar secundario de mebendazol, estándar interno(Sigma-Aldrich)
- Ácido fórmico, ~98% (Fluka)
- Éter etílico, R.A. (J.T. Baker)
- Diclorometano R.A. (J.T. Baker)
- Cloroformo, R.A.(J.T. Baker)
- Metanol, R.A. y HPLC (J.T. Baker)
- Dimetilsulfóxido, ACS (Sigma-Aldrich)
- Agua destilada desionizada y filtrada

Soluciones

- Solución 20 mM de ácido fórmico
En un matraz aforado de 500-mL con agua desionizada se colocaron 385 mL de ácido fórmico y se llevaron a volumen con agua desionizada.
- Solución de extracción
En una probeta de 500 mL se mezclaron 300 mL de éter etílico, 150 mL de diclorometano y 50 mL de cloroformo.
- Solución 70:30 metanol: ácido fórmico 20 mM
En una probeta de 10 mL se mezcló 7 mL de metanol grado HPLC y se adicionó 3 mL de ácido fórmico a una concentración de 20 mM. Solución denominada como fase móvil (FM)

Preparación de soluciones stock

- Solución de sulfóxido de albendazol

Se pesaron 10 mg de sulfóxido de albendazol y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10-mL. Posteriormente se adicionaron 2 ml de cloroformo y se llevaron a volumen con metanol. Se sonicó por 30 min. Concentración 1 mg/mL.

- Solución de mebendazol

Se pesaron 5 mg de mebendazol, y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10-mL. Posteriormente se adicionaron 2 mL de dimetilsulfóxido y se llevó a volumen con metanol R.A. sonicando por 30 min. Concentración 500 µg/mL.

Preparación de soluciones estándar

Sulfóxido de albendazol

Se tomó 1 mL de la solución de 1 mg/mL y se llevó a 10-mL con una solución de metanol:agua:cloroformo 66.5:28.5:5 (v/v/v) de cloroformo. Solución con concentración de 100 000 ng/mL. (Std 1)

- Se tomó 1 mL de Std 1 y se llevó a volumen en un matraz de 10-mL con solución 70:30 metanol:agua (v/v). Solución con concentración de 10 000 ng/mL (Std 2)
- Se tomó 1 mL de Std 2 y se llevó a volumen en un matraz de 10-mL con solución 70:30 metanol (v/v). Solución con concentración de 1000 ng/mL (Std 3)

Mebendazol

- A partir de la solución stock de mebendazol (500 µg/mL) se preparó una solución con concentración final de 400 ng/mL por medio de 3 diluciones

consecutivas. Para la primera dilución se tomaron 2 mL de la solución stock y se llevó a 10-mL con metanol, de la solución anterior se tomaron 2.5 mL y llevaron a 10-mL con el mismo disolvente. Finalmente de la última dilución se tomó una alícuota de 400 μ L y llevaron a un volumen de 25-mL con metanol.

Curva patrón de sulfóxido de albendazol en plasma

El rango de la curva fue de 20-3000 ng/mL. La preparación de las soluciones se presenta en la tabla 1.

Tabla 1. Preparación de la curva de calibración en plasma para sulfóxido de albendazol.

ID Cal	ID Solución	[Inicial] ng/mL	Alícuota μ L	Aforo FM μ L	[Parcial] ng/mL	Alícuota μ L	Aforo Plasma μ L	[Final] ng/mL
C1	Std 3	1000	200	800	200	100	900	20
C2	Std 3	1000	500	500	500	100	900	50
C3	Std 2	10 000	125	875	1 250	100	900	125
C4	Std 2	10 000	250	750	2 500	100	900	250
C5	Std 2	10 000	500	500	5 000	100	900	500
C6	Std 1	100 000	75	925	7 500	100	900	750
C7	Std 1	100 000	150	850	15 000	100	900	1 500
C8	Std 1	100 000	300	700	30 000	100	900	3 000

Puntos control

Para evaluar la exactitud, precisión y recobro del método se prepararon puntos control a concentraciones de 40, 400 y 2000 ng/mL. La preparación de los mismos se presenta en la tabla 2.

Tabla 2. Preparación de puntos control en plasma de sulfóxido de albendazol.

ID	ID Solución	[Inicial] ng/mL	Alícuota μ L	Aforo FM	[Parcial] ng/mL	Alícuota μ L	Aforo Plasma μ L	[Final] ng/mL
PCB	Std 1	1000	400	600	400	100	900	40
PCM	Std 2	10 000	400	600	4 000	100	900	400
PCA	Std 3	100 000	200	800	20 000	100	900	2 000

Método de extracción

Para la extracción del sulfóxido de albendazol de la matriz biológica se empleó una extracción líquido-líquido. El procedimiento a seguir fue el siguiente:

- Transferir 200 μL de la muestra plasmática a un tubo de vidrio con rosca de 10 cm largo x 1.5 cm de diámetro.
- Añadir 100 μL de la solución de 400 ng/mL de mebendazol (estándar interno) y agitar.
- Adicionar 4.5 mL de la solución de extracción (éter:diclorometano:cloroformo, 60:30:10 v/v/v).
- Agitar 5 minutos en vortex con pulsación a una velocidad de 95 rpm.
- Centrifugar por 30 minutos a 3000 rpm.
- Separar la fase orgánica a tubos de ensayo de 10 cm de largo por 1.5 de diámetro.
- Evaporar a sequedad con corriente de nitrógeno a 40°C por 30 minutos.
- Reconstituir con 160 μL de una solución metanol:agua 70:30 (v/v).
- Inyectar 25 μL al sistema cromatográfico.

Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes:

- Fase móvil: metanol grado HPLC: ácido fórmico (20 mM) en una proporción 70:30
- Flujo: 0.7 mL/ min
- Columna analítica: Phenomenex Gemini C18 (100 mm x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5 μm)
- Guarda columna: Phenomenex C18 (4.0 x 2.0 mm)
- Temperatura del automuestreador: 15°C
- Temperatura de la columna: 30°C
- Split: 1/3
- Volumen de inyección: 25 μL
- Tiempo de corrida: 4 min

Condiciones de detección

Las condiciones de detección fueron las siguientes:

- Modo de detección: ESI (+)
- Voltaje del capilar: 3.5 kV
- Temperatura del capilar: 290°C
- Temperatura de la línea de transferencia: 360°C
- Gas acarreador: nitrógeno a 23 p.s.i.
- Gas auxiliar: helio 4 L/min
- Cuantificación: modo de SRM (selction reaction monitoring)

Tabla 3. Condiciones de detección de los iones.

Analito	Partición (m/z)	Energía de Colisión (eV)
Sulfóxido de albendazol	282 → 240	25
Mebendazol	296 → 264	32

5.1.1.2. Validación del método analítico

Los parámetros utilizados para validar el método analítico fueron los siguientes:

Selectividad

Con el fin de evaluar las posibles interferencias en el análisis, se determinó la selectividad del método analítico. Para ello se analizaron:

- Muestra blanco de una mezcla de plasma de tres ratas diferentes.
- Muestra blanco conteniendo sulfóxido de albendazol a una concentración de 3000 ng/mL.
- Muestra blanco conentiendo mebendazol a una concentración de 400 ng/mL.
- Muestra blanco conteniendo tizoxanida a una concentración de 2000 ng/mL
- Muestra blanco conteniendo nifuroxazida a una concentración de 6000 ng/mL
- Muestra blanco hemolizada

Las muestras fueron procesadas de acuerdo a lo descrito en el método de extracción (sección 5.1.1.1.). Criterio de aceptación: ni la tizoxanida ni la nifuroxazida deben presentar picos cromatográficos al tiempo de retención de sulfóxido de albendazol y mebendazol.

La muestra de sulfóxido de albendazol, no debe presentar ninguna interferencia al tiempo de retención de mebendazol y viceversa y además la muestra con mebendazol no debe presentar interferencia al tiempo de retención de tizoxanida.

Intervalo de trabajo

Se estableció en función de las concentraciones esperadas de sulfóxido de albendazol en plasma de rata en estudios farmacocinéticos descritos en la literatura (Roland y cols., 2005). El intervalo fue de 20 a 3000 ng/mL.

Linealidad

Para determinar la linealidad del método se procesaron tres curvas de calibración en plasma en el rango de 20 a 3000 ng/mL y se analizaron de acuerdo a lo establecido en la sección 5.1.1.1. Para cada una de las curvas se determinó el coeficiente de correlación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (b).

Criterio de aceptación: el coeficiente de correlación no debe ser menor a 0.98 y al evaluar el porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal éste no debe ser mayor al 15% con respecto al valor nominal a lo largo de todas las concentraciones evaluadas y para la concentración más baja de la curva ésta no debe ser mayor al 20%.

Recuperación absoluta

Para evaluar la eficiencia de la extracción, se analizaron por quintuplicado las concentraciones de 40, 400 y 2000 ng/mL. Los resultados se compararon con las respuestas de soluciones realizadas a las mismas concentraciones en solución.

Criterio de aceptación: el porcentaje de esta razón no necesariamente es del 100%, pero debe ser reproducibles a cada nivel de concentración (coeficiente de variación menor al 15%) y una variación entre ellas menor al 10%.

Precisión

Para determinar la precisión del método analítico, se evaluó la repetibilidad y reproducibilidad.

Repetibilidad

Se prepararon y analizaron en un mismo día de trabajo puntos control a concentraciones baja, media y alta (40, 200 y 2000 ng/mL) en condiciones idénticas de analista, equipo y laboratorio. Se calculó el promedio del coeficiente de variación de la respuesta a cada concentración por triplicado.

Criterio de aceptación: el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15%.

Reproducibilidad

Se prepararon y se analizaron por triplicado durante tres días consecutivos los puntos control a tres concentraciones del analito en cuestión (40, 200 y 2000 ng/mL). Se calculó el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación para cada concentración.

Criterio de aceptación: el coeficiente de variación no debe ser mayor al 15% para cada concentración.

Exactitud

A partir de los datos de repetibilidad y reproducibilidad, se calculó el porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal utilizando la siguiente fórmula:

$$\% \text{ Diferencia} = \frac{[\text{Experimental}] - [\text{Nominal}]}{[\text{Nominal}]} * 100$$

Criterio de aceptación: el valor del porcentaje de diferencia no debe exceder el + 15%

Límite de cuantificación

La concentración más baja del intervalo de trabajo se considera como el límite de cuantificación siempre y cuando dicha concentración sea exacta y precisa. Para comprobar la aseveración anterior se procesaron e inyectaron por quintuplicado muestras a una concentración de 20 ng/mL.

Criterio de aceptación: el valor promedio debe ser menor al 20% tanto para el coeficiente de variación como para el porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal.

Contaminación cruzada

Se procesaron muestras a una concentración de 2000 ng/mL de sulfóxido de albendazol y muestras de blancos extraídos. La prueba de contaminación cruzada consistió en llevar a cabo la inyección alternada de una concentración relativamente alta del analito y muestras blanco extraídas en dos ocasiones. Criterio de aceptación: la prueba se considera satisfactoria si los blancos de plasma no presentan señal mayor al 7% de la concentración determinada para el límite de cuantificación (20 ng/mL).

Supresión iónica

La prueba de supresión iónica se lleva a cabo mediante el uso de una llave T de la siguiente manera: el primer orificio se conecta a la salida de flujo de la columna cromatográfica y se mantiene a un flujo de 0.7 mL/min, el segundo orificio se conecta a la jeringa del detector que tiene como función la infusión de una solución a una concentración de 3000 ng/ml de sulfóxido de albendazol en solución a una velocidad de 25 µL/min, y el tercer orificio se conecta al espectro de masas.

La prueba consistió en inyectar una muestra blanco durante la infusión constante de una concentración alta de sulfóxido de albendazol (3000 ng/mL) y determinar la no existencia de la baja de señal al tiempo de retención del analito.

Estabilidad

En este trabajo no se evaluó la estabilidad para el sulfóxido de albendazol debido a que ya había sido evaluada previamente en el laboratorio de Neuropsicofarmacología, demostrándose que las muestras plasmáticas con sulfóxido de albendazol, son estables bajo condiciones de congelación a -70°C, al menos 60 días y a temperatura ambiente al menos 48 horas.

5.1.2 Método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo de rata

Para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo (solución artificial de líquido cefalorraquídeo) se selecciono un método por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a un sistema de detección UV-Vis.

5.1.2.1. Condiciones analíticas

Material y equipo

- Balanza analítica Sartorius, modelo CP 225 D
- Agitador vortex Max Mix II, modelo 37600 mixer

- Microcentrífuga Cole Parmer, modelo 60061
- Potenciómetro Hanna Instruments, modelo TH213
- Ultracongelador marca REVCO a $-70^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, Kendro Laboratory Products
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con bomba cuaternaria 2695 y detector espectrofotométrico con lámpara UV-Visible 2996, marca Waters.
- Análisis cuantitativo en software Epower 2.0.

Reactivos

- Estándar secundario de sulfóxido de albendazol (99% de pureza, fue donado gentilmente por la M. en C. Alicia Hernández Campos de la facultad de Química de la UNAM)
- Acetonitrilo, HPLC (J.T. Baker)
- Metanol, HPLC (J.T. Baker)
- Agua desionizada (filtrada)
- Dimetilsulfóxido, ACS (Sigma-Aldrich)
- Solución amortiguadora de fosfatos pH 7.4 (Gibco)
- Cloruro de sodio R.A. (J.T. Baker)
- Cloruro de potasio R.A. (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de calcio R.A. (Sigma-Aldrich)
- Cloruro de magnesio R. A. (J.T. Baker)

Soluciones

- Líquido cefalorraquídeo artificial

En un vaso de precipitados se colocaron los siguientes compuestos: cloruro de sodio 10.875 g, (125 mM), cloruro de potasio 0.279 g, (2.5 mM), cloruro de calcio 0.2778 g, (1.26 mM),

cloruro de magnesio 0.359 g, (1.18 mM) y se disolvieron en 1.5 L de solución salina PBS pH 7.4 (fosfato de sodio dibásico 2.97 mM y fosfato de potasio monobásico 1.06 mM).

- Preparación de soluciones de sulfóxido de albendazol
 - Se pesaron con exactitud 10 mg de sulfóxido de albendazol en un matraz de 10-mL y se llevaron a volumen con dimetilsulfóxido. Concentración 1 mg/mL. (Std 1)
 - De la solución anterior se tomó 1 mL y se colocó en un matraz de 10-mL para ser llevado a volumen con dimetilsulfóxido. Concentración 0.1 mg/mL (Std 2)

Curva patrón de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo

Se transfirieron alícuotas de las soluciones que se indican en la tabla y se llevaron a volumen en un matraz de 100-mL con solución de líquido cefalorraquídeo artificial (LCR).

Tabla 4. Preparación de la curva de calibración en LCR para sulfóxido de albendazol.

ID Calibración	ID Solución	[Inicial] mg/mL	Alícuota μ L	Aforo LCR (mL)	[Final] ng/mL
C1	Std 2	0.1	10	99.99	10
C2	Std 2	0.1	50	99.95	50
C3	Std 2	0.1	100	99.90	100
C4	Std 1	1	40	99.96	400
C5	Std 1	1	100	99.90	1000
C6	Std 1	1	150	99.85	1500

Puntos control para sulfóxido de albendazol

Para evaluar la exactitud y precisión del método se prepararon puntos control a concentraciones de 25, 250 y 1250 ng/mL. La preparación de los mismos se presenta en la tabla 5.

Tabla 5. Preparación de puntos control en LCR para sulfóxido de albendazol.

ID	ID Solución	[Inicial] mg/mL	Alícuota μ L	Aforo LCR (mL)	[Final] ng/mL
PCB	Std 2	0.1	25	99.98	25
PCM	Std 1	1	25	99.98	250
PCA	Std 1	1	125	99.88	1250

Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes:

- Flujo: 0.06 mL/min
- Columna analítica: Atlantis T3 (150 mm x 1 mm, con tamaño de partícula de 3.5 μ m) con cartucho de seguridad C₁₈ guarda columnas (4 mm x 3 mm marca Phenomenex)
- Temperatura del automuestreador: 15°C
- Temperatura de la columna: 30°C
- Volumen de Inyección: 20 μ L \pm 5
- Tiempo de corrida 40 min
- Tiempo de retención: 22 minutos
- Longitud de onda: 293 nm
- Fase móvil: Se empleó gradiente, el cual se muestra en la tabla 6.

Tabla 6. Gradiente para sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo.

Tiempo (min)	Componente (%)		
	Agua	Metanol	Acetonitrilo
0	95	2.5	2.5
15	40	30	30
16	40	30	30
25	10	45	45
35	10	45	45

5.1.2.2. Validación del método analítico

Se utilizó líquido cefalorraquídeo simulado como matriz biológica para la cuantificación de sulfóxido de albendazol para este método analítico, con excepción de la prueba de selectividad. Los parámetros a evaluar fueron los siguientes:

Selectividad

Se evaluó por triplicado inyectando al sistema 20 μ L de líquido cefalorraquídeo proveniente de los animales que se utilizaron en el estudio farmacocinético. Criterio de aceptación: ninguna de estas muestras debe presentar un pico cromatográfico al tiempo de retención del sulfóxido de albendazol.

Intervalo de trabajo

El intervalo de trabajo del método se estableció de 10 a 1500 ng/mL.

Linealidad

Se realizaron tres curvas de calibración en líquido cefalorraquídeo simulado según el procedimiento descrito en la tabla 4. Los resultados de áreas obtenidos se ajustaron a un modelo de regresión lineal en la cual se consideró el área de la respuesta como variable dependiente y a la concentración correspondiente al analito como variable independiente. Se obtuvo el coeficiente de correlación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (m).

Criterio de aceptación: el coeficiente de correlación no debe ser menor a 0.98 y la desviación estándar no debe ser mayor a 15% con respecto al valor nominal a lo largo de todas las concentraciones evaluadas y para la primera concentración de la curva éste no debe ser mayor al 20%.

Precisión y exactitud

Se prepararon por triplicado concentraciones conteniendo 25, 250 y 1250 ng/mL. Los resultados de esta prueba se evaluaron utilizando los mismos criterios establecidos para la validación del método en plasma.

5.1.3. Método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma de rata

El método analítico para la cuantificación de tizoxanida metabolito activo de la nitazoxanida fue por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a detección de espectrofotometría visible.

5.1.3.1. Condiciones analíticas

Material y equipo

- Balanza analítica Sartorius, modelo CP 225 D
- Centrífuga Beckman, modelo 25-R
- Agitador vortex Max Mix II, modelo 37600 mixer
- Micro centrífuga Cole Parmer, modelo 60061
- Potenciómetro Hanna Instruments, modelo TH213
- Ultracongelador marca REVCO, modelo A126
- Cromatógrafo de líquidos de alta resolución con bomba cuaternaria 2695 y detector espectrofotométrico con lámpara UV-Visible 2996, marca Waters.
- Análisis cuantitativo en software Enpower versión 2.1

Reactivos

- Estándar secundario tizoxanida (síntesis realizada por el Dr. Rafael Castillo Bocanegra, UNAM)
- Estándar primario de nifuroxazida, estándar interno N2541-5G (Sigma-Aldrich)
- Acetonitrilo, HPLC (J.T. Baker)
- Metanol, HPLC (J.T. Baker)
- Agua desionizada (filtrada)
- Fosfato de sodio monobásico y dibásico para biología molecular, mínimo 98.5% R.A. (Sigma-Aldrich)
- Dimetilsulfóxido de, ACS (Sigma-Aldrich)
- Hidróxido de sodio R.A. (Sigma-Aldrich)

Soluciones

- Solución amortiguadora de fosfatos 20 mM, pH 5.7

La preparación de la solución de fosfato de sodio monobásico se realizó transfiriendo a un matraz volumétrico de 500-mL 1.45 g de fosfato de sodio monobásico los cuales se disolvieron y se llevaron a volumen con agua desionizada. Para el caso de la preparación de la solución de fosfato de sodio dibásico se transfirieron 0.108 g de fosfato de sodio dibásico a un matraz volumétrico de 500-mL, los cuales se disolvieron y se llevaron a volumen con agua desionizada. Las soluciones anteriores se mezclaron y se ajustaron a un pH a 5.7 con una solución de hidróxido de sodio 0.1 N.

– **Preparación de las soluciones stock**

- Solución stock de tizoxanida

Se pesaron 5 mg de tizoxanida y se transfirieron a un matraz volumétrico de 10-mL llevándolos a volumen con dimetilsulfóxido. Concentración 500 µg/mL.

- Solución stock de nifuroxazida

Se realizó el peso de 5 mg de nifuroxazida los cuales fueron transferidos a un matraz volumétrico de 10-mL. Se llevaron a volumen con dimetilsulfóxido. Concentración 500 µg/mL.

– **Preparación de soluciones estándar**

- Tizoxanida

- Se tomaron 200 µL de la solución de 500 µg/mL y se adicionaron 800 µL de metanol. Solución con concentración de 100 000 ng/mL. (Std 1)

- Se tomaron 100 µL de la solución Std 1 y se adicionaron 900 µL de metanol. Solución con concentración de 10 000 ng/mL. (Std 2)

- Se tomaron 100 μL de la solución Std 2 y se adicionaron 900 μL de metanol. Solución con concentración de 1000 ng/mL. (Std 3)
- Nifuroxazida
 - Se preparó una solución de 6 $\mu\text{g/mL}$ de nifuroxazida a partir a partir de una de 500 $\mu\text{g/mL}$, tomando 600 μL y llevándolos a 50-mL con metanol.

Curva patrón de tizoxanida

Se transfirieron las siguientes alícuotas de las soluciones que se indican en la tabla 7 a criotubos y se llevaron a volumen con plasma o fase móvil.

Tabla 7. Preparación de la curva de calibración.de tizoxanida en plasma.

ID Cal	ID Solución	[Inicial] ng/mL	Alícuota μL	Aforo FM	[Parcial] ng/mL	Alícuota μL	Aforo Plasma μL	[Final] ng/mL
C1	Std 3	1000	200	800	200	100	900	20
C2	Std 2	10000	40	960	400	100	900	40
C3	Std 2	10000	80	920	800	100	900	80
C4	Std 2	10000	160	840	1600	100	900	160
C5	Std 2	10000	320	680	3200	100	900	320
C6	Std 1	100000	64	936	6400	100	900	640
C7	Std 1	100000	128	872	12800	100	900	1280

Puntos control para tizoxanida

Para evaluar la exactitud, precisión y recobro del método se prepararon puntos control a concentraciones de 70, 400 y 1000 ng/mL. La preparación de los mismos se presenta en la tabla 8.

Tabla 8. Preparación de puntos control de tizoxanida en plasma.

ID	ID Solución	[Inicial] ng/mL	Alícuota μL	Aforo FM	[Parcial] ng/mL	Alícuota μL	Aforo Plasma μL	[Final] ng/mL
PCB	Std 2	10000	70	930	700	100	900	70
PCM	Std 2	10000	400	600	4000	100	900	400
PCA	Std 1	100000	100	900	10000	100	900	1000

Análisis de muestras

La preparación de las muestras se realizó empleando un método de precipitación de proteínas, utilizando acetonitrilo como agente precipitante.

El procedimiento a seguir fue el siguiente:

- Tomar 200 μ L de la muestra y colocarlos en criotubos de 1.5 mL
- Añadir 100 μ L de estándar interno (nifuroxazida, 6 μ g/mL)
- Agitar en vortex durante 10 segundos
- Adicionar 200 μ L de acetonitrilo grado HPLC
- Agitar durante 2 minutos
- Guardar las muestras a -70° C durante 15 minutos
- Retirar las muestras y centrifugar a 15 000 rpm durante 20 minutos
- Separar la fase orgánica y transferir a criotubos de 500 μ L
- Centrifugar durante 1 minuto
- Tomar 150 μ L e inyectar 100 μ L al sistema cromatográfico

Condiciones cromatográficas

Las condiciones cromatográficas empleadas fueron las siguientes:

- Fase móvil: solución amortiguadora de fosfatos pH 5.7:acetonitrilo: metanol en un gradiente que se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Gradiente del método para la cuantificación tizoxanida.

Tiempo (min)	Componente (%)		
	Sol. Amortiguadora	Metanol	Acetonitrilo
0	90	5	5
20	30	35	35
30	10	45	45

- Flujo 0.4 mL/min
- Columna analítica: X-Terra C₁₈ (150 x 4.6 mm, con tamaño de partícula de 5 µm)
- Guarda columna: Phenomenex C18 (4.0 x 2.0 mm)
- Temperatura de la columna: 30°C
- Temperatura del automuestreador: 15°C
- Volumen de inyección: 100 µL
- Tiempo de corrida: 25 min
- Tiempos de retención: 22.3 min para nifuroxazida y 17.2 para nitazoxanida
- Longitud de onda: 416 nm

5.1.3.2. Validación del método analítico

Los parámetros que se mencionan a continuación se realizaron para validar el método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma de rata. Los criterios de aceptación corresponden a los empleados para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma.

Selectividad

Con el fin de evaluar las posibles interferencias en el análisis, se analizaron:

- Muestra blanco de una mezcla de plasma de tres ratas diferentes
- Muestra blanco conteniendo tizoxanida a una concentración de 2000 ng/mL
- Muestra blanco conteniendo nifuroxazida a una concentración de 6000 ng/mL
- Muestra blanco conteniendo sulfóxido de albendazol a una concentración de 3000 ng/mL
- Muestra blanco conteniendo mebendazol a una concentración de 400 ng/mL.
- Muestra blanco hemolizada

Intervalo

El intervalo seleccionado para este método analítico fue de 20 a 1280 ng/mL.

Linealidad

La linealidad del método se determinó preparando tres curvas patrón en plasma en concentraciones de 20 a 1280 ng/mL de acuerdo a la tabla 7. Para cada curva se realizó un ajuste por el método de mínimos cuadrados a un modelo de tipo lineal, tomando a la relación de la concentración de tizoxanida/nifuroxazida en plasma como la variable “X” y la respuesta como variable “Y”. Para evaluar la linealidad se calculó el coeficiente de determinación (r^2), la pendiente (m) y la ordenada al origen (m) de las rectas obtenidas.

Recuperación absoluta

Se analizaron por quintuplicado concentraciones conocidas de 70, 400 y 1000 ng/mL de tizoxanida en plasma de acuerdo con el procedimiento descrito en la tabla 8 y se comparó la respuesta con la respuesta de tizoxanida en solución a la misma concentración.

Precisión y exactitud

Al igual que el método para sulfóxido de albendazol, se evaluó repetibilidad y reproducibilidad, utilizando las concentraciones de 70, 400 y 1000 ng/mL por triplicado y se procesaron según lo descrito en el apartado 5.1.3.1. Los resultados así como la evaluación del cumplimiento de esta prueba deben ser los mismos que para el método anterior.

Limite de cuantificación

Se prepararon por quintuplicado muestras de tizoxanida a una concentración de 20 ng/mL en plasma, se procesaron y se inyectaron al sistema.

Estabilidad

Se evaluaron las condiciones en las que la tizoxanida permanece estable en plasma, durante su manejo, almacenamiento y procesamiento, evaluando la respuesta (concentración) del compuesto por analizar en la matriz biológica.

Para el estudio se evaluaron dos niveles de concentración en plasma por duplicado (70 y 1000 ng/mL) a temperatura ambiente, estabilidad de la muestra procesada, estabilidad en el automuestreador, ciclos congelación-descongelación (-20°C) y congelación a largo plazo (-20°C), de la siguiente manera:

a) Estabilidad a corto plazo

- Estabilidad a temperatura ambiente

Para realizar este experimento, se prepararon por duplicado dos series de muestras control. Una serie, fue preparada y conservada en la mesa de trabajo durante 8 horas en condiciones de temperatura ambiente antes de ser procesada e inyectada y la otra serie se procesó y analizó inmediatamente.

- Estabilidad de la muestra procesada

Al igual que el caso anterior, se prepararon por duplicado dos series de muestras control. Una serie, fue procesada y conservada en refrigeración a 4°C por 24 horas, pasando este periodo de tiempo se inyectó y los resultados fueron comparados contra muestras recién preparadas.

- Estabilidad en el automuestreador

Se prepararon por duplicado dos series de muestras control y se procesaron. Una de ellas se inyectó después de ser procesada la muestra y la otra se mantuvo a 15°C durante 72 horas

en ausencia de luz, dentro del automuestreador del sistema cromatográfico y posteriormente se inyectó.

- Ciclos de congelación y descongelación

Se prepararon por duplicado los puntos control y se colocaron en el ultracongelador. Al término de 24 horas, se descongelaron a temperatura ambiente, sin calentar. Esto constituyó un ciclo de congelación-descongelación. Se realizaron dos ciclos antes de analizar las muestras para una de las series y se comparó con el resultado de la otra serie de reciente preparación.

b) Estabilidad a largo plazo

- Estabilidad a 3 meses

La estabilidad a largo plazo consistió en el almacenamiento de muestras de plasma adicionadas con fármaco durante un periodo de 3 meses a una temperatura de -70°C , las cuales, al término de este periodo, se analizaron junto con muestras de reciente preparación para así poder demostrar su estabilidad.

Criterio de aceptación: se consideran adecuada la estabilidad, si las muestras cumplen con los criterios de exactitud y repetibilidad antes descritos al ser comparados contra la concentración obtenida de las muestras frescas.

5.1.4. Cuantificación de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo de rata

Para la cuantificación de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo se utilizaron las mismas condiciones cromatográficas que las descritas en la sección 5.1.3.1.

Las soluciones stock y estándar utilizadas en esta sección se prepararon según lo descrito en la sección 5.1.3.1. que corresponde a las condiciones analíticas para tizoxanida.

Curva de calibración de tizoxanida

Como se indica en la tabla 10 se tomaron alícuotas y se llevaron a 1 mL con la solución de líquido cefalorraquídeo simulado (LCR).

Tabla 10. Preparación de la curva de calibración en LCR para tizoxanida.

ID Cal	ID Solución	[Inicial] ng/mL	Alícuota μ L	Aforo Acetonitrilo	[Parcial] ng/mL	Alícuota μ L	Aforo LCR μ L	[Final] ng/mL
C1	Std 3	1000	100	900	100	100	900	10
C2	Std 3	1000	200	800	200	100	900	20
C3	Std 2	10000	40	960	400	100	900	40
C4	Std 2	10000	80	920	800	100	900	80
C5	Std 2	10000	160	840	1600	100	900	160
C6	Std 2	10000	320	680	3200	100	900	320

5.1.4.1. Evaluación del método

Se realizó la prueba de selectividad inyectando un blanco de líquido cefalorraquídeo obtenido a partir de tres distintas fuentes de fluido de animales, además de la linealidad por medio de una curva de calibración.

5.2. Estudio farmacocinético en plasma y líquido cefalorraquídeo de albendazol y nitazoxanida

– Material quirúrgico

- Juego de material quirúrgico básico (pinzas mosco curvas, pinzas de disección con dientes, porta agujas, hoja de bisturí del #3, tijeras tipo Iris para corte, escalpelo del #3-marca, Bochem)
- Material desechable de cirugía (sutura negra trenzada 4-0 y 3-0 con aguja, catgut crómico 3-0 con aguja -marca Ethicon-, jeringas estériles de 1mL (27G), 3 mL (20G) y de 10 mL (20G) –marca Becton-Dikinson-, cinta adhesiva micropore, guantes estériles de nitrilo, cubrebocas, bata quirúrgica, bolsas de desecho biológico, isopos estériles, gasas estériles de 2.5 x 5 cm, máquina para rasurar, alfileres).
- Material para implante de cánula en cerebro (tornillos de acero inoxidable con punta plana, acrílico dental, instrumental para hacer incisiones dentales)
- Cánulas
 - Cirugía de cola: se realizó la unión de un tubo de 5 cm de PE 50 (D.I 0.023 in x D.E. 0.038 in, pared de 0.11 in) con 5 cm de PE 10 (D.I. 0.025 in x D.E. 0.047 in, 0.011 in).
 - Cirugía de cisterna magna: tubo de acero inoxidable de 1 cm de longitud con grosor 23 G con punta redondeada.
 - Estereotáxico, perteneciente al Laboratorio de neurofisiología, del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía marca David Kopf modelo 902.

– Soluciones

- Solución para anestesia general

Se realizó una mezcla de 2.5 mL de hidrocloreuro de ketamina (100 mg/mL, Anesket, PiSa) con 2.5 mL hidrocloreuro de xilacina (sol. inyectable 20 mg/mL,

Procin, PiSa). Dicha disolución se almacenó a 4°C y antes de ser usada se llevó a temperatura ambiente.

- Solución salina

Se utilizó una solución salina inyectable al 0.9 % de cloruro de sodio (PiSa, México)

- Solución de heparina

Se preparó mezclando 2 mL de solución de heparina de sodio inyectable que contenía 1000 UI/mL con 100 mL de solución salina quedando una concentración de 20 UI/mL (PiSa, México)

- Gentamicina

Se llevó a cabo una dilución de gentamicina con solución salina para obtener una concentración de 120 µg/mL (PiSa, México)

- Otras soluciones

Alcohol al 96%, GR (JT Baker)

- **Forma farmacéutica**

- Albendazol:

- Nombre comercial: Zentel
- Principio activo: albendazol
- Forma farmacéutica: suspensión, cada 10 mL contienen 400 mg del principio activo
- Laboratorio fabricante: GlaxoSmith Kline
- Número de lote: 33011307
- Fecha de caducidad: Noviembre 2009

- Nitazoxanida
 - Nombre comercial: Paramix
 - Principio activo: nitazoxanida
 - Metabolito activo: tizoxanida
 - Forma farmacéutica: suspensión, cada 5 mL contienen 100 mg del principio activo
 - Laboratorio fabricante: Liomont
 - Número de lote: P05113
 - Fecha de Caducidad: Mayo 2010

- **Otros instrumentos**
 - Sonda esofágica curva de punta bola para rata, calibre 16 acero inoxidable
 - Criotubos de 1.5 mL , Eppendorf
 - Microviales de 200 μ L, Agilent Technologies
 - Centrífuga Beckman TJ-6, Beckman
 - Ultracongelador REVCO a $-70^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$, Kendro Laboratory Products

- **Animales de experimentación**

Se utilizaron ratas macho de la cepa Sprague-Dawley de 305 ± 15 g de peso adquiridas en Harlan Inc, México. Los especímenes se mantuvieron en el bioterio de la UNAM Facultad de Química y se manipularon de acuerdo a las guías para el cuidado y uso de animales de laboratorio (NRC 1999 auspiciada por la Facultad de Medicina de la UNAM). Los animales tuvieron libre acceso al agua de bebida y alimento, en cuartos de temperatura controlada a 18°C - 23°C , humedad relativa de 40-70%, aire filtrado al 95% de eficiencia y ciclos de luz-obscuridad c/12 horas. El alimento y encamado fue esterilizado previo a su uso y el agua de

beber se trató con generación de ozono. Se mantuvieron antes y durante el estudio en jaulas de policarbonato.

5.2.1. Procedimiento experimental

El siguiente diagrama de flujo tiene como objetivo presentar la estructura general del estudio farmacocinético en plasma y líquido cefalorraquídeo.

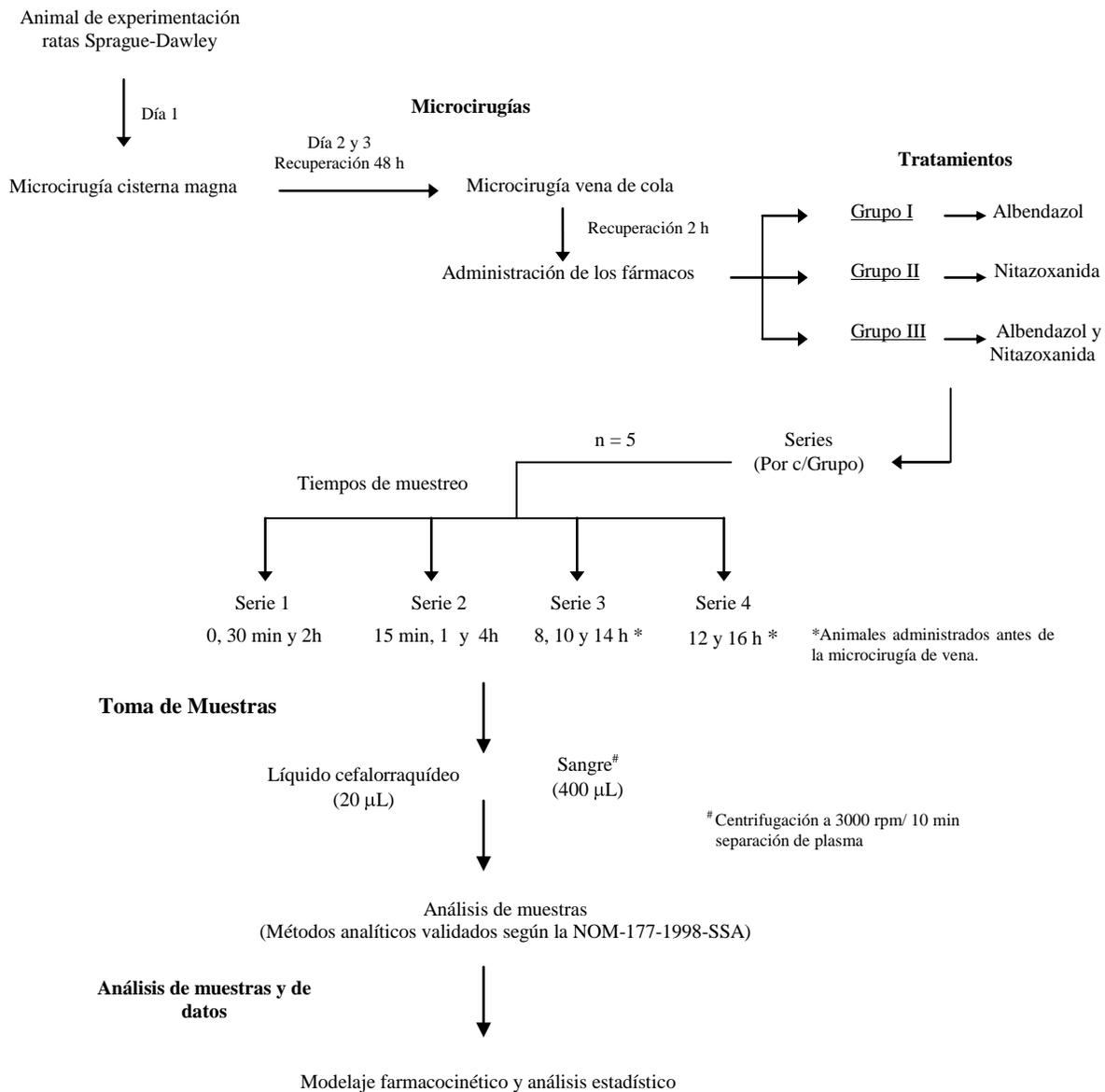


Figura 6. Diagrama experimental del estudio farmacocinético en plasma y LCR.

El procedimiento experimental está dividido en 4 rubros que serán descritos en esta sección.

5.2.2. Microcirugías

Previo a cada cirugía los animales se pesaron y se les administró una solución de anestésico previamente preparada a una dosis de 50 mg/Kg para ketamina y a una dosis de 10 mg/Kg de xilacina por peso vía intraperitoneal. Una vez revisado la ausencia del arco reflejo de las extremidades del animal se comenzó con el procedimiento microquirúrgico.

a) Microcirugía en cisterna magna

Para la implantación de la cánula guía en la cisterna magna (zona de muestreo), se utilizó un método reportado por Consiglio y Lucion (2000), el cual describe una técnica de implantación que permite la toma de muestras repetidas de líquido cefalorraquídeo por gravedad, sin daño a la integridad del animal.

El procedimiento consiste en realizar una incisión en la parte superior del cráneo para localizar las siguientes coordenadas:

- Antero-posterior: -2.7 mm (posterior a la línea interaural)
- Vertical: - 6.2 mm (por debajo de la dura madre)
- Lateral: 0 mm
- Incisivos superiores: -3.2 mm (por debajo de la línea interaural)

Se comprobó que con la inserción de la cánula guía se podía obtener el fluido biológico y evitar lastimar al animal innecesariamente.

Una vez localizado el sistema (ver diagrama de flujo figura 6), se realizó la trepanación y la inserción de la cánula con un ángulo de 31° a una profundidad de 2 mm ya insertada, se fijó con acrílico dental y se suturó. Finalmente se administró una dosis de gentamicina de 3.5 mg/kg como bactericida. Transcurridas 48 h el animal se sometió a la microcirugía en cola.

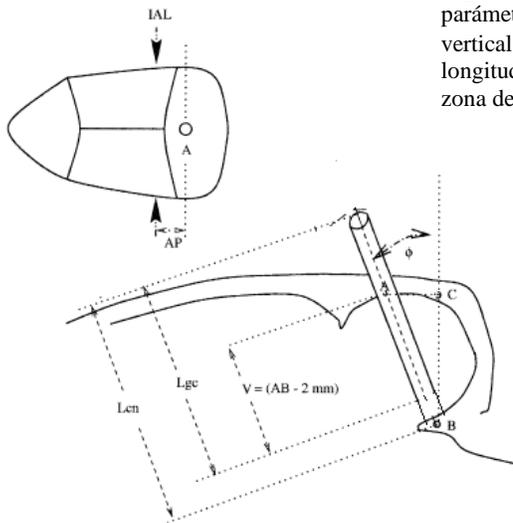


Figura 7. Implantación quirúrgica de la cánula guía. Los parámetros esterotáxicos son antero-posterior (AP) = -2.7mm A, vertical (V)= -6.2mm, lateral (L)= 0, ángulo $\theta = 31^\circ$, Lcn= longitud de la cánula (16 mm, C) y Lgc= longitud total hasta la zona de muestreo (18 mm, B).

b) Microcirugía en vena lateral de cola

La toma de muestras sanguíneas se llevó a cabo tomando como base un reporte publicado el cual consiste en la implantación del catéter en vena lateral de cola de rata. La técnica utilizada tiene como objetivo disminuir el estrés del animal para poder ser muestreado y asegura durante el periodo de muestreo las 3R's básicas para mantener la fisiología animal (reducción, refinamiento y reemplazamiento). Después de que los animales se sometieron a la microcirugía se mantuvieron en jaulas de policarbonato por un periodo de 2 a 3 horas hasta su recobro total.

5.2.3. Tratamientos y desarrollo del estudio

Los animales del estudio estuvieron divididos en 3 grupos de 6 animales, a los cuales se les administraron por vía oral, los siguientes tratamientos:

- Grupo I: Zentel (albendazol) a una dosis de 15 mg/kg
- Grupo II: Daxon (nitazoxanida) a una dosis de 7.14 mg/kg
- Grupo III: Zentel y Daxon a la dosis de 15 mg/Kg y 7.14 mg/Kg, respectivamente

Se tomaron muestras de sangre y líquido cefalorraquídeo a los siguientes tiempos de muestreo: 0, 15 y 30 min, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16 horas después de la administración del fármaco

Las muestras de sangre se colectaron y se colocaron en tubos heparinizados de 1.5 mL y se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min se separó el plasma y se guardó a -70°C hasta su análisis. Los niveles en plasma y líquido cefalorraquídeo fueron cuantificados empleando los métodos analíticos previamente validados.

5.2.4. Parámetros farmacocinéticos

Los datos obtenidos del bioanálisis fueron modelados usando el programa WinNonLin 4.0 (Pharsight, Mountain View, CA, USA), empleando un modelo no compartimental. Los parámetros calculados fueron: concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima (t_{max}), área bajo la curva del perfil plasmático de concentración en función del tiempo hasta el último punto ($\text{AUC}_{(0 \rightarrow t)}$), vida media de eliminación ($t_{1/2}$), tiempo medio de residencia (TMR).

5.2.5. Análisis estadístico

Con el fin de comparar los parámetros evaluados entre los tres grupos, se utilizó la prueba de Student para dos muestras, empleando un nivel de significancia de 0.05 ($p < 0.05$).

6. Resultados y discusión

6.1. Validación de métodos analíticos

Los métodos analíticos desarrollados fueron validados con el fin de contar con resultados confiables y demostrar que su capacidad satisface los requisitos para la aplicación analítica, es decir estudios de farmacocinética.

6.1.1. Método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma de rata

Para el proyecto se desarrolló una técnica basada en la extracción líquido-líquido de éter:diclorometano:cloroformo a una proporción de 60:30:10 v/v/v. Los resultados se muestran a continuación:

Selectividad

En la figuras 8 y 9 se presentan los resultados de selectividad del método para la cuantificación de sulfóxido de albendazol. En ellas se puede observar que no se presentaron interferencias a los tiempos de retención del metabolito o del estándar interno y el número de cuenta que se indica en el cromatograma corresponde al nivel de ruido del equipo.

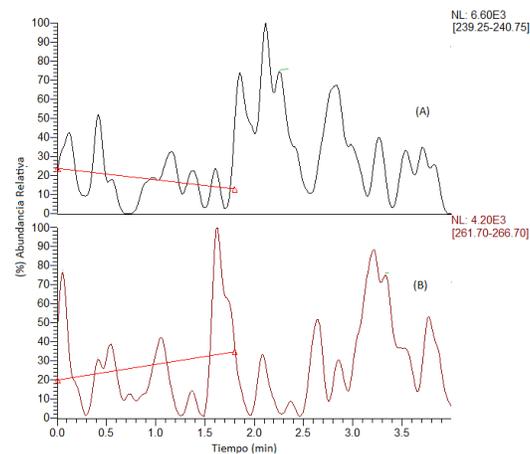


Figura 8. Cromatograma típico de un blanco de plasma.

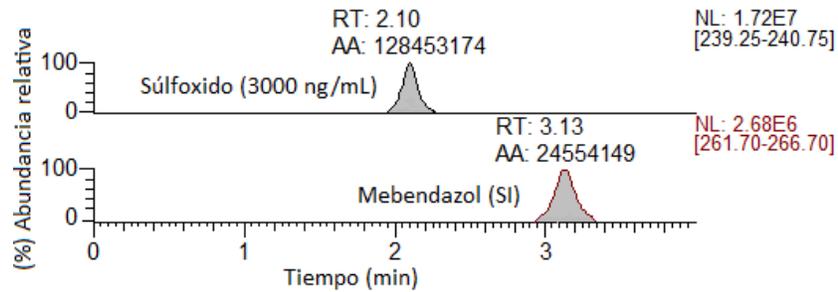


Figura 9. Cromatograma típico de una muestra de plasma a 3000 ng/mL de sulfóxido de albendazol.

En el caso de métodos desarrollados por espectrometría de masas la contaminación cruzada es un factor que debe ser evaluado para el caso de la selectividad. Generalmente ocurre cuando los iones de un evento de escaneo continúan presentes en la celda de colisión cuando se está llevando a cabo el escaneo de la siguiente transición, provocando señales que se ven reflejadas en el cromatograma en curso. Esto puede ser especialmente problemático cuando se llevan a cabo dos o más eventos de colisión que se están escaneando al mismo tiempo y no se sabe los posibles iones fragmento que se generen de los compuestos en curso. (Yamagishi y cols., 2005)

En la figura 10 se representan los cromatogramas típicos de muestras blanco procesadas y adicionadas con: (A) sulfóxido de albendazol a una concentración de 3000 ng/mL, (B) mebendazol a una concentración de 400 ng/mL, (C) tizoxanida a una concentración de 1280 ng/mL y (D) nifuroxazida a una concentración de 6000 ng/mL. En ellas se puede observar que en A y B no se presentan señales al tiempo de retención de mebendazol para el caso de la evaluación de sulfóxido y de sulfóxido para el caso de mebendazol, demostrando con eso la ausencia de picos cromatográficos así mismo para C y D, asegurando con esto, la ausencia de algún posible factor que afecte a la selectividad del método.

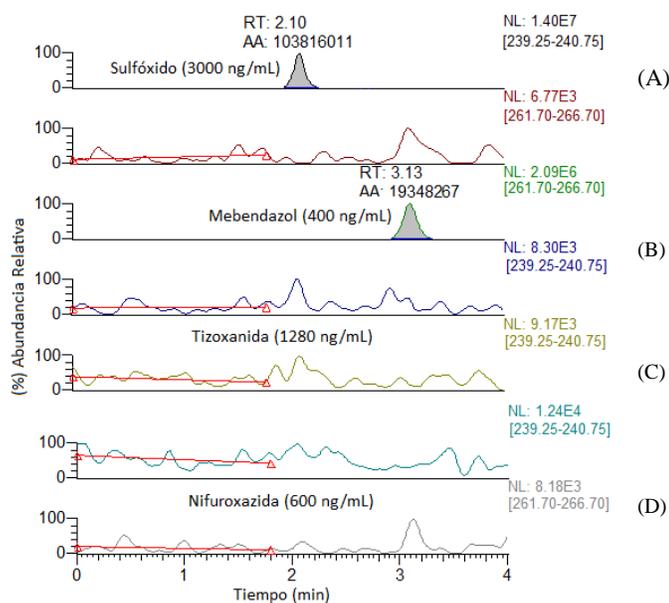


Figura 10. Selectividad del método analítico.

Linealidad

En la figura 11, se representa la ecuación derivada de la regresión lineal por mínimos cuadrados de acuerdo con la ponderación lineal $1/x$, resultante de graficar la relación de áreas para sulfóxido de albendazol entre el estándar interno y la concentración nominal de sulfóxido de albendazol. En la tabla 11, se muestran los resultados de concentración cuantificada obtenidos de las tres curvas de calibración.

En ninguna de las concentraciones evaluadas, el valor de la diferencia entre la concentración experimental y la concentración nominal fue mayor al 8.3% (tabla 12). De igual manera, los resultados indican que el método analítico para cuantificar sulfóxido de albendazol en plasma es lineal en el rango de concentraciones de 20 a 3000 ng/mL ya que los valores de coeficiente de correlación fueron mayores que 0.99. Se obtuvo un valor global para la pendiente y la ordenada al origen, (m) 0.0024, (b) 0.0072 respectivamente (tabla 11).

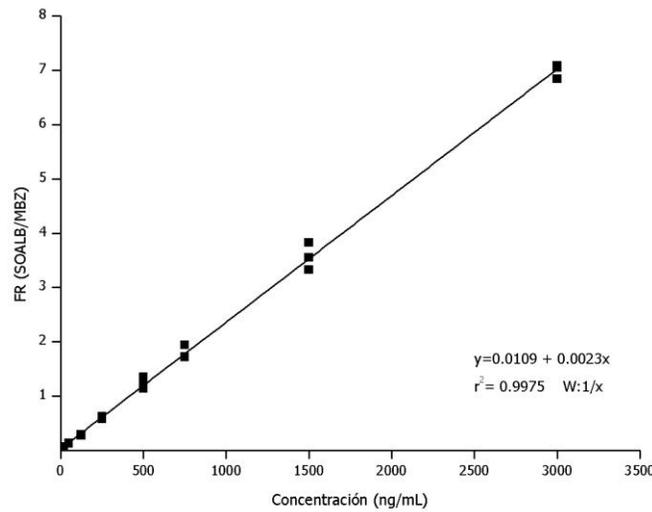


Figura 11. Linealidad del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma de 20 a 3000 ng/mL.

Tabla 11. Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación en plasma de sulfóxido de albendazol.

Día de análisis	r ²	Pendiente	Ordenada
1	0.9975	0.0023	0.0109
2	0.9997	0.0024	0.0046
3	0.9986	0.0024	0.0060

Tabla 12. Linealidad. Concentraciones cuantificadas de sulfóxido de albendazol en plasma.

	Concentración nominal de las muestras de sulfóxido (ng/mL)							
	20.0	50.0	125.0	250.0	500.0	750.0	1500.0	3000.0
	Concentración cuantificada de las muestras de sulfóxido (ng/mL)							
1	17.52	52.94	112.80	260.09	513.12	727.39	1506.02	2904.45
2	20.86	48.39	119.70	241.61	478.47	820.02	1621.04	3006.43
3	22.02	51.80	111.37	253.38	569.21	726.73	1407.78	2990.76
Promedio	20.13	51.04	114.62	251.69	520.27	758.05	1511.61	2967.21
% D.E.	2.34	2.37	4.45	9.35	45.79	53.67	106.74	54.92
% C.V.	11.60	4.64	3.89	3.72	8.80	7.08	7.06	1.85
% Diferencia	0.67	2.09	-8.30	0.68	4.05	1.07	0.77	-1.09

Recobro absoluto

La tabla 13 muestra los resultados del recobro. En ella se puede observar que el método presenta un buen recobro, ya que el valor de eficiencia de extracción fue del 87.7% con una variación menor al 9.0% y una diferencia del porcentaje de recuperación menor al 10% en las tres concentraciones evaluadas.

Tabla 13. Recobro absoluto de sulfóxido de albendazol.

	Nivel de concentración de las muestras de sulfóxido (ng/mL)		
	40.0	400.0	2000.0
	Área de sulfóxido en las muestras acuosas		
	3755968	33177627	148894077
	2996521	36906237	141819960
	3720585	34012792	141866194
	3915575	36130966	145019834
	4002604	34426700	143100210
Promedio	3678251	34930864	144140055
% D.E.	398157.03	1542175.69	2958432.87
% C.V.	10.82	4.41	2.05
	Área de sulfóxido en las muestras de plasma		
	3050234	29873484	136825266
	3010629	31872702	145318757
	2923839	28376302	133425398
	3326699	26378452	126609285
	3367458	32410111	126417488
Promedio	3135771	29782210	133719239
% D.E.	198761.56	2492312.83	7876381.95
% C.V.	6.34	8.37	5.89
	Recuperación absoluta (%)		
	85.25	85.26	92.77
	Recuperación absoluta promedio (%)		
	87.77		
	Valor absoluto de la diferencia entre el % de recuperación absoluta y el promedio		
	2.51	2.50	5.01

Precisión y exactitud

Los resultados de exactitud y precisión se encuentran resumidos en las tablas 14 y 15. Los valores obtenidos para el coeficiente de variación no excedieron el valor del 15% en las diferentes concentraciones evaluadas, tanto para la prueba de repetibilidad como para reproducibilidad, lo cual permite inferir la precisión del método. Por otro lado los valores del porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal que se refieren a la exactitud fueron menores al 10% cumpliendo con los criterios establecidos.

Tabla 14. Precisión del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma.

	Concentración nominal de las muestras de sulfóxido (ng/mL)		
	40.0	400.0	2000.0
	Concentración cuantificada de las muestras de sulfóxido (ng/mL)		
Día 1	44.83	447.06	2074.98
	40.02	425.46	1978.02
	42.72	436.56	1987.28
Promedio	42.52	436.36	2013.43
% D.E.	2.41	10.80	53.51
% C.V.	5.67	2.48	2.66
Día 2	44.94	438.44	2159.14
	43.85	426.85	2103.41
	38.71	419.70	2237.30
Promedio	42.50	428.33	2166.62
% D.E.	3.33	9.46	67.26
% C.V.	7.83	2.21	3.10
Día 3	44.61	455.68	2156.14
	39.26	420.42	2103.41
	38.47	427.20	2237.29
Promedio	40.78	434.43	2165.61
% D.E.	3.34	18.71	67.44
% C.V.	8.19	4.31	3.11

Tabla 15. Exactitud del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en plasma.

	Concentración nominal de las muestras de sulfóxido (ng/mL)		
	40.0	400.0	2000.0
	% Diferencia con respecto al valor nominal		
Día 1	12.10	11.77	3.75
	0.05	6.37	1.10
	6.80	9.14	0.64
Promedio	6.32	9.09	1.93
Día 2	12.34	9.61	7.96
	9.61	6.71	5.17
	3.22	4.92	11.87
Promedio	8.39	7.08	8.28
Día 3	11.52	13.92	7.81
	1.84	5.10	5.17
	3.83	6.79	11.86
Promedio	5.74	8.60	8.28

Limite de cuantificación

El límite de cuantificación fue definido tomando en cuenta la sensibilidad del método al igual que la precisión y la exactitud. Tanto el porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal como el coeficiente de variación no excedieron un porcentaje del 20% para la concentración mínima evaluada que fue de 20 ng/mL según lo descrito en la parte experimental.

Contaminación cruzada

En la figura 12, se observa que después de la inyección de una muestra con analitos (A y C) no se presenta ningún pico cromatográfico al tiempo de retención del sulfóxido y del mebendazol en la muestra blanco (B y D), por lo tanto, el método analítico no presenta contaminación cruzada.

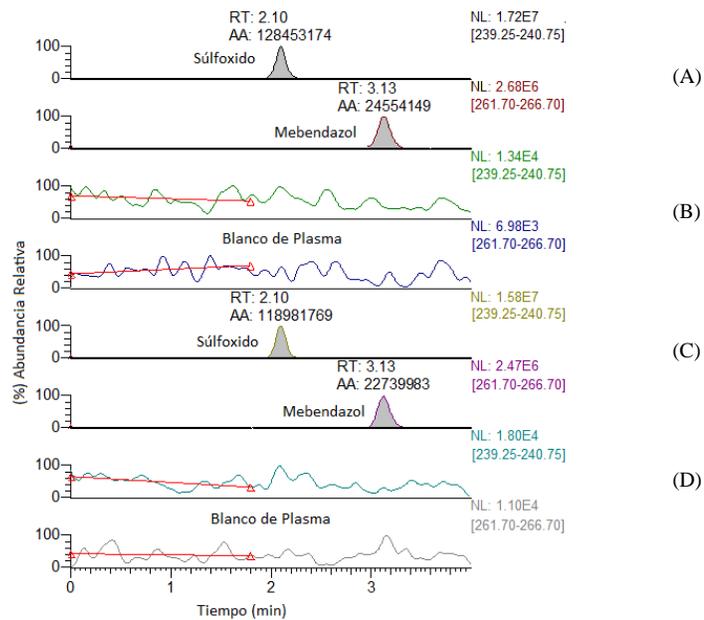


Figura 12. Prueba de contaminación cruzada.

Supresión iónica

La supresión de la señal en el espectrómetro de masas puede ser causada por sustancias contaminantes (sales o proteínas) presentes por procedimientos de extracción no específicos. Al emplear la metodología indicada en la sección 5.1.1.2. se puede observar que a los tiempos de retención de sulfóxido o mebendazol no se presenta alguna alteración en la señal que indique un efecto de supresión iónica. (figura 13)

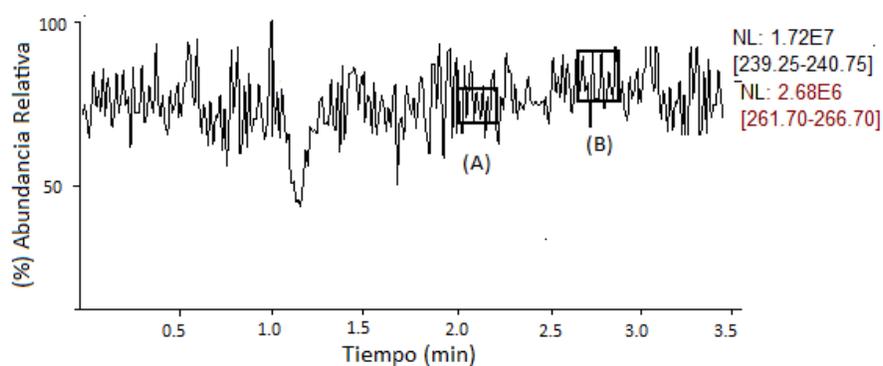


Figura 13. Prueba de supresión iónica. (A) Tiempo de retención del sulfóxido de albendazol y (B) de mebendazol.

6.1.2. Método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo

El líquido cefalorraquídeo es un fluido biológico que se encuentra en volúmenes pequeños y por tanto es difícil obtener del animal de estudio (rata). Por lo anterior, la validación se realizó en una solución artificial de líquido cefalorraquídeo que simulara las condiciones fisiológicas y de pH (7.4) de dicho fluido. (Patsalos y cols., 2004)

Selectividad

La figura 14 muestra el cromatograma típico después de la inyección de 20 μ L de líquido cefalorraquídeo. Al comparar los resultados con los que se presentan en la figura 15, se encontró que no existe ningún pico cromatográfico al tiempo de retención del analito de interés

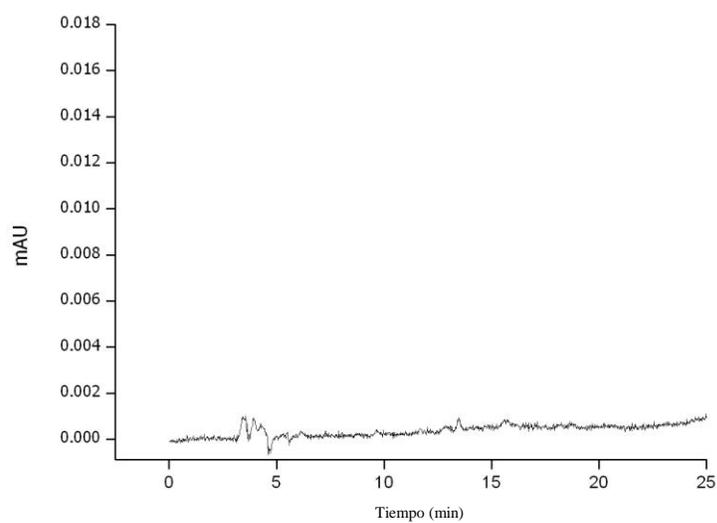


Figura 14. Cromatograma de una muestra blanco de líquido cefalorraquídeo.

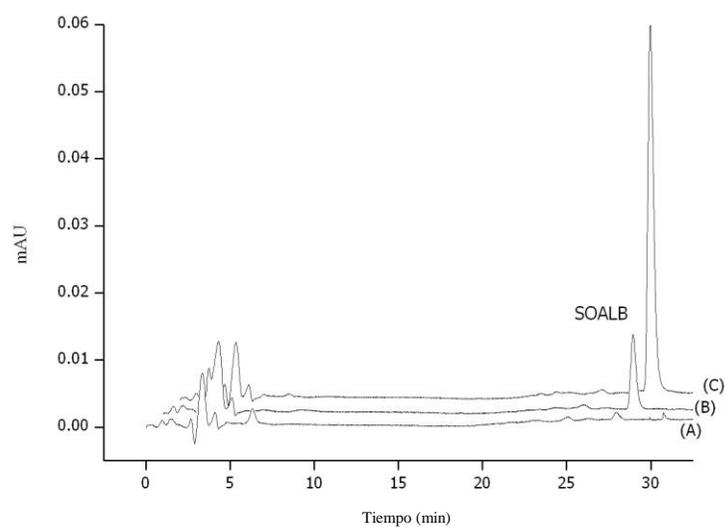


Figura 15. Cromatograma típico de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo en concentraciones de 25 (A), 250 (B) y 1250 (C) ng/mL.

Intervalo

Se ha reportado, que en el caso del sulfóxido de albendazol la relación líquido cefalorraquídeo/plasma se encuentra en el rango del 40 al 60% (Jung y cols., 1990). Con base en esta información y dado que la dosis a ser administrada sería de 15 mg/kg, para la validación del método analítico, se seleccionó el intervalo de concentración de 10 - 1500 ng/mL.

Linealidad

La figura 16 muestra la relación de la respuesta vs concentración del método cromatográfico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo. La tabla 16 muestra los valores de ordenada al origen, pendiente y coeficiente de determinación de las 3 curvas de calibración y la tabla 17 presenta el porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal para cada concentración evaluada. De acuerdo con los resultados obtenidos, se demuestra que el método es lineal en el rango de concentraciones estudiado.

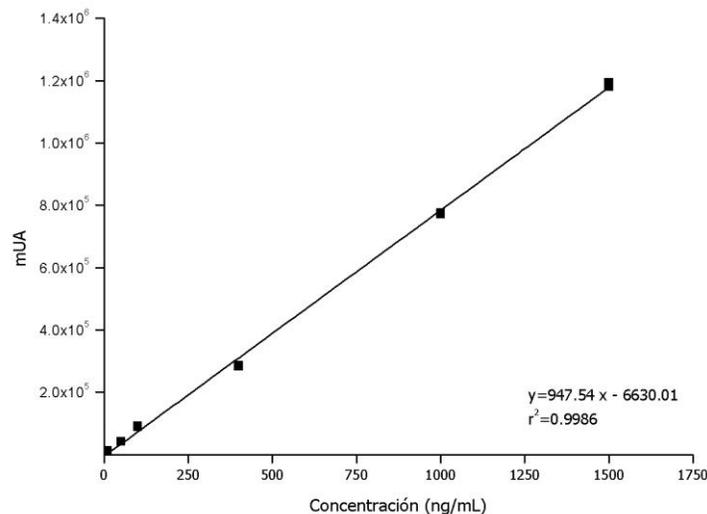


Figura 16. Linealidad del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo de 10 a 1500 ng/mL.

Tabla 16. Linealidad. Pendiente, ordenada al origen y coeficiente de correlación en líquido cefalorraquídeo de sulfóxido de albendazol

Día de análisis	r ²	Pendiente	Ordenada
1	0.9986	947.54	-6630.01
2	0.9999	941.68	-1528.61
3	0.9987	1058.41	-461.157

Tabla 17. Linealidad. Concentraciones cuantificadas de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo.

	Concentración nominal de las muestras de sulfóxido (ng/mL)					
	10.0	50.0	100.0	400.0	1000.0	1500.0
	Concentración cuantificada de las muestras de sulfóxido (ng/mL)					
1	10.12	50.11	99.38	395.46	998.20	1506.70
2	10.38	46.72	103.68	376.16	991.94	1542.60
3	10.79	53.11	95.75	369.18	980.02	1539.61
Promedio	10.43	49.98	99.60	380.27	990.05	1529.64
% D.E.	0.34	3.20	3.97	13.61	9.24	19.92
% C.V.	3.24	6.40	3.99	3.58	0.93	1.30
% Diferencia	4.30	-0.04	-0.40	-4.93	-0.99	1.98

Precisión y exactitud

Al evaluar el coeficiente de variación para las concentraciones de 25, 250, y 1250 ng/mL correspondientes a los puntos control, se observa que no excede el 5%; ello indica que el método es repetible y reproducible. (tabla 18)

Tabla 18. Precisión del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en LCR.

	Concentración nominal de las muestras de sulfóxido (ng/mL)		
	25.0	250.0	1250.0
	Concentración cuantificada de las muestras de sulfóxido (ng/mL)		
Día 1	25.15	251.08	1254.61
	25.91	254.28	1253.36
	25.28	255.11	1255.62
Promedio	25.45	253.49	1254.53
% D.E.	0.41	2.13	1.13
% C.V.	1.60	0.84	0.09
Día 2	24.58	239.11	1237.55
	25.24	239.84	1248.12
	25.61	230.42	1240.81
Promedio	25.14	236.46	1242.16
% D.E.	0.52	5.24	5.41
% C.V.	2.08	2.22	0.44
Día 3	27.85	246.84	1250.71
	26.15	240.80	1233.93
	25.46	251.53	1248.85
Promedio	26.49	246.39	1244.50
% D.E.	1.23	5.38	9.20
% C.V.	4.64	2.18	0.74

Asimismo la diferencia existente entre la concentración nominal con respecto a la concentración experimental no fue mayor al 15%, lo que demuestra que el método es exacto. (tabla 19)

Tabla 19. Exactitud del método analítico para la cuantificación de sulfóxido de albendazol en LCR.

	Concentración nominal de las muestras de sulfóxido (ng/mL)		
	25.0	250.0	1250.0
	% Diferencia con respecto al valor nominal		
Día 1	0.60	0.43	0.37
	3.64	1.71	0.27
	1.12	2.04	0.45
Promedio	1.79	1.39	0.36
Día 2	1.68	4.36	1.00
	0.96	4.06	0.15
	2.44	7.83	0.74
Promedio	1.69	5.42	0.63
Día 3	11.40	1.26	0.06
	4.60	3.68	1.29
	1.84	0.61	0.09
Promedio	5.95	1.85	0.48

6.1.3. Método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma de rata

Previo a la validación del método fue necesario desarrollar una técnica de extracción del fármaco de la matriz biológica (plasma) para lo cual, se evaluaron técnicas de extracción líquido-líquido, líquido-sólido y precipitación de proteínas. Para el caso de las dos primeras metodologías, se obtuvieron resultados poco reproducibles en comparación con el método de precipitación. Para esta última técnica se evaluaron diferentes proporciones de agentes precipitantes (metanol, acetonitrilo, ácido perclórico). Se encontró que para un volumen de 200 µL de muestra (plasma) se requiere una proporción de 2:1 (v/v) acetonitrilo:matriz biológica y 15 min de congelación a -70°C. Esta metodología concuerda con aquellas publicadas por Stockins y cols. y Rosignol y cols., en el año de 1996 y 2006 respectivamente, en donde se describe una técnica similar. A comparación de estas metodologías, la técnica desarrollada presenta un gradiente de elución ternario que permite obtener una buena separación y simetría del pico entre el analito de interés, el estándar interno y los compuestos endógenos de la matriz, además de un límite de cuantificación de 20 ng/mL, siendo el límite más bajo reportado a la fecha. (Stockins y cols., 1996, Rosignol y cols., 2006, Namur y cols., 2007)

A continuación se resumen los resultados de la validación de esta metodología bajo los lineamientos indicados en la parte experimental.

Selectividad

Los cromatogramas obtenidos al evaluar la selectividad no presentaron algún pico cromatográfico (figura 17) que interfiriera con los tiempos de retención de tizoxanida y nifuroxazida que fueron 22.3 y 17.2 min respectivamente (figura 18)

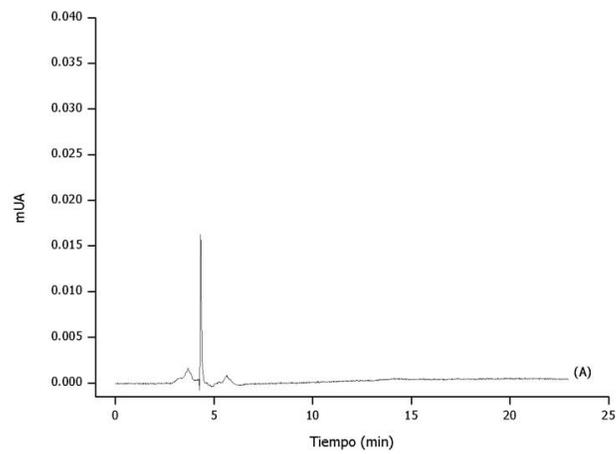


Figura 17. Cromatograma típico de un blanco de plasma.

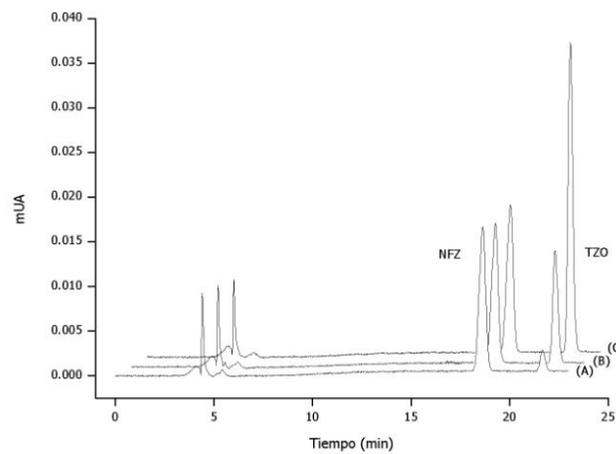


Figura 18. Cromatograma típico de tizoxanida en plasma en concentraciones de 70 (A), 400 (B) y 1000 (C) ng/mL.

Linealidad

La figura 19 presenta los resultados de linealidad al cuantificar tizoxanida en plasma en el rango de concentración de 20 a 1280 ng/mL. La ecuación de la curva representa el ajuste de los datos a un modelo matemático lineal por mínimos cuadrados. La información de la evaluación de la linealidad del método se muestra en las tablas 20 y 21.

Se obtuvo un valor global para la pendiente (m) de 0.00146 y para la ordenada al origen de -0.0029; el coeficiente de determinación fue mayor 0.99. En cuanto al porcentaje de diferencia relativa entre el valor cuantificado y el valor nominal fue menor al $\pm 5\%$ lo que indica que el método es lineal en el rango de concentraciones estudiado.

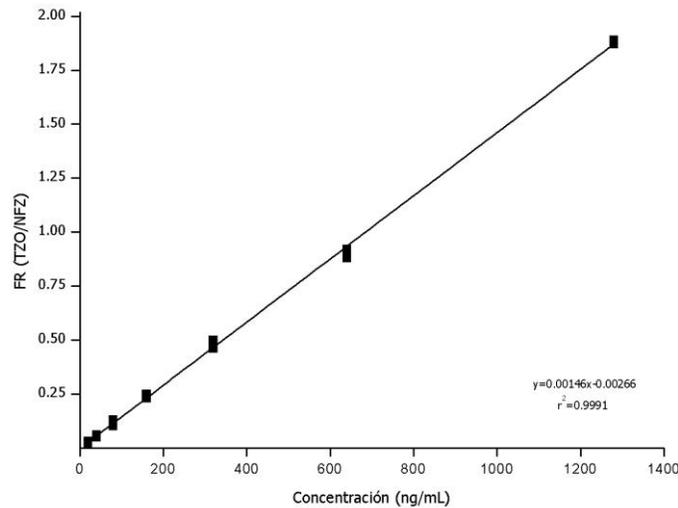


Figura 19. Linealidad del método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma de 20 a 1280 ng/mL.

Tabla 20. Linealidad. Pendiente ordenada al origen y coeficiente de correlación en plasma para tizoxanida.

Día de análisis	r ²	Pendiente	Ordenada
1	0.9993	0.00146	0.0022
2	0.9989	0.00146	-0.0166
3	0.9994	0.00147	0.0056

Tabla 21. Linealidad. Concentraciones cuantificadas de tizoxanida en plasma.

	Concentración nominal de las muestras de tizoxanida (ng/mL)						
	20.0	40.0	80.0	160.0	320.0	640.0	1280.0
	Concentración cuantificada de las muestras de tizoxanida (ng/mL)						
1	17.97	40.17	86.35	170.23	328.40	618.45	1290.43
2	21.91	43.46	77.48	166.49	328.55	638.06	1291.04
3	17.61	34.84	77.91	163.11	338.28	628.70	1282.51
Promedio	19.17	39.50	80.58	166.61	331.75	628.40	1288.33
% D.E.	2.38	4.35	5.00	3.56	5.66	9.80	4.76
% C.V.	12.44	11.01	6.21	2.14	1.71	1.56	0.37
% Diferencia	4.16	1.28	0.73	4.13	3.67	-1.81	0.62

Recobro absoluto

En la tabla 22 se presentan los resultados de recuperación absoluta. En ella se puede observar que el promedio del porcentaje de recobro para tizoxanida fue del 97.75% con una diferencia menor al 3 % para las tres concentraciones evaluadas y para el caso del estándar interno fue cercano al 95.30%.

Tabla 22. Recobro absoluto de tizoxanida en plasma.

	Nivel de concentración de las muestras de tizoxanida (ng/mL)		
	70.0	400.0	1000.0
	Área de tizoxanida en las muestras acuosas		
	37937	216548	574097
	36475	220146	618570
	38360	217559	615674
	39053	218973	598209
	36823	217628	586160
Promedio	37729.60	218170.80	598542
% D.E.	1070.95	1400.7	19010.6
% C.V.	2.83	0.64	3.18
	Área de tizoxanida en las muestras de plasma		
	38612	212452	583381
	34701	221565	552981
	38691	220227	579998
	37258	211415	558151
	35252	223611	586128
Promedio	36902.80	217854	572127.80
% D.E.	1858.64	5549.5	13758.85
% C.V.	5.03	2.55	2.69
	Recuperación absoluta (%)		
	97.80	99.85	95.58
	Recuperación absoluta promedio (%)		
	97.75		
	Valor absoluto de la diferencia entre el % de recuperación absoluta y el promedio		
	0.05	2.10	2.16

Precisión y exactitud

En la tabla 23 se muestra el promedio, la desviación estándar y el coeficiente de variación de las determinaciones para los tres niveles de concentración evaluados correspondientes a la precisión (repetibilidad y reproducibilidad) y en la tabla 24, se muestra el porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal que corresponden a la exactitud del método. Para el caso de la precisión se puede observar que el coeficiente de variación no presentó un valor por encima del 15% y para la exactitud el porcentaje de diferencia con respecto al valor nominal no fue mayor al 15% lo cual indica que el método es preciso y exacto.

Tabla 23. Reproducibilidad del método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma.

	Concentración nominal de las muestras de tizoxanida (ng/mL)		
	70.0	400.0	1000.0
	Concentración cuantificada de las muestras de tizoxanida (ng/mL)		
Día 1	73.34	424.69	1060.54
	73.94	428.83	1069.87
	73.83	427.69	1083.91
Promedio	73.70	427.07	1071.44
% D.E.	0.31	2.13	11.76
% C.V.	0.43	0.50	1.09
Día 2	71.28	368.94	931.77
	72.55	375.81	947.65
	75.03	368.49	950.43
Promedio	72.95	371.08	943.28
% D.E.	1.90	4.10	10.06
% C.V.	2.61	1.10	1.06
Día 3	72.58	388.17	974.94
	71.93	385.26	1008.48
	67.54	400.44	997.10
Promedio	70.68	391.29	993.50
% D.E.	2.74	8.05	17.05
% C.V.	3.87	2.05	1.71

Tabla 24. Exactitud del método analítico para la cuantificación de tizoxanida en plasma.

	Concentración nominal de las muestras de tizoxanida (ng/mL)		
	70.0	400.0	1000.0
	% Diferencia con respecto al valor nominal		
Día 1	4.77	6.17	6.05
	5.63	7.21	6.99
	5.47	6.92	8.39
Promedio	5.29	6.77	7.14
Día 2	1.83	7.77	6.82
	3.64	6.05	5.24
	7.19	7.88	4.96
Promedio	4.22	7.23	5.67
Día 3	3.69	2.96	2.51
	2.76	3.69	0.85
	3.51	0.11	0.29
Promedio	3.32	2.25	1.21

Limite de cuantificación y de detección

Al analizar por quintuplicado la concentración más baja del intervalo de trabajo (20 ng/mL), se encontró que el valor promedio fue de 20.7 ± 1.2 con un coeficiente de variación de 6.2% y un 3.8% de diferencia con respecto al valor nominal, valores menores al $\pm 20\%$, por lo que cumple con el criterio de aceptación. El límite de detección fue de 10 ng/mL.

Estabilidad

A la fecha no existen reportes de la estabilidad de tizoxanida en plasma. De acuerdo con la normatividad descrita tanto a nivel nacional como internacional la estabilidad de fármacos en la matriz biológica debe de ser documentada tanto a largo como a corto plazo. Los resultados de ambas pruebas se describen en las tablas 25 y 26.

Tabla 25. Estabilidad de tizoxanida a corto y largo plazo.

Ciclos de congelación y descongelación a -70°C	Concentración determinada inicialmente de las muestras de tizoxanida (ng/mL)		
	72.95	943.43	
	Concentración final de las muestras de tizoxanida (ng/mL)		
	79.30	958.48	
	73.90	947.04	
	79.45	946.23	
Promedio	77.55	950.58	
% D.E.	3.16	6.85	
C.V.%	4.08	0.72	
*% Diferencia	6.30	0.76	
Estabilidad en el automuestreador 72 h a 15°C	Concentración determinada inicialmente de las muestras de tizoxanida (ng/mL)		
	70.69	997.10	
	Concentración final de las muestras de tizoxanida (ng/mL)		
	76.57	993.91	
	73.51	980.60	
	71.71	962.36	
	Promedio	73.93	978.96
	% D.E.	2.46	15.84
C.V.%	3.32	1.62	
*% Diferencia	4.58	1.82	

En ellas se puede observar que las muestras procesadas pueden ser almacenadas durante 72 h a 15°C en el automuestreador antes de ser analizadas. Por otro lado, los resultados de las muestras

procesadas y sometidas a dos ciclos de congelación y descongelación a -70 °C así como aquellas que permanecieron en la mesa de trabajo por 24 h a 25°C indican que no hay una pérdida significativa que indique que existe degradación del principio activo. Finalmente, la estabilidad a largo plazo evaluada a los 45 días muestra que los valores de coeficiente de variación y el porcentaje de diferencia con respecto al valor cuantificado inicialmente son menores al 15 % por lo tanto, el análisis puede llevarse a cabo en un plazo igual o menor al evaluado.

Tabla 26. Estabilidad de tizoxanida a corto y a largo plazo. (continuación)

Estabilidad en la mesa de trabajo 24 h a 25 °C	Concentración determinada inicialmente en las muestras de tizoxanida (ng/mL)	
	70.96	997.10
	Concentración final de las muestras de tizoxanida (ng/mL)	
	65.16	894.35
	63.97	900.45
Promedio	64.86	899.15
%D.E.	64.67	897.98
C.V. %	0.62	3.21
% Diferencia	0.96	0.36
Estabilidad muestra procesada 4°C 24 h	Concentración determinada inicialmente en las muestras de tizoxanida (ng/mL)	
	73.83	1071.44
	Concentración final de las muestras de tizoxanida (ng/mL)	
	76.68	1118.67
	76.24	1097.15
Promedio	73.63	1116.14
% D.E.	75.52	1110.65
C.V.%	1.65	11.76
% Diferencia	2.18	1.06
Estabilidad a largo plazo 3 meses a -70°C	Concentración determinada inicialmente en las muestras de tizoxanida (ng/mL)	
	70.38	993.34
	Concentración final de las muestras de tizoxanida (ng/mL)	
	62.08	987.67
	67.34	890.24
Promedio	63.78	890.61
% D.E.	64.40	922.84
C.V.%	2.68	56.14
% Diferencia	4.17	6.08
	8.50	7.10

A la fecha existen pocos métodos analíticos para cuantificar tizoxanida en plasma. Algunos de ellos han sido utilizados para estudios farmacocinéticos en humanos (Stockis y cols., 1996 y Agarwal y cols., 2007) utilizando volúmenes de muestra de 0.5 mL los cuales no pueden ser utilizados para llevar a cabo estudios preclínicos. El método desarrollado requiere de 0.2 mL de plasma, el cual es un volumen pequeño y por tanto aplicable para llevar a cabo estudios de farmacocinética en animales.

6.1.4. Cuantificación de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo de rata

La evaluación de esta metodología se realizó en una solución artificial de líquido cefalorraquídeo.

Selectividad

La figura 21 muestra los cromatogramas de una muestra de blanco de líquido cefalorraquídeo proveniente de muestra de rata. En ella se puede apreciar que no se presentan interferencias al tiempo de retención de la tizoxanida. (figura 22)

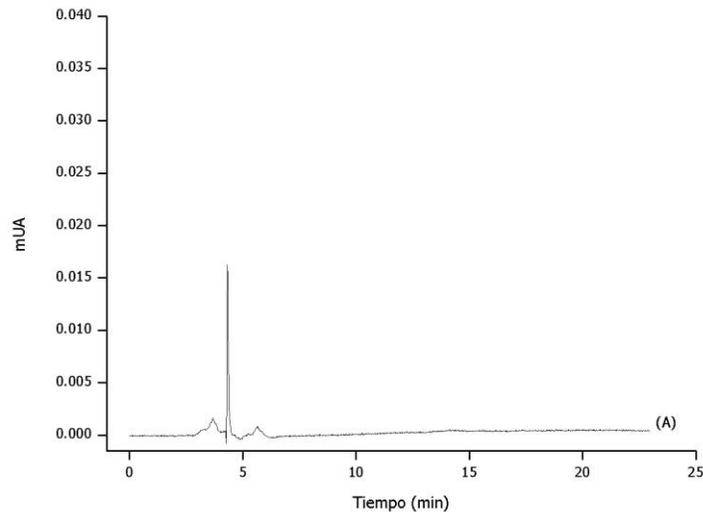


Figura 20. Cromatograma típico de un blanco de líquido cefalorraquídeo.

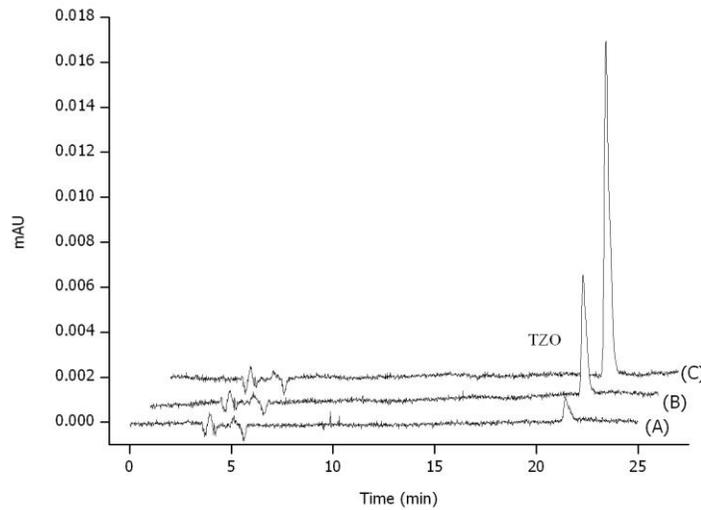


Figura 21. Cromatograma típico de 10 (A), 40 (B) y 320 (C) ng/mL de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo.

Linealidad

Al ajustar los datos a la ecuación $y = 0.00134x + 0.0038$ ponderada en $1/x$, el coeficiente de correlación fue mayor a 0.99 (figura 22) y la diferencia entre la concentración nominal y la experimental no fue mayor al 15% (tabla 27).

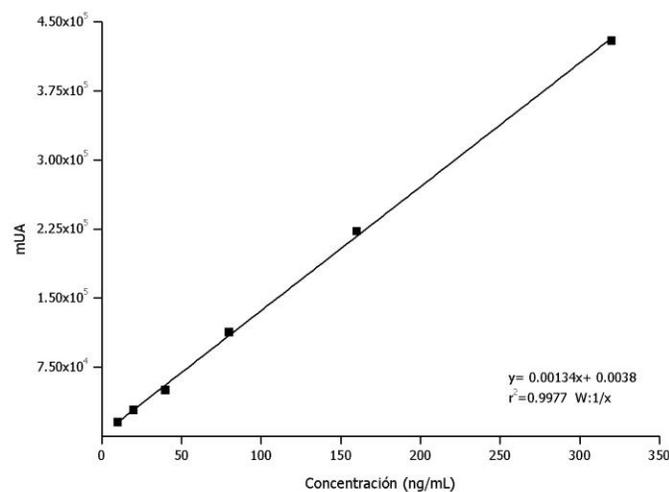


Figura 22. Linealidad del método analítico para la cuantificación de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo de 10 a 320 ng/mL.

Tabla 27. Linealidad. Concentraciones cuantificadas de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo.

	Concentración nominal de las muestras de tizoxanida (ng/mL)					
	10.0	20.0	40.0	80.0	160.0	320.0
	Concentración cuantificada de las muestras de tizoxanida (ng/mL)					
	9.13	18.11	34.16	80.95	169.85	316.03
% de Diferencia	8.70	9.40	14.59	1.19	6.16	1.24

6.2. Estudios farmacocinéticos

6.2.1. Nitazoxanida

6.2.1.1. Niveles de tizoxanida en plasma

Los resultados de la concentración promedio de tizoxanida a los diferentes tiempos de muestreo después de la administración en rata a una dosis oral de 7.14 mg/kg se describen en la tabla 28 y la representación gráfica correspondiente a estos datos se muestra en la figura 23.

Tabla 28. Valores promedio de la concentración plasmática de tizoxanida después de la administración de una dosis de 7.14 mg/Kg nitazoxanida. Cada valor representa el promedio \pm el EE.

Tiempo	Concentración plasmática (ng/mL)
0	0
0.25	233.02 \pm 10.0
0.5	116.99 \pm 14.5
1	90.81 \pm 14.6
2	38.81 \pm 11.8
4	19.63 \pm 5.4

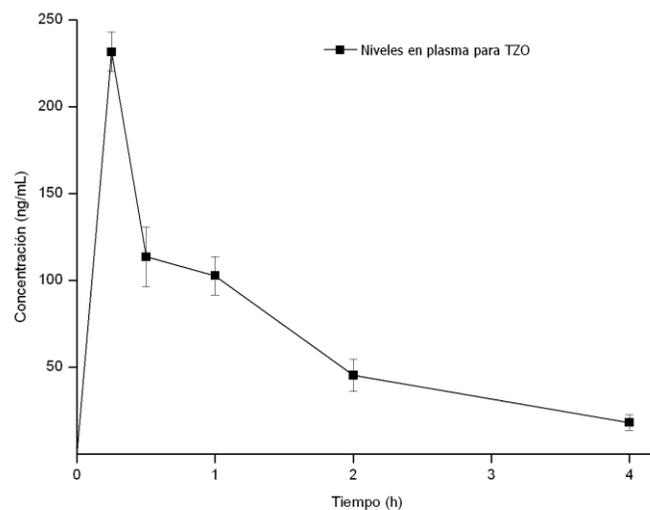


Figura 23. Perfil de concentración vs tiempo de tizoxanida después de la administración de una dosis de 7.14 mg/Kg de nitazoxanida en plasma. Cada punto representa el promedio de $n = 5 \pm$ EE.

Para el cálculo de los parámetros farmacocinéticos se empleó un modelo no compartimental cuyos resultados se presentan en la tabla 29.

Tabla 29. Parámetros farmacocinéticos de tizoxanida después de la administración de una dosis de 7.14 mg /Kg de nitazoxanida. (n=5)

Perfil	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	$AUC_{(0 \rightarrow t)}$ (ng*h/mL)	$AUC_{(0 \rightarrow \infty)}$ (ng*h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	$TMR_{(0 \rightarrow t)}$ (h)
TZO 7.14 mg/Kg						
1	0.25	246.15	223.46	238.33	1.02	1.06
2	0.25	285.15	246.86	270.77	1.07	1.48
3	0.25	233.91	235.70	267.28	1.12	1.16
4	0.25	258.52	366.89	450.13	1.65	1.39
5	0.25	198.38	167.44	232.66	2.50	1.25
Promedio	0.25	233.02	248.07	291.83	1.47	1.26
+ EE	-	10.11	32.70	30.87	0.28	0.075

Los resultados indican que la nitazoxanida se metaboliza completamente a tizoxanida, encontrándose únicamente niveles de esta última. La velocidad de formación de la tizoxanida después de la administración oral en suspensión fue rápida con un t_{max} de 0.25 h, valor menor al reportado en la literatura para humanos el cual es de 2.5 h. Por otro lado el valor de C_{max} obtenido fue de 0.23 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el área bajo la curva fue de 0.29 $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$ los cuales también son menores a los reportados en la literatura para humanos (1.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y 3.9 a 11.3 $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$, respectivamente) (Stockins y cols., 1996). Existen diversos factores que podrían explicar estas diferencias como son:

- a) La forma farmacéutica debido a que la suspensión tiene un 70% de biodisponibilidad con respecto a la tableta.
- b) Diferencias inter-especies en la absorción del fármaco, aseveración que resulta ser congruente con lo reportado en caballos ya que a una dosis de 25 mg/kg el área bajo la curva es de 1.9 $\mu\text{g}^*\text{h}/\text{mL}$ (IDEXX Pharmaceuticals, 2003) valor menor al mencionado en humanos a pesar de presentar una dosis mayor.
- c) A la influencia de los alimentos en la absorción de nitazoxanida. Se ha reportado que la ingesta del fármaco con alimentos aumenta en un 50% los parámetros de C_{max} y el área bajo la curva en el

caso de tabletas y en el caso de la suspensión el aumento es de 10% para C_{max} y de 45 a 50% para el área bajo la curva. (Prod Info Alinia, 2005) Los alimentos retardan el vaciamiento gástrico y estimulan la secreción de sales biliares, las cuales al actuar como tensoactivos pueden aumentar la solubilidad y por ende la absorción de fármacos de baja solubilidad, como es el caso de la nitazoxanida.

Por otro lado a pesar de que se tomaron muestras durante 12 h, después de las 4 h no se detectaron concentraciones del metabolito. Al realizar el análisis farmacocinético, se encontró que el metabolito se elimina rápidamente, con una vida media de 1.47 h, valor comparable al de humanos el cual es de 1.03 a 1.6 h y muy diferente al reportado en cabras en donde la vida media promedio es de 3.47h. (Zhao y cols., 2009)

6.2.1.2. Niveles de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo

La barrera hematoencefálica restringe la libre difusión de moléculas a través de la membrana endotelial, evitando el transporte de la mayoría de sustancias que provienen del sistema circulatorio y a pesar de que las sustancias logren traspasarla, existen diversos transportadores que se conocen como “transportadores de reflujo”, que se encargan de devolver lo ya transportado al sistema circulatorio. (Wang y cols., 2007)

A la fecha no existe ningún estudio que sustente el paso de la tizoxanida a través de la barrera hematoencefálica. Los resultados de este estudio mostraron que 0.5 horas después de la administración oral del fármaco (7.14 mg/Kg, 500 mg) los niveles de tizoxanida en líquido cefalorraquídeo fueron de 35 ng/mL, que corresponden al 31% de la concentración encontrada en plasma. Este resultado muestra que el metabolito es capaz de cruzar la barrera hematoencefálica información que hasta el momento se desconocía sin embargo, la concentración en líquido cefalorraquídeo fue baja a la dosis administrada, por lo que no fue posible cuantificarlo a los demás tiempos de muestreo y por ende no fue posible caracterizar los parámetros farmacocinéticos.

La dosis letal 50 (LD₅₀) reportada para cisticercos es de 0.124 µg/mL (Palomares-Alonso y cols., 2004), por lo que los niveles encontrados en líquido no serían adecuados para alcanzar el efecto cisticida. Dado que la nitazoxanida presenta un amplio margen de seguridad (LD₅₀ en rata: 10 mg/kg,) sería conveniente realizar un estudio con dosis más altas para poder establecer si este fármaco pudiera ser útil para el tratamiento de la cisticercosis.

6.3.2. Albendazol

6.3.2.1 Niveles de sulfóxido de albendazol en plasma

En la tabla 30 se presentan los valores promedio de la concentración plasmática de sulfóxido de albendazol a cada tiempo de muestreo después de la administración de 15 mg/Kg vía oral. El perfil farmacocinético se presenta en la figura 24. Los parámetros farmacocinéticos se muestran en la tabla 31.

Tabla 30. Valores promedio de la concentración plasmática de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de 15 mg/Kg. Cada valor representa el promedio ± EE.

Tiempo	Concentración plasmática (ng/mL)
0	0
0.25	110.51 ± 19.7
1	362.12 ± 98.1
2	1003.92 ± 164.5
4	1654.39 ± 437.7
8	1170.58 ± 185.2
10	1145.75 ± 131.8
12	964.23 ± 113.3
14	497.72 ± 156.0
16	269.84 ± 50.5

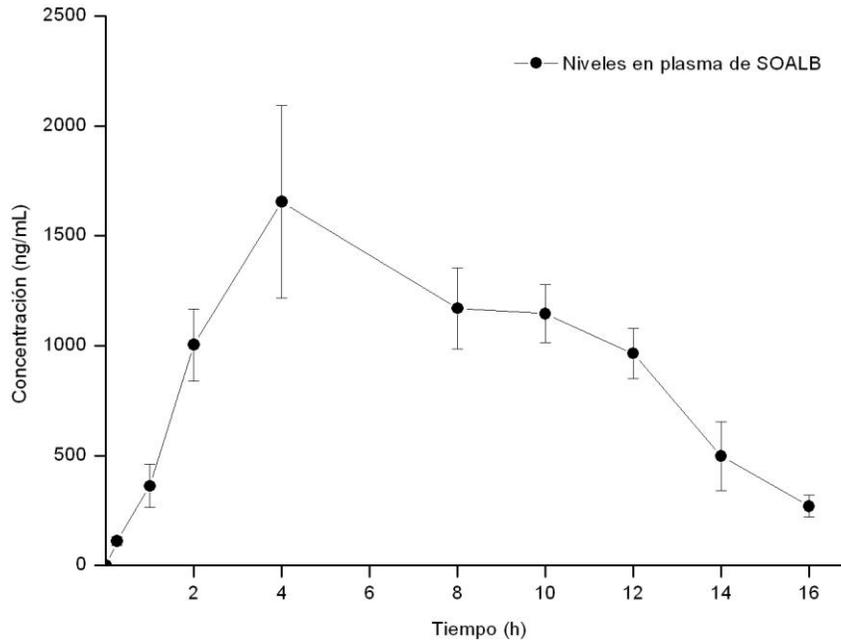


Figura 24. Perfil de concentración vs tiempo de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de albendazol de 15 mg/Kg en plasma. Cada punto representa el promedio de $n=5 \pm EE$.

Tabla 31. Parámetros farmacocinéticos de sulfóxido de albendazol en plasma después de la administración de albendazol a una dosis de 15 mg/Kg. ($n=5$)

Perfil	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC (0 → t) (ng*h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	TMR _(0 → t) (h)
SOALB (15 mg/Kg)					
1	4	2398.54	17196.24	1.76	7.19
2	8	1615.42	17512.85	2.21	8.31
3	12	1273.11	12670.27	2.74	10.47
4	4	2860.04	17725.42	2.71	6.75
5	8	1599.57	15278.41	3.79	8.42
Media	7.20	1979.34	16076.64	2.64	8.22
+ EE	1.50	293.45	955.908	0.33	0.65

Al igual que la tizoxanida, el albendazol se absorbe rápidamente y se metaboliza extensamente, por lo que el sulfóxido de albendazol pudo ser cuantificado desde el primer tiempo de muestreo (0.5 h). Por otro lado en cuanto a los parámetros farmacocinéticos, el valor promedio de t_{max} fue de 7.2 h, con una concentración máxima de 1.9 $\mu\text{g/mL}$. Estos resultados son semejantes a los reportados por Redondo y cols (1998) en el mismo modelo animal, cuyo valor fue de 6.5 h. En el caso de humanos, el valor de t_{max} es de 3.16 h (Mares y cols., 2004) lo que hace pensar que la absorción es más lenta

en animales que en humanos. En relación a la vida media de eliminación, el valor fue de 2.64 h el cual es congruente con respecto a otros estudios en rata el cual se reporta con un valor de 2.32 h (Redondo y cols., 1998) mientras que el valor reportado para humanos es de 9.85 h (Mares y cols., 2005). Lo anterior sugiere que la velocidad de eliminación es más rápida en especies pequeñas.

6.3.2.2 Niveles de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo

La tabla 32 muestra las concentraciones promedio de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo a los diferentes tiempos de muestreo después de la administración de albendazol a una dosis de 15 mg/Kg y en la figura 25 se muestra la expresión gráfica de estos valores.

Tabla 32. Valores promedio de la concentración en LCR de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de 15 mg/Kg (n=5). Cada valor representa el promedio \pm EE.

Tiempo	Concentración en LCR (ng/mL)
0	0
0.25	35.93 \pm 10.6
1	47.59 \pm 7.8
2	104.50 \pm 26.2
4	115.24 \pm 50.4
8	162.71 \pm 30.0
10	158.41 \pm 24.3
12	217.80 \pm 65.5
14	140.84 \pm 44.1
16	83.96 \pm 19.6

En ellas se puede observar que el sulfóxido de albendazol, pudo cuantificarse desde el primer tiempo de muestreo, lo que indica que el metabolito cruza rápida y fácilmente la barrera hematoencefálica. En un estudio llevado a cabo por Jung y colaboradores en 1998 se encontró que, después de la administración de una dosis de 15 mg/kg a pacientes con neurocisticercosis durante un periodo de 8 días, la relación plasma/líquido cefalorraquídeo de sulfóxido de albendazol en el estado estacionario fue de 2:1, mientras que en el presente estudio la proporción fue de 4:1. Las diferencias podrían deberse a que las condiciones de equilibrio que se alcanzan en el estado

estacionario son diferentes a las obtenidas con una dosis única o bien a una diferencia entre especies en la distribución del albendazol.

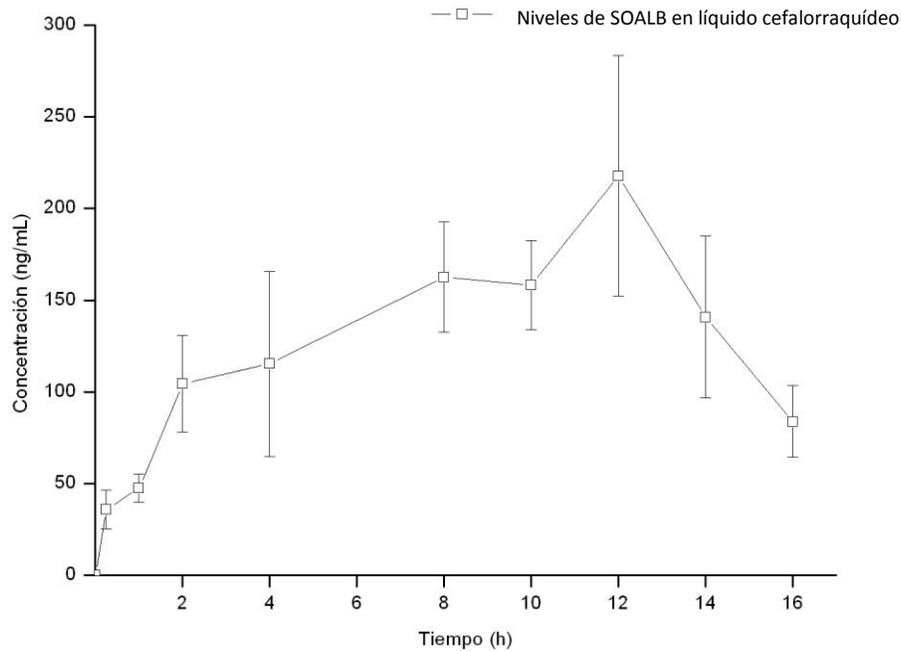


Figura 25. Perfil de concentración vs tiempo de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de 15 mg/Kg de albendazol en LCR. Cada punto representa el promedio de $n=5 \pm EE$.

Los parámetros farmacocinéticos de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo se presentan en la tabla 33. La velocidad de absorción t_{max} , en líquido cefalorraquídeo fue de 9.6 h, valor que no presenta diferencias estadísticamente significativas con respecto al plasma el cual fue de 7.2 h. El tiempo medio de residencia en LCR fue de 9.31 h, este valor es semejante al encontrado en plasma (8.22 h). En cuanto al tiempo de vida media, se encontró un valor de 4.29 h el cual es semejante al encontrado en plasma.

En cuanto a la cantidad absorbida expresada en función del área bajo la curva, se obtuvo un porcentaje de fármaco con respecto al plasma de 13.39% (2153.03 ng*h/mL en LCR vs 16076.64 ng*h/mL en plasma). Este estudio es el primero en documentar la farmacocinética de albendazol en

LCR a dosis única a la dosis administrada en la terapia convencional (15 mg/kg) y además relaciona los valores en LCR y plasma para el metabolito en un modelo murino resultados que se mencionarán más adelante.

Tabla 33. Parámetros farmacocinéticos de sulfóxido de albendazol en LCR después de la administración de albendazol a una dosis de 15 mg /Kg. (n=5)

Perfil	t _{max} (h)	C _{max} (ng/mL)	AUC _(0→t) (ng*h/mL)	t _{1/2} (h)	TMR _(0→t) (h)
SOALB (15 mg/Kg)					
1	12	269.79	2679.90	3.79	9.61
2	12	450.53	3047.68	2.13	9.83
3	10	146.73	1476.98	8.21	9.50
4	10	157.93	1410.24	2.13	8.17
5	4	210.45	2154.85	5.21	9.45
Promedio	9.60	247.09	2153.93	4.29	9.31
+ EE	1.47	55.34	353.58	1.13	0.29

6.3.3. Combinación de albendazol y nitazoxanida

A nivel farmacocinético el problema fundamental del albendazol se atribuye a la baja solubilidad en agua, lo cual limita la biodisponibilidad del principio activo. (Redondo y cols., 1998 y Mares y cols., 2005) Ello da lugar a una gran variabilidad interindividual en la absorción y por ende en la eficacia terapéutica. (Castro y cols., 2009)

Es por lo anterior que se han diseñado diversos estudios enfocados a mejorar la biodisponibilidad del fármaco; algunos de ellos orientados a la formulación con ciclodextrinas (Palomares-Alonso y cols., 2009) o la administración conjunta con alimentos (Mares y cols., 2005; Awadzi y cols., 1994, Lange y cols., 1988) por mencionar algunos. En los últimos años se ha propuesto la combinación de fármacos antihelmínticos como un estrategia alternativa para el tratamiento de enfermedades parasitarias (Entrocasso y cols., 2008), particularmente por la resistencia de los parásitos contra algunos agentes antihelmínticos o por otro lado asociando fármacos que presenten distinto mecanismo de acción lo cual puede incrementar la eficacia.

En el caso del mecanismo de acción de la nitazoxanida y del albendazol, se sabe que estos actúan por diferentes vías el primero, actúa sobre la piruvato ferredoxin óxido reductasa enzima

dependiente de la transferencia de electrones siendo un inhibidor no competitivo de esta enzima el segundo, provoca cambios degenerativos en la células tegumentarias ya que tiene afinidad por la tubulina. Farmacodinámicamente la combinación ha demostrado tener un efecto aditivo que llega a eliminar más del 98% de cisticercos en modelos de *T. craciseps in vitro* (Palomares-Alonso y cols., 2004). Restando la evaluación farmacocinética de la combinación principal, objetivo de esta investigación. Los resultados se muestran a continuación.

6.3.3.1. Niveles de sulfóxido de albendazol en plasma después de la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida

En esta sección se describen los resultados obtenidos para el sulfóxido de albendazol después de la administración conjunta con nitazoxanida a dosis de 15 mg/Kg y 7.14 mg/Kg respectivamente. La tabla 34 muestra los valores promedio de concentración plasmática de sulfóxido de albendazol y la figura 26 muestra el perfil de concentración en plasma con respecto al tiempo después de administrar la combinación.

Tabla 34. Valores promedio de la concentración plasmática de sulfóxido de albendazol después de la administración de 15 mg/Kg de albendazol conjuntamente con 7.14 mg/Kg de nitazoxanida. Cada valor representa el promedio \pm EE.

Tiempo	Concentración plasmática (ng/mL)
0	0
0.25	94.61 \pm 31.8
1	368.63 \pm 56.1
2	1348.88 \pm 358.7
4	1170.34 \pm 168.6
8	2017.67 \pm 318.3
10	1618.35 \pm 348.4
12	1228.40 \pm 238.5
14	678.73 \pm 325.9
16	474.88 \pm 133.7

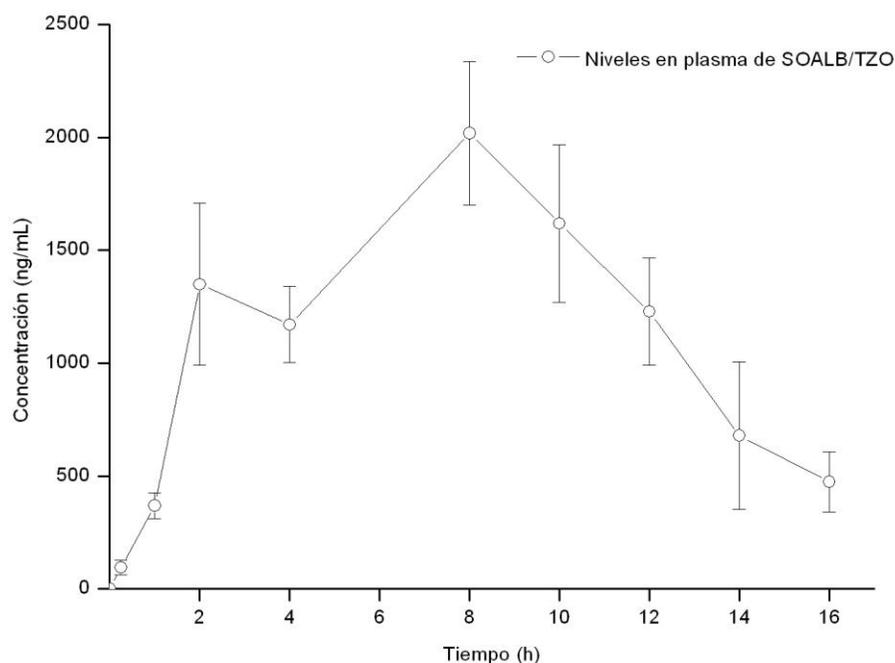


Figura 26. Perfil de concentración vs tiempo de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de 15 mg/Kg de albendazol y 7.14 mg/Kg de nitazoxanida en plasma. Cada punto representa el promedio de $n=5 \pm EE$.

En la tabla 35 se presentan los parámetros farmacocinéticos obtenidos. En ella se puede observar la alta variabilidad, la razón de esto al igual que en el caso de la administración del albendazol, podría deberse a las diferencias en absorción. Los valores de C_{max} y del área bajo la curva fueron de 2.23 $\mu\text{g/mL}$ y 19.48 $\mu\text{g}\cdot\text{h/mL}$ y el tiempo medio de residencia fue de 9.20 h.

Tabla 35. Parámetros farmacocinéticos de sulfóxido de albendazol en plasma después de la administración de 15 mg/Kg de albendazol conjuntamente con 7.14 mg/Kg de nitazoxanida. (n=5)

Perfil	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC _(0→t) (ng*h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	TMR _(0→t) (h)
SOALB-TZO (15mg/Kg – 7.5 mg/Kg)					
1	8	2025.38	15281.89	2.52	8.68
2	8	1563.82	15469.61	2.53	8.00
3	2	1988.33	20051.30	3.72	9.81
4	2	2381.20	18748.32	4.43	8.38
5	8	3226.15	27864.06	3.83	11.14
Media	5.60	2236.98	19483.04	3.41	9.20
+ EE	1.47	279.19	2289.77	0.38	0.57

6.3.3.2. Niveles de sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo después de la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida

Los niveles promedio obtenidos en líquido cefalorraquídeo después de la administración conjunta de albendazol a una dosis de 15 mg/Kg con 7.14 mg/Kg con nitazoxanida se muestran en la tabla 36.

Tabla 36. Valores promedio de la concentración de sulfóxido de albendazol en LCR de después de la administración conjunta de 15 mg/Kg de albendazol y 7.14 mg/Kg de nitazoxanida Cada punto representa el promedio de $n=5 \pm EE$.

Tiempo	Concentración plasmática (ng/mL)
0	0
0.25	28.53 ± 5.0
1	136.74 ± 39.3
2	166.78 ± 39.0
4	414.07 ± 163.0
8	390.88 ± 22.8
10	371.09 ± 86.4
12	344.40 ± 68.2
14	118.80 ± 39.1
16	108.87 ± 24.1

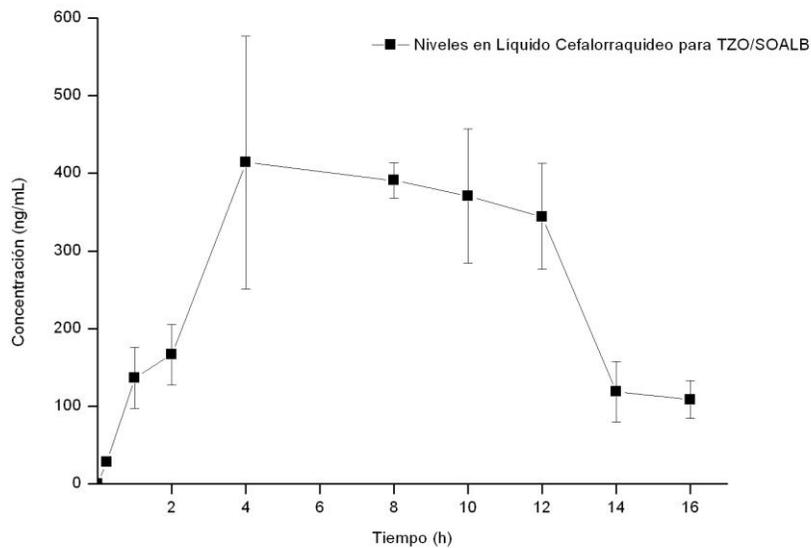


Figura 27. Perfil de concentración vs tiempo de sulfóxido de albendazol después de la administración de una dosis de 15 mg/Kg de albendazol y 7.14 mg/Kg de nitazoxanida en LCR. Cada punto representa el promedio de $n=5 \pm EE$.

El perfil de concentración en líquido cefalorraquídeo en función del tiempo se muestra en la figura 27, mientras que los parámetros farmacocinéticos en líquido cefalorraquídeo se presentan en la tabla 37.

Tabla 37. Parámetros farmacocinéticos en LCR de sulfóxido de albendazol después de la administración de 15 mg/Kg de albendazol y 7.14 mg/Kg de nitazoxanida. (n=5)

Perfil	t_{max} (h)	C_{max} (ng/mL)	AUC _(0→t) (ng*h/mL)	$t_{1/2}$ (h)	TMR _(0→t) (h)
SOALB-TZO (15mg/Kg – 7.5 mg/Kg)					
1	4	532.56	4787.69	2.03	7.37
2	8	356.03	3107.31	1.87	7.88
3	10	578.88	4336.31	2.09	8.98
4	4	995.29	5880.19	3.37	6.18
5	12	529.07	4770.32	2.67	9.12
Promedio	7.6	598.37	4576.36	2.40	7.90
+ EE	1.6	106.25	447.10	0.27	0.54

Como se puede observar en la tabla anterior el t_{max} , presentó un valor de 7.6 h el cual al ser comparado contra el valor obtenido en plasma (5.6 h) no presentó una diferencia estadísticamente significativa. En cuanto al C_{max} el 26.7% del valor encontrado en LCR corresponde al valor en plasma (2236.98 ng/mL en plasma; 598.37 ng/mL en LCR). De igual manera, al obtener el porcentaje correspondiente al área bajo la curva se encontró que el 23.48% de la cantidad de fármaco encontrado en LCR se relaciona con la cantidad existente en plasma cantidad en plasma. (19483.04 ng*h/mL en plasma vs 4576.36 ng*h/mL en LCR). El tiempo medio de residencia fue de 7.90 h en LCR valor que no fue significativamente diferente al encontrado en plasma que fue de 9.2 h.

6.3.4. Comparación de perfiles farmacocinéticos de la administración de albendazol vs la combinación albendazol-nitazoxanida

Con el fin de comparar los resultados de ambas administraciones, se elaboró la figura 28. Los parámetros farmacocinéticos promedio, para los tratamientos en el modelo murino utilizado, se presentan en la tabla 38.

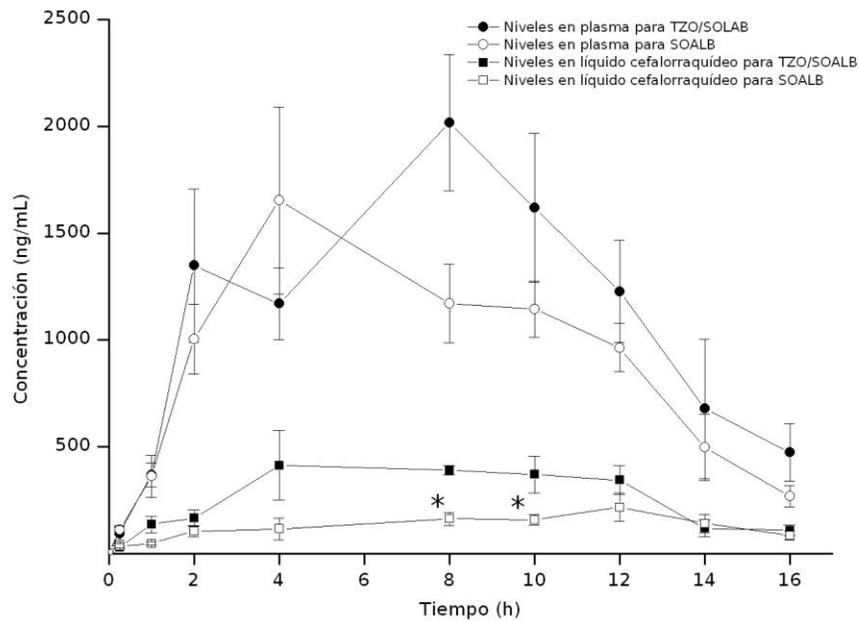


Figura 28. Perfil de tiempo contra concentración en plasma y LCR de sulfóxido de albendazol después de la administración de 15 mg/Kg de albendazol y 7.14 mg/Kg de nitazoxanida. Cada punto representa el promedio de $n=5 \pm EE$. * $p < 0.05$ contra la administración de albendazol.

Tabla 38. Parámetros farmacocinéticos de sulfóxido de albendazol después de la administración de 15 mg/Kg de albendazol solo y en combinación con 7.14 mg/Kg de nitazoxanida. ($n=5$)

PARÁMETRO	Tratamiento	Valor promedio en PLASMA	Valor promedio en LCR
$AUC_{(0 \rightarrow t)}$ (ng*h/mL)	ABZ	16076.64 ± 955.91	2153.93 ± 353.58
	ABZ + NTZ	19483.04 ± 2289.77	$4576.36 \pm 447.10^*$
C_{max} (ng/mL)	ABZ	1979.34 ± 293.45	247.09 ± 353.58
	ABZ + NTZ	2236 ± 279.19	$598.37 \pm 106.25^*$
t_{max} (h)	ABZ	7.20 ± 1.50	9.60 ± 1.47
	ABZ + NTZ	5.60 ± 1.47	7.60 ± 1.60
$TMR_{(0 \rightarrow t)}$ (h)	ABZ	8.22 ± 0.65	9.31 ± 0.29
	ABZ + NTZ	9.20 ± 0.57	7.90 ± 0.54

(* $p < 0.05$ con respecto al grupo de albendazol)

Al evaluar el comportamiento de la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida en plasma, se encontró que los parámetros farmacocinéticos no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a la administración de albendazol. Los resultados obtenidos difieren de los reportados por Stettler y colaboradores en el 2004, en donde se indica que después de la administración conjunta de los fármacos en estudio los niveles de sulfóxido de albendazol se ven aumentados hasta 5 veces debido a una posible interacción a nivel de absorción.

Las diferencias encontradas pueden estar asociadas a factores como la forma farmacéutica o la proporción en la cual los fármacos fueron administrados, ya que en el presente trabajo se utilizó una forma farmacéutica comercial y una proporción albendazol nitazoxanida de 2:1 mientras que en el descrito en la literatura se utilizó un vehículo (carboximetilcelulosa) para la formulación y la proporción administrada de albendazol-nitazoxanida fue 1:3.

Al analizar el comportamiento del sulfóxido de albendazol en líquido cefalorraquídeo, se encontró un incremento de los niveles a las 8 y 10 h ($p < 0.05$) después de administrar la combinación. De igual forma se encontró que los valores de C_{max} y AUC fueron significativamente mayores ($p < 0.05$) para la combinación albendazol-nitazoxanida mientras que el tiempo para alcanzar la concentración máxima fue el mismo. El incremento de C_{max} y AUC fue de 2.42 veces y 2.11 veces respectivamente (tabla 38).

Con la información que se cuenta al momento, no es posible explicar el mecanismo que dio lugar a la elevación de niveles solamente en líquido cefalorraquídeo. Algunas hipótesis son las siguientes:

- a) No existe una relación directa entre los niveles de sulfóxido de albendazol en plasma y su distribución en cerebro, como es el caso también del verapamilo con la quinidina, o el metrotexato con amitriptilina por mencionar algunos. (Eyal y cols., 2009)
- b) La nitazoxanida interacciona con el receptor inhibiendo la salida del sulfóxido de albendazol del líquido cefalorraquídeo.

Con respecto al último inciso, hoy en día no existe información acerca que tipo de receptores están involucrados con tizoxanida a nivel de barrera hematoencefálica, sin embargo, en el caso del sulfóxido de albendazol se ha sugerido que la inhibición del receptor BCRP (Brest cáncer resistant protein) podría modificar los niveles del fármaco en el cerebro alterando su comportamiento.

Ejemplos de este comportamiento se han observado para el cassette ABC de la p-glicoproteína o los receptores de BCRP generando un aumento en los niveles de fármaco en líquido cefalorraquídeo de entre 4 y hasta 123 veces para el verapamilo con la ciclosporina o de nelfenavir con el zosuquidar (Eyal y cols 2009).

Con base en los resultados encontrados, se pone de manifiesto que, a pesar de que no es posible explicar el mecanismo que dio causa a la elevación de los niveles, el uso de la combinación albendazol-nitazoxanida podría ser benéfico para su uso en la terapia para la neurocisticercosis en aquellos sujetos que presenten niveles muy bajos o resistencia a la terapia con albendazol. Asimismo, los resultados del presente trabajo confirman la importancia de continuar con la búsqueda de información del comportamiento de fármacos en órganos como en el cerebro.

7. Conclusiones

1. Los métodos desarrollados para cuantificar sulfóxido de albendazol y tizoxanida en plasma fueron lineales, exactos, precisos y selectivos, bajo los parámetros requeridos por la normatividad mexicana.
2. Los modelos desarrollados para la toma de muestra de líquido cefalorraquídeo y sangre, son confiables y no alteran la fisiología del animal.
3. La tizoxanida, metabolito activo de la nitazoxanida, cruza la barrera hematoencefálica. La relación con respecto a los niveles en plasma fue del 31% a la media hora después de su administración.
4. Los niveles plasmáticos de sulfóxido de albendazol no mostraron diferencias significativas comparados con la administración conjunta en plasma sin embargo en el caso del líquido cefalorraquídeo tanto la C_{max} como el área bajo la curva fueron 2.1 y 2.4 veces mayores.
5. Los resultados obtenidos hacen pensar que el aumento de los niveles del sulfóxido de albendazol en la combinación podría contribuir a la eficacia del fármaco.

8. Perspectivas

Los resultados del presente estudio demuestran la necesidad de estudiar a fondo la combinación de albendazol y nitazoxanida a dosis más altas que las probadas para poder demostrar si es que existe una interacción a nivel de los transportadores de la barrera hemetoencefálica.

Con estos estudios se permitirá documentar si esta alternativa puede llegar a ser segura y eficaz en el tratamiento de la neurocisticercosis humana ya que hasta el momento solo se pudo demostrar un aumento en los niveles y se sugiere que éste es provocado por algún transportador de membrana que se ve afectado durante la administración conjunta.

9. Bibliografía

1. Abbott NJ, Dolman DE, Patabendige AK (2008) Assays to predict drug permeation across the blood-brain barrier, and distribution to brain. *Curr Drug Metab.* 9(9):901-10. Review.
2. Agarwal S, Solomon WD, Gowda KV, Selvan PS, Ghosh D, Sarkar AK, Chattaraj TK, Pal TK (2007) Bioequivalence study of a fixed dose combination of nitazoxanide and ofloxacin in Indian healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* 57:679-683.
3. Alarcón F (2006) Neurocysticercosis: its aetiopathogenesis, clinical manifestations, diagnosis and treatment. *Rev Neurol* 43 Suppl 1:S93-100.
4. Alarcón F, Maldonado JC (2006) Short course of albendazole therapy for neurocysticercosis. *Clin Neurol Neurosurg* 108(8):810-1.
5. Anderson VR, Curran MP (2007) Nitazoxanide: a review of its use in the treatment of gastrointestinal infections. *Drugs* 67(13):1947-67. Review.
6. Asteinza J, Camacho-Carranza R, Reyes-Reyes RE, Dorado-González V, Espinoza Aguirre JJ (2000) Induction of cyochrome P450 enzymes by albendazole treatment in the rat. *Enviro Tox Pharmacol* 9:31-37.
7. Atef M, Ramadan A, Darwish AS, Fahim AM (2009) Effect of albendazole administration on pharmacokinetic aspects of tylosin in lactating goats. *Drug Metab Lett.* 23(3):137-43
8. Berry LM, Wollenberg L, Zhao Z (2009) Esterase activities in the blood, liver and intestine of several preclinical species and humans. *Drug Metab Lett* 3(2):70-7.
9. Broekhuysen J, Stockis A, Lins RL (2000) Nitazoxanide pharmacokinetics and metabolism in man. *Int J Clin Pharmacol Ther* 38 (8): 387-94.
10. Castro N, Márquez C, Brundage RC, González-Esquivel D, Suárez AM, Góngora F, Jara A, Urizar J, Lanao JM, Jung H (2009) Population pharmacokinetics of albendazole in patients with neurocysticercosis. *Int J Clin Pharmacol Ther* 47(11):679-85.
11. Casulli A, Morales MA, Gallinella B, Turchetto L, Pozio E (2006) 2-Hydroxypropyl-beta-cyclodextrin improves the effectiveness of albendazole against encapsulated larvae of *Trichinella spiralis* in a murine model. *J Antimicrob Chemother* 58(4):886-90.
12. Code of Federal Regulations Title 21, US Food and drug administration. EUA. Julio 2010. <http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/cfrsearch.cfm>
13. Consiglio AR, Lucion AB.(2000) Technique for collecting cerebrospinal fluid in the cisterna magna of non-anesthetized rats. *Brain Res Brain Res Protoc* 5 (1):109-14.
14. Dayan A.D (2003) Albendazole, mebendazole and praziquantel. Review of non clinical toxicity and pharmacokinetics *Acta Tropica* 86:141-159.
15. de Silva N, Guyatt H, Bundy D.(1997) Anthelmintics. A comparative review of their clinical pharmacology. *Drugs.* 53(5):769-88. Review.
16. Del Brutto OH (2005) Neurocysticercosis: up-dating in diagnosis and treatment. *Neurologia* 20(8):412-8.
17. Del Brutto OH, Roos KL, Coffey CS, García HH (2006) Meta-analysis: Cysticidal drugs for neurocysticercosis: albendazole and praziquantel. *Ann Intern Med* 145(1):43-51.
18. Del Estal JL, Alvarez AI, Villaverde C, Coronel P, Fabra S, Prieto JG (1991) Effect of surfactants on albendazole absorption. *J Pharm Biomed Anal* 9(10-12):1161-4.
19. Entrocasso C, Alvarez L, Manazza J, Lifschitz A, Borda B, Virkel G, Mottier L, Lanusse C.(2008) Clinical efficacy assessment of the albendazole-ivermectin combination in lambs

- parasitized with resistant nematodes. *Vet Parasitol* 17:155(3-4):249-56.
20. Eyal S, Hsiao P, Unadkat JD. (2009) Drug interactions at the blood-brain barrier: fact or fantasy? *Pharmacol Ther* 123(1):80-104.
 21. FDA Guidance for Industry, Bionalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER) (2001), <http://www.fda.gov/cder/quid-ance7index.htm>.
 22. Flisser A, Sarti E, Lightowers M, Schantz P (2003) Neurocysticercosis: regional status, epidemiology, impact and control measures in the Americas. *Acta Trop* 87(1):43-51. Review.
 23. Fox LM, Saravolatz LD (2005) Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin Infect Dis* 15:1173-1180.
 24. García HH, Del Brutto OH (2003) Imaging findings in neurocysticercosis. *Acta Trop* 87(1):71-8.
 25. García HH, Gonzalez AE, Evans CA, Gilman RH; Cysticercosis Working Group in Peru (2003) *Taenia solium* cysticercosis. *Lancet* 362(9383):547-56.
 26. Garcia HH, Gonzalez AE, Gilman RH, Bernal T, Rodriguez S, Pretell EJ, Azcurra O, Parkhouse RM, Tsang VC, Harrison LJ Cysticercosis Working Group in Peru (2002) Circulating parasite antigen in patients with hydrocephalus secondary to neurocysticercosis. *Am J Trop Med Hyg* 66(4):427-30.
 27. Garcia HH, Pretell J, Gilman RH Cysticercosis Working Group in Peru (2002) Neurocysticercosis and the global world. *J Neurol* 249(8):1107-8.
 28. Hartmann C, Smeyers-Verbeke J, Masart DL, McDowall RD (1998) Validation of bioanalytical chromatographic methods. *J Pharm and Biomed Anal* 17:193-218.
 29. Hitchcock SA (2008) Blood-brain barrier permeability considerations for CNS-targeted compound library design. *Curr Opin Chem Biol* 12(3):318-23. Review.
 30. Hotez PJ, Brindley PJ, Bethony JM, King CH, Pearce EJ, Jacobson J (2003) Helminth infections: the great neglected tropical diseases. *J Clin Invest* 118(4):1311-21.
 31. Hu Y, Platzer EG, Bellier A, Aroian RV (2010) Discovery of a highly synergistic anthelmintic combination that shows mutual hypersusceptibility. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107(13):5955-60.
 32. Hurtado M, Medina MT, Sotelo J, Jung H (1998) Sensitive high performance liquid chromatographic assay for albendazole and its main metabolite albendazole sulphoxide in plasma and cerebrospinal fluid *J Chromatograph (Biomed Appl)* 449:403-407.
 33. Jiménez M, Velásquez L (2004) Morbidity at the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía Manuel Velasco Suárez, 1995-2001. *Gac Med Mex* 140(2):155-62.
 34. Jung H, Cárdenas G, Sciutto E, Fleury A (2008) Medical treatment for neurocysticercosis: drugs, indications and perspectives. *Curr Top Med Chem* 8(5):424-33.
 35. Jung H, Cárdenas G, Sciutto E, Fleury A (2008) Medical treatment for neurocysticercosis: drugs, indications and perspectives. *Curr Top Med Chem* 8(5):424-33
 36. Jung H, Hurtado M, Sánchez M, Medina MT, Sotelo J (1992) Clinical pharmacokinetics of albendazole in patients with brain cysticercosis. *J Clin Pharmacol* 32: 28-31.
 37. Jung H, Medina L, García L, Fuentes I, Moreno-Esparza R (1998) Absorption studies of albendazole and some physicochemical properties of drug and its metabolite albendazole sulphoxide. *J Pharm Pharmacol* 50:43-48.

38. Kalaiselvan R, Mohanta GP, Madhusudan S, Manna PK, Manavalan R (2007) Enhancement of bioavailability and anthelmintic efficacy of albendazole by solid dispersion and cyclodextrin complexation techniques. *Pharmazie* 62(8):604-7.
39. Lopez-Gomez M, Ramirez-Bermudez J, Higuera J, Sosa AL, Lopez-Meza E, Corona T. (2005) Is dementia reversible in patients with neurocysticercosis? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 76(8):1164-6.
40. Mares Samano, Sergio (2004) Influencia de una dieta con alto contenido en grasas en la biodisponibilidad del albendazol. Tesis (Maestría en Ciencias) México D.F. Universidad Nacional Autónoma de México. Facultad de Química pp 7-18.
41. Mares SS, Jung CH, López AT, González-Esquivel DF. (2005) Influence of a Mexican diet on the bioavailability of albendazole. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 97(2):122-4
42. Márquez C, Góngora F, Santos Zambrano J, Hernández R, Soto JL (2004) Pre-treatment with corticosteroids and a single cycle of high dose albendazole for subarachnoidal cysticercosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 75(6):938-9.
43. Marriner SE, Morris DL, Dickson B, Bogan JA (1986) Pharmacokinetics of albendazole in man. *Eur J Clin Pharmacol* 34:315-317.
44. Martignoni M, Groothuis GM, de Kanter R (2006) Species differences between mouse, rat, dog, monkey and human CYP-mediated drug metabolism, inhibition and induction. *Expert Opin Drug Metab Toxicol* 2(6):875-94.
45. Morales J, Martínez JJ, Garcia-Castella J, Peña N, Maza V, Villalobos N, Aluja AS, Fleury A, Fragoso G, Larralde C, Sciutto E (2006) *Taenia solium*: the complex interactions, of biological, social, geographical and commercial factors, involved in the transmission dynamics of pig cysticercosis in highly endemic areas. *Ann Trop Med Parasitol* 100(2):123-35.
46. Murphy JR, Friedmann JC (1985) Pre-clinical toxicology of nitazoxanide a new antiparasitic compound. *J Appl Toxicol* 5(2):49-52.
47. Nagy J, Schipper HG, Koopmans RP, Butter JJ, Van Boxtel CJ, Kager PA (2002) Effect of grapefruit juice or cimetidine coadministration on albendazole bioavailability. *Am J Med Hyg* 34:315-317.
48. Namur S, Cariño L, González de la Parra N (2007) Development and validation of high-performance thin layer chromatographic method, with densitometry, for quantitative analysis of tizoxanide (a metabolite of nitazoxanide) in human plasma. *J Planar Chromatogr* 20:331-334.
49. Nehal K, Whitehouse M (2004) Molecular Properties of WHO Essential Drugs and Provisional Biopharmaceutical Classification. *Mol Pharm* 1(1) 85-96.
50. Norma Oficial Mexicana NOM.177-SSAI-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas. Diario Oficial de la federación, 7 de mayo 1999.
51. Ortiz-Trejo JM, Correa-Chacón AJ, Sctelo-Ham EI, Torres-Valenzuela A, Alvarado-Esquivel C (2006) Risk factors associated with neurocysticercosis in a public hospital in Mexico. *Gac Med Mex* 142(3):175-9.

52. Palomares-Alonso F, González CR, Bernad-Bernad MJ, Montiel MD, Hernández GP, González-Hernández I, Castro-Torres N, Estrada EP, Jung-Cook H (2010) Two novel ternary albendazole-cyclodextrin-polymer systems: dissolution, bioavailability and efficacy against *Taenia crassiceps* cysts. *Acta Trop* 2010;113(1):56-60.
53. Palomares-Alonso F, Piliado JC, Palencia G, Ortiz-Plata A, Jung-Cook H (2007) Efficacy of nitazoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cysts. *J Antimicrob Chemother* 59:212-218.
54. Pardridge M (2002) Targeting neurotherapeutic agents through the blood-brain barrier. *Arch Neurol* 59(1):35-40.
55. Ploeger BA, Van Der Graaf PH, Danhof M (2009) Incorporating receptor theory in mechanism-based pharmacokinetic-pharmacodynamic (PK-PD) modeling. *Drug Metab Pharmacokinet* 24(1):3-15. Review
56. Polson C, Sarkar P, Incledon B, Raguvaran V, Grant R (2003) Optimization of protein precipitation based upon effectiveness of protein removal and ionization effect in liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 785(2):263-75.
57. Redondo PA, Alvarez AI, García JL, Villaverde C, Prieto JG (1998) Influence of surfactants on oral bioavailability of albendazole based on the formation of the sulphoxide metabolites in rats. *Biopharm Drug Dispos* 19(1):65-70.
58. Riley T, White AC Jr (2003) Management of neurocysticercosis. *CNS Drugs* 17(8):577-91.
59. Romark Pharmaceuticals. Alinia. (Nitazoxanide) tablets. (Nitazoxanide) for oral suspension. EUA. Julio 2008 < <http://www.romark.com> >
60. Rossignol JF, El-Gohary YM (2006) Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Therp* 15:1423-1430.
61. Sciutto E, Fragoso G, Fleury A, Lacleste JP, Sotelo J, Aluja A, Vargas L, Larralde C (2000) *Taenia solium* disease in humans and pigs: an ancient parasitosis disease rooted in developing countries and emerging as a major health problem of global dimensions. *Microbes Infect* 2(15):1875-90.
62. Shilpa SM, Hatfield S, Jenssen L, Voguel D (1998) Albendazole versus praziquantel for neurocysticercosis. *Am J Health-Syst Pharm* 45:532-534.
63. Singhi P, Dayal D, Khandelwal N (2003) One week versus four weeks of albendazole therapy for neurocysticercosis in children: a randomized, placebo-controlled double blind trial. *Pediatr Infect Dis J* 22(3):268-72.
64. Sisson G, Goodwin A, Raudonikiene A, Hughes NJ, Mukhopadhyay AK, Berg DE, Hoffman PS (2002) Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 46:2116-2123.
65. Sistema único de información para la vigilancia epidemiológica. Secretaría de Salud Pública. México. Julio del 2010 < www.sinave.gob.mx >
66. SMerino G, Jonker JW, Wagenaar E, Pulido MM, Molina AJ, Alvarez AI, Schinkel AH. (2005) Transport of anthelmintic benzimidazole drugs by breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2). *Drug Metab Dispos*. 33(5):614-8.

67. Sotelo J, Diaz-Olavarrieta C (2010) Neurocysticercosis: changes after 25 years of medical therapy. Arch Med Res. 2010 Jan;41(1):62-3
68. Sotelo J, Escobedo F, Penagos P (1998) Albendazole vs praziquantel for therapy for neurocysticercosis. Arch Neurol 45:532-534.
69. Sotelo J, Jung H. (1998) Pharmacokinetic optimization of the treatment of neurocysticercosis. Clin Pharmacokinet 34(6):503-515.
70. Sotockis A, Deroubaix X, Lins R, Jeanbaptiste B, Calderon P, Rossignol JF (1996) Pharmacokinetics of nitazoxanida after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. Int J Clin Pharmacol Therp 34:349-351.
71. Souhaili H, Fargetton H, Delatour P, Batt AM (1987) Sulphoxidation of albendazole by FAD-containing and cytochrome P-450 dependent mono-oxygenases from pig liver microsomes. Xenobiotica 17:1159-1168.
72. Souhaili H, Mothe O, Totis M, Masson C, Batt AM (1988) Albendazole sulphonation by rat liver cytochrome P-450. J Phaemacol Exp Therap 246:758-764.
73. Stettler M, Rossignol JF, Fink R, Walker M, Gottstein B, Merli M, Theurillat R, Thormann W, Dricot E, Segers R, Hemphill A (2004) Secondary and primary murine alveolar echinococcosis: combined albendazole/nitazoxanide chemotherapy exhibits profound anti-parasitic activity. Int J Parasitol 34(5):615-24.
74. Stockins A, De Bruyn S, Gengler C, Rossignol JF (2002) Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g d.i.d Int J Clin Pharmacol Ther 40:221-227.
75. Takayanagui OM, Bonato PS, Dreossi SA, Lanchote VL (2002) Enantioselective distribution of albendazole metabolites in cerebrospinal fluid of patients with neurocysticercosis. Br J Clin Pharmacol 54(2):125-30.
76. Thrivikraman KV, Huot RL, Plotsky PM.(2002) Jugular vein catheterization for repeated blood sampling in the unrestrained conscious rat. Brain Res Brain Res Protoc. 10(2):84-94.
77. Van de Waterbeemd H, Smith DA, Jones BC (2001) Lipophilicity in PK design: methyl, ethyl, futile. J Comput Aided Mol Des 15(3):273-86.
78. Vanessa AR, Curran MP. Nitazoxanide: a review of its use in the treatment of gastrointestinal infections. Drugs 2007 67(13):1947-67.
79. Vega R, Piñero D, Ramanankandrasana B, Dumas M, Bouteille B, Fleury A, Sciutto E, Larralde C, Fragoso G (2003) Population genetic structure of *Taenia solium* from Madagascar and Mexico: implications for clinical profile diversity and immunological technology. Int J Parasitol 33(13):1479-85.
80. Wang X, Ratnaraj N, Patsalos PN.(2004) The pharmacokinetic inter-relationship of tiagabine in blood, cerebrospinal fluid and brain extracellular fluid (frontal cortex and hippocampus). Seizure 13(8):574-81.
81. Wechsler J (2005) Drug safety and access top policy concerns for 2005: safety issues and shortages may slow down new drug development and FDA reforms. (Washington Report) Pharmaceutical Technology. Julio 2010. <<http://business.highbeam.com/138152/article-1G1-127712778/drug-safety-and-access-top-policy-concerns-2005-safety>>
82. Yamagishi Y, Hattori M, Yoshida T, Takahashi K.(2004) Improvement of the functional properties of sucrose stearate by phosphorylation.J Agric Food Chem 2004 52(26):8039-45.
83. White C (2004) Nitazoxanide: a new broad spectrum antiparasitic agent. Expert Rev Anti

- Infect Ther 2(1):43-9.
84. Yu XQ, Xue CC, Wang G, Zhou SF.(2008) Multidrug resistance associated proteins as determining factors of pharmacokinetics and pharmacodynamics of drugs. *Curr Drug Metab* 8(8):787-802.

10. Anexos

1. Resúmenes de congresos

1) XXIII Reunión anual de investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Fecha: Mayo, 2008. México D.F.

Título del trabajo: Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación sulfóxido de albendazol en plasma por líquidos masas/masas.

Autores: Ruiz-Olmedo M.I., González I.E., Gallegos J-L., Jung H.

Introducción: El albendazol (ABZ) es un fármaco antihelmíntico de amplio espectro, el cual se metaboliza a sulfóxido de albendazol (SOALB) que es el metabolito activo. Dada la gran variabilidad interindividual en los niveles del SOALB en pacientes, es necesario desarrollar métodos analíticos más sensibles, eficiente y rápidos que permitan monitorear los niveles de este fármaco.

Objetivo: desarrollar y validar un método analítico por LC MS-MS para la cuantificación de SOALB en plasma.

Material y métodos: el método requiere de 200µL de plasma y una extracción líquido-líquido empleando una mezcla de éter:diclorometano:cloroformo (60:30:10). La cromatografía se llevó a cabo en una columna Yemini C18 (150 mm x 4.6 mm x 5 mm). La fase móvil fue metanol:H₂O (ácido fórmico (20 mM) en una proporción 70:30 con split 1:3 y flujo de 0.7 mL/min. El detector de masas utilizada fue una trampa iónica marca Thermofinnigan, el cual se opero en modo positivo. Las transiciones fueron 282→240 m/z para SOALB y 296→264 m/z para el mebendazol (estandar interno). Se evaluaron los parámetros de recobro, linealidad, contaminación cruzada, selectividad, supresión iónica (SI), exactitud y precisión.

Resultados: el método fue lineal en el rango de concentración de 0.02 a 4 µg/mL. Los tiempos de retención para el albendazol y el estándar interno (mebendazol) fueron 2.1 y 3.1 minutos respectivamente. El método demostró ser selectivo y no presentó contaminación cruzada ni supresión iónica. El promedio de recobro fue mayor al 83% para los tres puntos control (40,400 y 200 ng/mL). La precisión y exactitud del método fue evaluado tanto con el coeficiente de variación cuyo valor no fue mayor al 6% como con la desviación estándar, con valores menores al 9% para cada punto control.

Conclusión: el método desarrollado es rápido, preciso y confiable por lo que puede ser utilizado para cuantificar muestras plasmáticas de SOALB provenientes de estudios farmacocinéticos y monitoreo terapéutico.

2) XXIV Reunión anual de investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Fecha: Mayo, 2009. México D.F.

Título del trabajo: Desarrollo y validación de un método analítico para la cuantificación de Tizoxanida en plasma por HPLC

Autores: Ruiz-Olmedo M.I., Gallegos J-L., Jung H.

Introducción: La nitazoxanida (NTZ) es un fármaco antihelmíntico de amplio espectro que al ser administrado se metaboliza a tizoxanida (TZO) metabolito que ha demostrado actividad cestocida contra cisticercos de *Taenia crassiceps*. Se cree que los efectos antiparasitarios de este fármaco son debidos a la interferencia con la enzima piruvato ferredoxin oxido reductasa que interfiere con la vía energética del parásito. Estudios empleando el modelo de cisticercosis murina, han demostrado que la administración de este fármaco con albendazol (ABZ) podría llegar a eliminar hasta el 98% de cisticercos. El presente trabajo tiene como enfoque principal desarrollar y validar un método que permita la cuantificación de TZO en plasma para poder desarrollar estudios preclínicos de la conjunción de ABZ y NTZ.

Objetivo: Desarrollar y validar un método analítico por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de TZO en plasma.

Material y Métodos: para el desarrollo y la validación de este método se utilizó un equipo marca Waters-Alliance 2690 y detector UV-Vis 2996 de arreglo de diodos. La cromatografía se llevó a cabo utilizando una columna X-Terra C18 (250 mm x 4.6 mm con d.p. 5 μ m), con una fase móvil ternaria de MeOH:ACN:KH₂PO₄ pH 5.7;50mM con un gradiente acuoso-orgánico (90:10 a 10:90) a flujo de 0.4 mL/min la detección fue a una longitud de onda de 416 nm. El estándar interno utilizado fue la nifuroxazida, que presentó un tiempo de retención de 18 min, en el caso de TZO fue de 23 min. Para el tratamiento de la muestra se realizó una precipitación de proteínas con ACN a 200 μ L de fármaco adicionado a plasma y una inyección de 100 μ L de solvente orgánico fue inyectado al sistema cromatográfico. El método analítico fue validado según la NOM-177-SSA-1998 (linealidad, exactitud, precisión, especificidad, recobro y estabilidad a corto y largo plazo) en plasma de rata y se verificó su reproducibilidad en muestras de plasma humano. Además se analizaron muestras de un estudio farmacocinético (FC) a dosis única de 7.5 mg/Kg de NTZ en un modelo rata.

Resultados: el promedio de recobro fue de 103 % para los tres puntos control (70, 400 y 1000 ng/mL). El método fue específico tanto para muestras de plasma de rata como de plasma humano. Es lineal en un rango de concentraciones de 0.01 a 1280 μ g/mL y presenta una r^2 de 0.9997. Demostró ser preciso y exacto con un coeficiente de variación no mayor al 8% y una desviación absoluta no mayor al 7.8 % para cada punto control; el límite de cuantificación del método es de 10 ng/mL y las muestras demostraron ser estables tanto a corto como a largo plazo (45 días). Los parámetros FC del estudio realizado: C_{max} 258 ng/mL y una t_{max} 0.25 h, $AUC_{0 \rightarrow \infty}$ 450.13 ng*mL/h y un tiempo medio de residencia de 2.31 h para un modelo no compartimental.

Conclusiones: el método desarrollado es confiable y puede ser utilizado para cuantificar muestras de TZO en plasma provenientes de estudios FC y de monitoreo terapéutico de humanos y animales.

3) XXV Reunión anual de investigación del Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía

Fecha: Mayo, 2010. México D.F.

Título del trabajo: Farmacocinética y Neurofarmacocinética de la administración conjunta de Albendazol y Nitazoxanida a dosis única.

Autores: Ruiz-Olmedo María-Isabel, Franco-Pérez Javier, González-Hernández Iliana, Ruiz-Ramírez Moisés, Gallegos-Pérez José Luis, Jung-Cook Helgi

Introducción: El albendazol (ABZ) es el fármaco de elección para el tratamiento de neurocisticercosis. En la búsqueda nuevas alternativas se optado por los estudios en combinación con otros fármacos antiparasitarios, ente ellos, la nitazoxanida (NTZ). Estudios *in vitro* e *in vivo* frente a cisticercos de *Taenia crassiceps*, mostraron que existe un efecto aditivo al combinar el ABZ con la NTZ. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la administración conjunta de NTZ y albendazol sobre los niveles de sulfóxido de albendazol (metabolito activo), en plasma y líquido cefalorraquídeo.

Objetivo: Caracterizar la relación farmacocinética y neurofarmacocinética de la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida.

Material y métodos: Se desarrollaron y validaron cuatro métodos analíticos para la cuantificación de SOALB y tizoxanida (TZO) tanto en plasma como en LCR, por cromatografía de líquidos acoplado a masas y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a ultravioleta-visible según la NOM-177-SSA1-1998 cumpliendo con los criterios señalados para linealidad, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad. Para el estudio se emplearon ratas de la cepa Sprague-Dawley, las cuales se aleatorizaron en 3 grupos(n=5). Al primero se le administró vía oral una dosis de 15 mg/Kg de ABZ (Zentel) en suspensión, al segundo 7.15 mg/Kg de NTZ (Paramix) y al tercer grupo la combinación de 15 mg/Kg de ABZ y 7.15 mg/kg de NTZ. Se tomaron muestras de plasma y líquido cefalorraquídeo a los siguientes tiempos □ 0, 15 y 30 min, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16 horas, las cuales se analizaron empleando los métodos analíticos previamente validados. Empleando un modelo no compartimental se calculó: concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima (t_{max}), área bajo la curva ($AUC_{0 \rightarrow t}$), vida media de eliminación ($t_{1/2}$) y el tiempo medio de residencia (TMR).

Resultados y discusión: La TZO metabolito activo de NTZ se absorbió rápidamente, con un t_{max} de 0.25 h, sin embargo su eliminación es rápida ya que su $t_{1/2}$ es de 1.27 horas. La concentración de TZO en líquido cefalorraquídeo fue de 31% de lo encontrado en plasma a las 0.5 h. Para el caso del ABZ el t_{max} fue de 4 h y presentó una $t_{1/2}$ de 2.17 h. En el caso del LCR, se encontró que el t_{max} se alcanzó hasta las 12 h y la $t_{1/2}$ fue muy semejante a la del plasma, con un valor de 2.9 h. Al administrar la combinación, se encontró que a todos los tiempos de muestreo, la relación de niveles entre plasma y el LCR fue 8 % mayor comparado en relación a la obtenida con el ABZ. De igual manera, los valores de C_{max} y AUC de la combinación ABZ-NTZ, fueron 1.2 veces más altos en relación a los obtenidos con ABZ mientras que el t_{max} fue menor. En el caso de LCR los valores de C_{max} y AUC para la combinación en LCR fueron 2.11 veces mayores, aunque el t_{max} para el SOALB fue mayor. El TMR no se vio modificado durante la administración conjunta.

Conclusiones: Los resultados obtenidos hacen pensar que la combinación podría ser beneficiosa ya que el aumento de los niveles del sulfóxido de albendazol puede contribuir a la eficacia del fármaco.

4) XLIII Congreso Nacional de Ciencias Farmacéuticas

Fecha: Octubre 2010, Puerto Vallarta Jalisco.

Título del trabajo: Farmacocinética y Neurofarmacocinética de la administración conjunta de Albendazol y Nitazoxanida a dosis única.

Autores: Ruiz-Olmedo María-Isabel, Franco-Pérez Javier, González-Hernández Iliana, Ruiz-Ramírez Moisés, Gallegos-Pérez José Luis, Jung-Cook Helgi.

Introducción: El albendazol (ABZ) es el fármaco de elección para el tratamiento de neurocisticercosis. En la búsqueda nuevas alternativas se optado por los estudios en combinación con otros fármacos antiparasitarios, ente ellos, la nitazoxanida (NTZ). Estudios *in vitro* e *in vivo* frente a cisticercos de *Taenia crassiceps*, mostraron que existe un efecto aditivo al combinar el ABZ con la NTZ. En el presente trabajo, se evaluó el efecto de la administración conjunta de NTZ y albendazol sobre los niveles de sulfóxido de albendazol (metabolito activo), en plasma y líquido cefalorraquídeo.

Objetivo: Caracterizar la relación farmacocinética y neurofarmacocinética de la administración conjunta de albendazol y nitazoxanida.

Material y métodos: Se desarrollaron y validaron cuatro métodos analíticos para la cuantificación de SOALB y tizoxanida (TZO) tanto en plasma como en LCR, por cromatografía de líquidos acoplado a masas y cromatografía de líquidos de alta resolución acoplado a ultravioleta-visible según la NOM-177-SSA1-1998 cumpliendo con los criterios señalados para linealidad, exactitud, repetibilidad, reproducibilidad y estabilidad. Para el estudio se emplearon ratas de la cepa Sprague-Dawley, las cuales se aleatorizaron en 3 grupos (n=5). Al primero se le administró vía oral una dosis de 15 mg/Kg de ABZ (Zentel) en suspensión, al segundo 7.15 mg/Kg de NTZ (Paramix) y al tercer grupo la combinación de 15 mg/Kg de ABZ y 7.15 mg/kg de NTZ. Se tomaron muestras de plasma y líquido cefalorraquídeo a los siguientes tiempos 0, 15 y 30 min, 1, 2, 4, 8, 10, 12, 14, 16 horas, las cuales se analizaron empleando los métodos analíticos previamente validados. Empleando un modelo no compartimental se calculó: concentración plasmática máxima (C_{max}), tiempo en el que se alcanza la concentración plasmática máxima (t_{max}), área bajo la curva ($AUC_{0 \rightarrow t}$), vida media de eliminación ($t_{1/2}$) y el tiempo medio de residencia (TMR).

Resultados y discusión: La TZO metabolito activo de NTZ se absorbió rápidamente, con un t_{max} de 0.25 h, sin embargo su eliminación es rápida ya que su $t_{1/2}$ es de 1.27 horas. La concentración de TZO en líquido cefalorraquídeo fue de 31% de lo encontrado en plasma a las 0.5 h. Para el caso del ABZ el t_{max} fue de 4 h y presentó una $t_{1/2}$ de 2.17 h. En el caso del LCR, se encontró que el t_{max} se alcanzó hasta las 12 h y la $t_{1/2}$ fue muy semejante a la del plasma, con un valor de 2.9 h.

Al administrar la combinación, se encontró que a todos los tiempos de muestreo, la relación de niveles entre plasma y el LCR fue 8 % mayor comparado en relación a la obtenida con el ABZ.

De igual manera, los valores de C_{max} y AUC de la combinación ABZ-NTZ, fueron 1.2 veces más altos en relación a los obtenidos con ABZ mientras que el t_{max} fue menor. En el caso de LCR los valores de C_{max} y AUC para la combinación en LCR fueron 2.11 veces mayores, aunque el t_{max} para el SOALB fue mayor. El TMR no se vio modificado durante la administración conjunta.

Conclusiones: Los resultados obtenidos hacen pensar que la combinación podría ser beneficiosa ya que el aumento de los niveles del sulfóxido de albendazol puede contribuir a la eficacia del fármaco.

Departamento de Farmacia¹, Facultad de Química, Universidad Nacional Autónoma de México, Unidad de Proteómica Médica², Instituto Nacional de Medicina Genómica, Laboratorio de Neurofisiología³, Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía, Ciudad de México, México

Sensitive high performance liquid chromatographic assay for nitazoxanide metabolite in plasma

M. I. RUIZ-OLMEDO¹, J. L. GALLEGOS-PEREZ², K. G. CALDERON-GONZALEZ², J. FRANCO-PEREZ³, H. JUNG-COOK¹

Received February 2, 2009, accepted February 21, 2009

Helgi Jung Cook, Ph.D. Facultad de Química, Departamento de Farmacia, Universidad Nacional Autónoma de México, 04510 México D.F., helgi@servidor.unam.mx

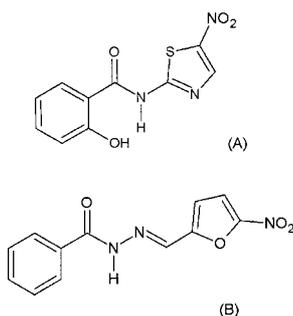
Pharmazie 64: 419–422 (2009)

doi: 10.1691/ph.2009.9041

A sensible and specific HPLC analytical method for the determination of tizoxanide (TZO), the active metabolite of nitazoxanide (NTZ) in rat plasma was developed and validated. Samples of 200 μL were efficiently deproteinized with acetonitrile. Assay was performed using a C_{18} CC with a ternary gradient elution of 50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KH_2PO_4 : acetonitrile: methanol and UV/Vis detection at 416 nm. The analytical method was linear in a range of 10–1280 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, precise (RSD % > 2.2), accurate (RE % < 7.8) and with high recovery (% > 95%). Stability studies showed that TZO was stable in plasma for short and long-time period (45 days) and proved to be suitable for pharmacokinetic studies of NTZ in rats. The method was also evaluated using human plasma samples and no statistical differences were found in the response-curve between rat and human samples.

1. Introduction

Nitazoxanide (NTZ) is a broad-spectrum antihelmintic agent, which is effective against a wide variety of parasites and bacteria infecting animals or humans (Fox et al. 2005). It has been available for several years in developing countries where tapeworm and liver fluke infestations are common (Rossignol et al. 2006). In USA, it has been approved for the treatment of *Cryptosporidium parvum* in patients with AIDS and for the treatment of *Giardia lamblia* (Fox et al. 2005). The antiprotozoal activity of NTZ is believed to be due to interference with the pyruvate ferredoxin oxidoreductase (PFOR) enzyme-dependent electron transfer reaction, which is essential to anaerobic energy metabolism (Sisson et al. 2002). It has been shown that once orally administered, NTZ is rapidly metabolized to tizoxanide (TZO) which also shows parasitocidal activity.



(A) Tizoxanide (B) Nifuroxazide

Recently, *in vitro* studies have shown that the cestocidal effect of albendazole sulphoxide in combination with tizoxanide is additive (Palomares-Alonso et al. 2007), therefore preclinical pharmacokinetic studies are required to confirm the results. Few methodologies have been developed for the quantification of TZO in plasma. A couple of procedures using HPLC UV/Vis for pharmacokinetic studies in humans (using a volume of 500 μL of sample) have been described elsewhere (Stockis et al. 1996; Agarwal et al. 2007). Other methods using LC/MS/MS and TLC with densitometry for detection reported a lower limit of quantification (LOQ) around 20 and 400 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ respectively (Stockis et al. 2002; Namur et al. 2007). On the other hand, there are no reports of the pharmacokinetic parameters of TZO in rats in the published literature so far.

In this paper we describe a sensitive HPLC assay for TZO determination using an analytical wavelength of 416 nm with nifuroxazide (NFZ) as internal standard (IS). A reproducible protein precipitation methodology for rat and human plasma with a volume of 200 μL of sample was probe; LOQ was 10 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and stability studies that have not been reported before were performed. The method was validated according to the procedures and acceptance criteria based on FDA guidelines (FDA guidelines 2001). After validation, samples from a pharmacokinetic study in rats were analyzed using this method.

2. Investigations, results and discussion

TZO and IS are compounds with almost equal polarities, instead of an isocratic mobile phase method a ternary gra-

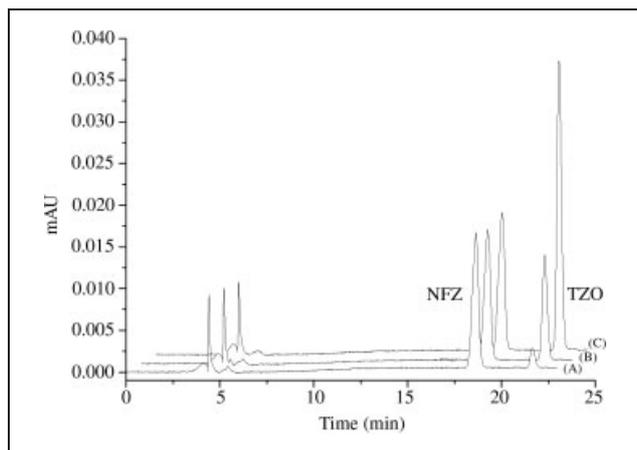


Fig. 1: Chromatograms quality control points 70 (A), 400 (B) and 1000 (C) $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$

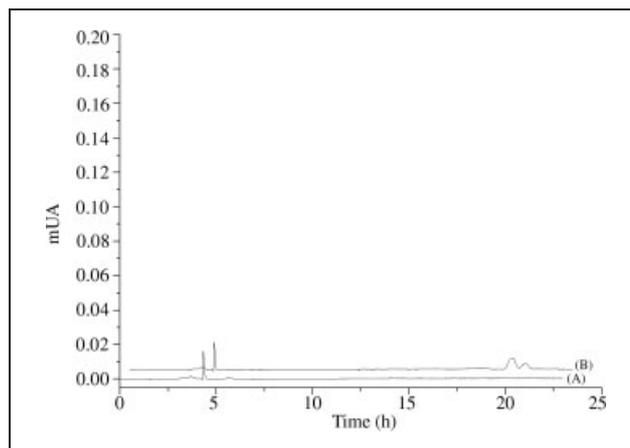


Fig. 2: Chromatograms of blank human plasma (A) and blank rat plasma samples

dient elution was employed to obtain better resolution and peak shape (Fig. 1).

The method was validated by evaluating selectivity, linearity, accuracy, precision, recovery, quantification limit and short and long term stability. The LOQ was $10 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ and all calibration curves were linear in a range of 10–1280 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ ($y = 0.015x + 0.0003$) with an average determination coefficient of $0.9995 + 3.6 \text{ E-}04$. Extraction efficiency mean value was $101 \pm 2.8\%$, $101 \pm 0.6\%$ and $104 \pm 2.3\%$ for low, medium and high QC samples respectively, while the recovery for the IS was $95 \pm 0.4\%$.

In order to determine precision and accuracy of the method, three replicates of each QC sample were evaluated. Results are shown in Table 1. It can be seen that the coefficient of variation of the intra-day precision did not exceed 2.2% and for the inter-day precision (3 days) the maximum value was 8.1%. In the case of accuracy, the values were within -0.4 and 7.8% at each concentration level.

TZO stability in plasma has not been reported so far. In

Table 1: Intra- and inter-day precision and accuracy results for assay (n = 3)

Added, C ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Found, C ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	Inter-day R.S.D.(%)	Intra-day R.S.D.(%)	RE (%)
70	71.6	2.2	4.5	-0.4
400	392.8	0.9	8.1	7.8
1000	987.25	0.8	7.3	5.9

Table 2: Short-term and long-term results for assay stability (n = 3)

Experimental condition	Added, C ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)	TZO	
		Found, C ($\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$) + S.D.	RE (%)
Short-term stability			
Autosampler samples, 72 h at 15°C	70	73.6 ± 2.7	-5.1
	1000	955.4 ± 2.1	4.4
2 Freeze-thaw cycles	70	74.4 ± 5.8	-6.4
	1000	945.6 ± 0.5	5.4
Processed sample, 24 h at 4°C	70	78.4 ± 1.6	12.0
	1000	1137.3 ± 3.1	-13.7
Room sample, 24 h at 28°C	70	64.5 ± 9.9	7.7
	1000	976.0 ± 9.8	12.0
Long-term stability			
Plasma sample, 45 days storage at -70°C	70	64.3 ± 7.8	8.0
	1000	984.0 ± 3.0	3.0

this study short and long stability tests under FDA requirements were performed. Table 2 summarizes the results. It can be observed that processed samples can be stored for 72 h at 15°C in the autosampler prior to analysis. On the other hand, results of processed and freeze and thaw samples did not show a significant loss of the compound after analysis; therefore, samples can be analyzed after 24 h after being processed and stored at 4°C and after two freeze and thaw cycles at -70°C . Stability test performed at room temperature showed that after 24 h at 25°C neither low nor high concentration of QC samples presented a significant degradation, and therefore no stability-related problems were found during routine sample analysis. Long-term stability results showed that samples were stable at least for 45 days at -70°C .

Figure 3 shows the pharmacokinetic profile of TZO in rats after oral administration of NTZ (7.5 mg/kg). No plasma levels were found after 6 h. Results of pharmacokinetic parameters were: maximum plasma concentration of TZO (C_{max}) $258 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$, time of maximum plasma concentration (t_{max}) 0.25 h, area under the plasma concentration versus time curve from 0 to the last measured concentration (AUC) $366.89 \text{ ng} \cdot \text{mL/h}$, area under the plasma concentration versus time from 0 to infinity ($\text{AUC}_{0 \text{ to } \infty}$), $450.1361 \text{ ng} \cdot \text{mL/h}$, half life ($t_{1/2}$) 1.64 h and mean residence time (MRT) 2.31 h.

To determine if this analytical procedure could be used for human plasma samples, selectivity (Fig. 2) and linearity were studied. No interferences in peak retention times of

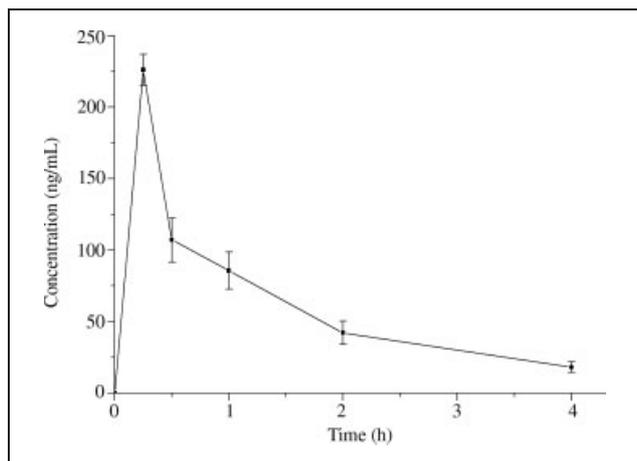


Fig. 3: TZO plasma concentration Vs time obtained after a dose of 7.5 mg · kg oral administration of NTZ in rats

TZO and IS (21.7, 18.6 min) were found from blank plasma samples. From curves analyzed in human plasma a linear relationship ($r = 0.9997$) in a range of 10–1280 ng · mL⁻¹ ($y = 0.0014x - 0.013$) was found. No statistical differences were found in slope or intercept between rat and human plasma samples, indicating that human plasma samples could also be analyzed using this methodology. The method is sensitive and simple and can be used for pharmacokinetic or bioavailability studies.

3. Experimental

3.1. Chemicals

TZO was synthesized by Dr. Rafael Castillo-Bocanegra at the Facultad de Química, UNAM. Chemical identity was confirmed by NMR, MS analysis and m.p. determination. NFZ was purchased from Sigma-Aldrich Co., U.S.A. Me and Ac were HPLC grade (Sigma-Aldrich Co., USA). Potassium dihydrogenphosphate (KH₂PO₄) (Sigma-Aldrich Co., USA) and dimethylsulphoxide (DMSO) (Merck, 99%) were of analytical reagent-grade. Water was obtained in-house from a Milli-Q Water System (Millipore Corporation, USA). Rat plasma was obtained from healthy Sprague-Dawley rats from the Instituto Nacional de Neurología y Neurocirugía (México, D.F.). Human plasma was obtained from healthy volunteers.

3.2. Chromatographic method

The chromatographic system consisted of a Waters Alliance 2690 HPLC pump (Waters, Milford, MA, USA), coupled to a photodiode array detector 2996 (Waters, Milford, MA, USA) and a Waters Alliance 2690 autosampler equipped with a 100 µL loop. Separation was performed using an X-Terra C₁₈ CC (150 mm × 4.6 mm, 5 mm; Waters Milford, MA, USA) protected with a security guard column (Phenomenex C₁₈ ODS). Autosampler and CC oven were held at 15 °C and 25 °C respectively. The initial mobile phase was composed of a mixture 90:5:5 (v/v) of phosphate buffer (KH₂PO₄ 50 mmol · L⁻¹, pH = 5.7):methanol: acetonitrile (PAM) pumped at 0.4 mL · min⁻¹. The gradient was achieved varying linearly the mobile phase composition over 23 min up to final mixture (v/v) 10:45:45 of PAM.

3.3. Preparation of standard and quality control samples

From a stock solution of 1 mg · mL⁻¹ in methanol a dilution was made for the IS working solution (6000 ng · mL⁻¹). Stock solution of TZO (1 mg · mL⁻¹) was prepared by dissolving a weighed amount of 10 mg TZO in a DMSO/acetonitrile solution (30:70, v/v). After use, stock solutions of TZO and NFZ were stored at 4 °C. Standard solutions in methanol at concentrations of 10 and 100 mg · mL⁻¹ were prepared from serially dilutions of TZO stock solution. Calibration curves were prepared by spiking 100 µL of the appropriate standard solution in 900 µL of drug-free rat plasma in order to obtain the desired concentrations (10, 20, 40, 80, 160, 320, 640 and 1280 ng · mL⁻¹). The same procedure was made for quality control samples (QC) at low, medium and high concentrations (70, 400 and 1000 ng · mL⁻¹). The spiked samples (calibration points and QC) were then processed by the protein precipitation procedure.

3.4. Protein precipitation procedure

A volume of 200 µL of spiked plasma sample was transferred into 1 mL plastic tubes and spiked with 100 µL of IS solution (6000 ng · mL⁻¹). After the addition of 200 µL of acetonitrile, samples were shaken in a vortex for 2 min, and centrifuged for 20 min at 15000 rpm. Supernatant was separated to a clean plastic tube, an aliquot of 200 µL was transferred into the autosampler and 100 µL were injected into the chromatographic system.

3.5. HPLC method validation

3.5.1. Selectivity

In order to determine the selectivity, blank plasma samples from three different rat sources, and hemolyzed plasma samples were analyzed.

3.5.2. Sensitivity

Accuracy and precision of the LOQ were validated with the extraction of five spiked samples of 10 ng · mL⁻¹ of TZO.

3.5.3. Linearity in rat plasma

For linearity three calibration curves at concentrations of 10, 40, 80, 160, 320, 640 and 1280 ng · mL⁻¹ were subjected to preparation procedure and injected to the HPLC system. Calibration curves were plotted using the relationship between the area of TZO/IS versus concentration and analyzed by unweighted least squares linear regression.

3.5.4. Recovery

The % recovery of TZO and IS after protein precipitation procedure from spiked plasma samples was determined by analyzing five extracted samples of concentrations 70, 400 and 1000 ng · mL⁻¹. The peak area ratio of TZO/IS of these samples was compared with standard solutions in 40:20:40 v/v water: methanol: acetonitrile at the same concentration as plasma samples.

3.5.5. Precision and accuracy

Accuracy and inter-day precision were calculated on a single day using three replicates of the QC samples. For the intra-day precision three replicates of the low, medium and high quality control points were evaluated over three consecutive days. Accuracy was evaluated as follows: [mean theoretical concentration – mean calculated concentration/mean theoretical concentration] × 100 (% of relative error, %RE), while the precision was given by the inter-day and intra-day in % of relative standard deviation (%RSD).

3.5.6. Stability

The stability of the active metabolite TZO was evaluated using different temperature and time conditions. Short-term stabilities (autosampler, freeze-thaw, processed sample and room temperature) as well as long-term stability (45 days) were carried out during the validation of the analytical method. For all of studies, three replicates of the QC samples at low and high concentrations were processed and analyzed according requirements. Stability test results were compared with fresh QC samples. Autosampler stability was evaluated keeping the processed samples in the autosampler during 72 h at 15 °C. In case of stability of the processed sample, QC were extracted and stored at 24 h at 4 °C. For testing freeze and thaw analyte stability aliquots of QC were stored at –70 °C for 24 h and thawed unassisted at room temperature. This procedure was replicated twice. Finally, for the room temperature stability test, aliquots remained 24 h at room temperature before analysis. Long-term stability was evaluated by storing QC during 45 days at –70 °C.

3.5.7. Pharmacokinetic study in rats

The study protocol complied with the “Guide to the Care and Use of Experimental Animal Care” and was approved by the Animal Ethics Committee of the Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Six male Sprague-Dawley rats weighing 290 ± 10 g received a single oral dose of NTZ in suspension at 7.5 mg · kg. Blood samples of 0.4 mL were drawn via a catheter implanted into the vein tail and collected into heparinized tubes before administration and at 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 6.0 h. After sample collection, 0.4 mL of physiologic saline solution was administered for compensation of loss blood. Samples were centrifuged at 3500 rpm for 15 min; plasma was separated and stored frozen at –70 °C until analysis using the validated HPLC method. Pharmacokinetic parameters were determined by a non compartmental model using WinNonLin 4.0 program (Pharsight, Mountain View, CA, USA), and C_{max}, t_{max}, AUC, AUC_{0 to ∞}, t_{1/2} and the MRT, were calculated.

3.5.8. Linearity and selectivity in human plasma

Two calibration curves were prepared from a pool of three different sources of human plasma, and analyzed using the same procedure for rat plasma. Slope, intercept and correlation coefficient were determined.

References

- Agarwal S, Solomon WD, Gowda KV, Selvan PS, Ghosh D, Sarkar AK, Chattaraj TK, Pal TK (2007) Bioequivalence study of a fixed dose combination of nitazoxanide and ofloxacin in Indian healthy volunteers. *Arzneimittelforschung* 57: 679–683.
- FDA Guidance for Industry, Bioanalytical Method Validation, US Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER). 2001, <http://www.fda.gov/cder/guid-ance/index.htm>.
- Fox LM, Saravolatz LD (2005) Nitazoxanide: a new thiazolide antiparasitic agent. *Clin Infect Dis* 15: 1173–1180.
- Namur S, Cariño L, González-dela Parra M (2007) Development and validation of a high-performance thin-layer chromatographic method, with densitometry, for quantitative analysis of tizoxanide (a metabolite of nitazoxanide) in human plasma *J Planar Chromatogr* 20: 331–334.
- Palomares-Alonso F, Piliado JC, Palencia G, Ortiz-Plata A, Jung-Cook H (2007) Efficacy of nitazoxanide, tizoxanide and tizoxanide/albendazole sulphoxide combination against *Taenia crassiceps* cysts. *J Antimicrob Chemother* 59: 212–218.
- Rosignol JF, El-Gohary YM (2006) Nitazoxanide in the treatment of viral gastroenteritis: a randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Aliment Pharmacol Therap* 15: 1423–1430.
- Sisson G, Goodwin A, Raudonikiene A, Hughes NJ, Mukhopadhyay AK, Berg DE, Hoffman PS (2002) Enzymes associated with reductive activation and action of nitazoxanide, nitrofurans, and metronidazole in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother* 46: 2116–2123.
- Stockis A, De Bruyn S, Gengler C, Rosillon D (2002) Nitazoxanide pharmacokinetics and tolerability in man during 7 days dosing with 0.5 g and 1 g b.i.d. *Int J Clin Pharmacol Ther* 40: 221–227.
- Stockis A, Deroubaix X, Lins R, Jeanbaptiste B, Calderon P, Rosignol JF (1996) Pharmacokinetics of nitazoxanide after single oral dose administration in 6 healthy volunteers. *Int J Clin Pharmacol Therap* 34: 349–351.