



ESCUELA POLITÉCNICA DEL EJÉRCITO

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS DE LA VIDA

INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**EVALUACION IN VITRO DEL EFECTO TOXICO DE
UNA FORMULACION DE GLUCANTIME EN
NANOEMULSION CONTRA PARASITOS
PROTOZOARIOS DEL GENERO LEISHMANIA**

Previa a la obtención de Grado Académico o Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGIA

ELABORADO POR:

STEPHANIE CAROLINA SANTANDER VASQUEZ

SANGOLQUÍ, DICIEMBRE del 2010

RESUMEN

La leishmaniasis es una parasitosis endémica en regiones tropicales y subtropicales alrededor del mundo, causada por infección con protozoarios del género *Leishmania*. Los antimoniales pentavalentes constituyen el tratamiento de elección contra leishmaniasis. El alto costo y la baja adherencia de los pacientes a su administración, resulta en un efecto antiparasitario poco eficaz. Las nanoemulsiones son formulaciones de agua y aceite que generan partículas con un tamaño no mayor a 100nm. Las características físicoquímicas de estas formulaciones facilitan su penetración en los tejidos, siendo entonces vehículos efectivos para administrar fármacos. Este estudio evaluó el efecto antiparasitario de una nanoemulsión de antimonato de meglumina contra las dos formas biológicas de *Leishmania braziliensis*. Se infectó *in vitro* macrófagos peritoneales de ratón BALB/c y macrófagos RAW 264.7 con *L. braziliensis*. Los promastigotes fueron mantenidos en cultivos suplementados con sangre de conejo. Mediante tinción metacromática, prueba enzimática MTT y PCR en tiempo real se evaluó carga parasitaria y viabilidad de los parásitos después de la aplicación del medicamento. Se calculó IC₅₀ para establecer la concentración de nanoemulsión con antimonato de meglumina con acción anti-leishmanicida efectiva. La respuesta inmunológica de las células hospedadoras frente a la infección fue caracterizada por expresión de citoquinas mediante RT-PCR. Los resultados demostraron que la nanoemulsión con antinomato de meglumina fue efectiva en el control de la parasitosis, con una IC₅₀ de 148 µg/ml para promastigotes y 88 µg/ml para amastigotes. La respuesta inmunológica de las células infectadas y tratadas con nanoemulsión de Glucantime® fue de tipo Th1, contribuyendo a la eliminación del parásito. En conclusión las nanopartículas resultan ser un buen vehículo de entrega de medicamento *in vitro*, mejorando el efecto antileishmaniásico del antimonato de meglumina y generando una mejor respuesta antiparasitaria en las células hospedadoras, sin causar efectos tóxicos en ellas.

Palabras clave: leishmaniasis, antileishmanicida, *L. braziliensis*, amastigotes, promastigotes, macrófagos peritoneales, macrófagos Raw 264.7, MTT, PCR tiempo real, RT-PCR; respuesta Th1.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a parasitic disease endemic in tropical and subtropical regions around the world, caused by infection with protozoa of the genus *Leishmania*. The pentavalent antimonials are the treatment of choice against leishmaniasis. The high cost and low patient adherence to administration, resulting in a very effective anti-parasitic effect. Nanoemulsions are formulations of water and oil to generate particles with a size no greater than 100nm. The physicochemical characteristics of these formulations facilitate its penetration into the tissues, then being effective vehicles for delivering drugs. This study evaluated the parasitic effect of a nanoemulsion of meglumine antimonato against the two biological forms of *Leishmania braziliensis*. Were infected in vitro mouse peritoneal macrophages BALB / c RAW 264.7 macrophages with *L. braziliensis*. The promastigotes were maintained in cultures supplemented with rabbit blood. By metachromatic staining, enzymatic assay and MTT real-time PCR was evaluated parasite load and parasite viability after drug application. IC50 was calculated to establish the concentration of nanoemulsion with meglumine antimonato with anti-leishmanicidal action effectively. The immune response of host cells against infection was characterized by expression of cytokines by RT-PCR. The results demonstrated that the nanoemulsion with meglumine antimonato was effective in controlling the parasite, with an IC50 of 148 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for promastigotes and 88 $\mu\text{g} / \text{ml}$ for amastigotes. The immune response of infected cells treated with nanoemulsion of Glucantime® was Th1 type, helping to eliminate the parasite. In conclusion, the nanoparticles are a good vehicle for drug delivery in vitro, enhancing the effect of antimonato of meglumine and generate a better anti-parasitic response in host cells without causing toxic effects on them.

Keywords: leishmaniasis,. antileishmanicida amastigotes, promastigotes, peritoneal macrophages, RAW 264.7 macrophages, MTT, *L. braziliensis*, real-time PCR, RT-PCR, Th1 response



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

CERTIFICACIÓN

Certifico que el presente trabajo fue realizado en su totalidad por la Srta. STEPHANIE CAROLINA SANTANDER VASQUEZ como requerimiento parcial a la obtención del título de INGENIERA EN BIOTECNOLOGIA

Diciembre, 2010

Msc. Fernanda Loayza

Dr. Marcelo Grijalva

DECLARACION DE RESPONSABILIDAD

STEPHANIE CAROLINA SANTANDER VASQUEZ

Declaro que:

El proyecto de grado denominado **EVALUACION IN VITRO DEL EFECTO TOXICO DE UNA FORMULACION DE GLUCANTIME EN NANOEMULSION CONTRA PARASITOS PROTOZOARIOS DEL GENERO LEISHMANIA**, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mí autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Sangolquí, Diciembre del 2010

Stephanie Santander Vásquez

CERTIFICACION

Msc. Fernanda Loayza

Dr. Marcelo Grijalva

Certifican:

Que el trabajo titulado **EVALUACIÓN *IN VITRO* DEL EFECTO TOXICO DE UNA FORMULACIÓN DE GLUCANTIME EN NANOEMULSION CONTRA PARASITOS DEL GÉNERO LEISHMANIA**, realizado por STEPHANIE CAROLINA SANTANDER VASQUEZ, ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la ESPE, en el Reglamento de Estudiantes de la Escuela Politécnica del Ejército.

SI se recomiendan su publicación.

El mencionado trabajo consta de un documento empastado y un disco compacto el cual contiene los archivos en formato portátil de Acrobat(pdf). Autorizan a Stephanie Carolina Santander Vásquez que lo entregue a Ing. Rafael Vargas, en su calidad de Coordinador de la Carrera.

Sangolquí, Diciembre 2010

Msc. Fernanda Loayza

DIRECTOR

Dr. Marcelo Grijalva

CODIRECTOR



AUTORIZACIÓN

Yo, STEPHANIE CAROLINA SANTANDER VASQUEZ

Autorizo a la Escuela Politécnica del Ejército la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución del trabajo EVALUACION IN VITRO DEL EFECTO TOXICO DE UNA FORMULACION DE GLUCANTIME EN NANOEMULSION CONTRA PARASITOS PROTOZOARIOS DEL GENERO LEISHMANIA, cuyo contenido, ideas y criterios son de mi exclusiva responsabilidad y autoría.

Sangolquí, Diciembre 2010)

Stephanie Santander Vásquez



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

DEDICATORIA

Este trabajo esta dedicado a mi mama y mi hermana por todo su cariño y apoyo.

Stephanie Santander V.

AGRADECIMIENTO

Un agradecimiento especial al Dr. Manuel Baldeon por permitirme trabajar con usted, por abrirme las puertas de su laboratorio, por compartir sus conocimientos y su confianza. Gracias, por apoyarme no solo con recursos y herramientas para realizar este trabajo sino por hacerme parte de su grupo de trabajo.

A Fernanda Loayza por ser la persona que me dio la mano cuando mas lo necesite, por ser mi apoyo, mi maestra y por compartirme todos sus conocimientos, pocas veces se tiene la suerte de llegar a conocer a personas tan extraordinarias.

A Msc. Martha Yopez, que con su calidad humana y profesional me apoyaron y alentaron todo este tiempo.

A mi mami y ñaña por su apoyo incondicional y ser esa fuerza motivadora siempre soy lo que soy y he llegado hasta aquí por ellas.

Cris Chavez, Sarita Cifuentes, Fer Tupiza, por ayudarme, colaborame y ser parte de una u otra forma en el desarrollo de este trabajo.

A mis amigas por todo su apoyo y animo

A Leo por su apoyo todo este tiempo

Al Dr. Renato Leon por dejarme trabajar en su laboratorio en la Universidad San Francisco de Quito.

Al Dr. Marcelo Grijalva

Al Dr. Angel Guevara

A Ing. Cecilia Cruz por ayudarme con equipo y conocimiento en el laboratorio de la Universidad Catolica de Quito DISERLAB.

Un agradecimiento especial tambien a la Universidad San Francisco de Quito.

Stephanie Santander V.

HOJA DE LEGALIZACION DE FIRMAS

ELABORADO POR

STEPHANIE CAROLINA SANTANDER VESQUEZ

COORDINADOR DE LA CARRERA

Ing. Rafael Vargas

SECRETARIO ACADÉMICO

Abg. Vanesa Andrade

Sangolquí, Diciembre 2010

INDICE DE ILUSTRACIONES

Ilustración 1.1 Distribución de Leishmaniasis en el Mundo (Handman, 2001) _____	8
Ilustración 1.2 Tasas de incidencia anual de Leishmaniasis (Aguilar, 2008), Ministerio de Salud Pública _____	9
Ilustración 1.3 Representación de Leishmania en forma promastigote y amastigote (McConville et al., 2002) _____	11
Ilustración 1.4 Ciclo de Leishmania en los hospedadores vertebrados e invertebrados (Chang, 1985) _____	12
Ilustración 1.5 Clasificación de los parásitos del genero Leishmania basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía numérica (Dedet, 1993) _____	14
Ilustración 1.6 Distribución Geográfica de Cepas de Leishmania en el Ecuador (Calvopiña, 2004) _____	15
Ilustración 1.7 Mecanismos de respuesta inmune a Leishmania spp. El papel del complemento, la respuesta inflamatoria local y los macrófagos como células presentadoras de antígeno en la resolución de la infección o el desarrollo de la enfermedad (Agudelo, 2000). _____	20
Ilustración 1.8 Figura esquemática de formas diferentes de nano partículas para el desarrollo de drogas, (a) liposoma, (b) nanopartícula polimérica, (c) nanopartícula solida lipídica, (d) dendrimero. Círculos negros representan drogas hidrofóbicas; cuadrados negros representan drogas hidrofílicas; y triángulos negros representan otras drogas hidrofóbicas o hidrolíticas. _____	29
Ilustración 3.1 Efecto toxico de tratamientos en macrófagos de línea celular Raw 264.7	45
Ilustración 3.2 Efecto toxico de tratamientos en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c _____	45
Ilustración 3.3 Amastigotes intracelulares en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c	46
Ilustración 3.4 Infección de macrófagos con promastigotes de Leishmania. A) Macrófagos obtenidos de lavado peritoneal; B) Macrófagos adheridos a la base de las placas de cultivo; C) Promastigotes de Leishmania, cultivo de 7 días; D) Macrófagos y parásito en placa bajo microscopio _____	47
Ilustración 3.5 Amplificación de DNA para Curva estándar y muestras, incluyen el control con la temperatura de Melting _____	50
Ilustración 3.6 Porcentaje de Inhibición PCR en Tiempo Real _____	51
Ilustración 3.7 Expresión de iNOS y Citoquinas en geles de agarosa al 2% _____	52
Ilustración 3.8 Porcentaje de citoquinas a los diferentes tratamientos _____	53

INDICE DE TABLAS

Tabla 2.1 Composición de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine _____	36
Tabla 2.2 Condiciones para LightCycler para PCR - Tiempo Real _____	39
Tabla 2.3 Secuencias de sondas y primers para interleuquinas de ratón _____	40
Tabla 3.1 Análisis de viabilidad celular con MTT para Promastigotes de <i>Leishmania (V) braziliensis</i> (M2903) _____	43
Tabla 3.2 Viabilidad celular con MTT para Amastigotes de <i>Leishmania (V) braziliensis</i> (M2903) _____	43
Tabla 3.3 Concentración inhibitoria al 50 % (IC50) de los tratamientos para Amastigotes y Promastigotes de <i>Leishmania</i> _____	44
Tabla 3.4 Amastigotes intracelulares en placa _____	48
Tabla 3.6 Porcentajes de expresión de citoquinas a los diferentes tratamientos según GAPDH _____	52



PDF Complete

Your complimentary use period has ended.
Thank you for using PDF Complete.

[Click Here to upgrade to Unlimited Pages and Expanded Features](#)

INDICE DE ANEXOS

1	<i>ANEXO: Resultados estadísticos</i>	75
1.1	Promastigotes pruebas de viabilidad celular con MTT	75
1.2	Amastigotes pruebas de viabilidad celular con MTT	80
1.3	Amastigotes intracelulares en placa	84
1.4	Análisis PCR- Tiempo Real	86
2	<i>ANEXO: Análisis LightCycler</i>	91

INDICE DE CONTENIDOS

1	INTRODUCCION	1
1.1	FORMULACION DEL PROBLEMA	1
1.2	JUSTIFICACION DEL PROBLEMA	4
1.3	OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION	7
1.3.1	OBJETIVO GENERAL	7
1.3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	7
1.4	MARCO TEORICO	8
1.4.1	Generalidades	8
1.4.2	Agente Causal	10
1.4.2.1	Clasificación del parásito	13
1.4.2.2	Biología Molecular y Bioquímica del parásito	15
1.4.3	Vector de transmisión	16
1.4.4	Reservorio	17
1.4.5	Infección por <i>Leishmania</i>	18
1.4.5.1	Leishmaniasis Cutánea	21
1.4.5.2	Leishmaniasis cutánea localizada	22
1.4.5.3	Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)	22
1.4.5.4	Leishmaniasis muco-cutánea	23
1.4.5.5	Leishmaniasis visceral o Kala-azar:	24
1.4.6	Respuesta inmunológica	24
1.4.7	Antimoniato Pentavalentes	25
1.4.8	Nanoemulsión	27
1.4.9	Nanoemulsión de antimonio de meglumine	31
2	MATERIALES Y METODOS	32
2.1	Colaboradores	32
2.2	Zona de Estudio	33
2.3	Periodo de Investigación	33
2.4	Diseño	33
2.5	Procedimientos	33
2.5.1	Parásitos	33
2.5.2	Cultivo de Parásitos	34
2.5.3	Cultivo de Macrófagos Peritoneales	34
2.5.4	Cultivo de macrófagos RAW 264,7	35
2.5.5	Infección de macrófagos ó promastigotes de <i>Leishmania</i>	35

2.5.6	Tratamientos	36
2.5.7	Determinación de la carga parasitaria	36
2.5.7.1	Amastigotes intracelulares en placa	37
2.5.7.2	Viabilidad de parásitos - MTT	37
2.5.7.3	Determinación de Carga Parasitaria por PCR en Tiempo Real.	38
2.5.8	Primers	39
2.5.9	Expresión de citoquinas	40
2.6	Análisis de Datos	41
3	RESULTADOS	42
3.1	Efecto de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine en cultivos de Leishmania	42
3.2	Toxicidad de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine en macrófagos peritoneales y macrófagos de la línea celular RAW 264.7 de ratones BALB/C.	44
3.3	Sistema in vitro de infección en Macrófagos	46
3.4	Efecto toxico de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine en sistema in vitro de infección en macrófagos	47
3.5	Efecto antileishmanicida de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine por PCR en Tiempo Real	49
3.6	Respuesta inmune de macrófagos infectados con Leishmania. Expresión de iNOS y Citoquinas	51
4	DISCUSION	54
5	CONCLUSIONES	61
6	RECOMENDACIONES	62
7	BIBLIOGRAFÍA	63

CAPITULO 1

1 INTRODUCCION

1.1 FORMULACION DEL PROBLEMA

Las enfermedades tropicales producidas por parásitos unicelulares son infecciones de amplia distribución mundial, la importancia de su estudio radica en a los elevados costos resultantes de su morbilidad y mortalidad, sobre todo cuando están asociadas a síndromes de inmunosupresión y patologías crónicas severas (Badaro, 1986). La malaria, la criptosporidiasis, la enfermedad del sueño, la enfermedad de Chagas, la leishmaniasis, entre otras, son infecciones de gran impacto en la salud pública porque afectan grandes grupos poblacionales generalmente de escasos recursos económicos (Reguera, 2007).

La leishmaniasis constituye un grupo de entidades infecciosas de distinta presentación clínica. La infección es causada por protozoarios flagelados del género *Leishmania*, transmitidas al ser humano, animales domésticos y silvestres, por la picadura de un insecto vector correspondiente al grupo de los flebotominos siendo los géneros *Lutzomyia* (Manta Blanca) y *Phlebotomus*, los trasmisores de los parásitos en el Nuevo Mundo y Viejo Mundo respectivamente. Esta parasitosis se caracteriza por un espectro clínico, que depende de la patogenicidad de la *Leishmania* y de la respuesta inmunológica del hospedador; las manifestaciones clínicas incluyen lesiones cutáneas, mucosas y viscerales (Manual de la OIE sobre animales terrestres, 2004).

La leishmaniasis es endémica en 88 países, la población en riesgo es de aproximadamente 350 millones de personas en todo el mundo. La prevalencia mundial es de 12 a 14 millones de pacientes y la incidencia es de 1,5- 2 millones de nuevos casos por año (UNDP/World Bank/WHO). La forma cutánea de la infección afecta a 1-1,5 millones de personas mientras que 500.000 de los casos se describen como Leishmaniasis visceral (UNDP/World Bank/WHO). El 90% de los casos cutáneos ocurren en Afganistán, Irán, Arabia Saudita, Siria, Brasil y Perú; mientras que el 90% de los casos de leishmaniasis visceral se presentan en Bangladesh, Brasil, India, Nepal y Sudan (Desjeux, 1996, 1999).

En el continente americano la incidencia de Leishmaniasis cutánea (LC) en la población general es variable, se reporta en Venezuela 11.2 casos nuevos /año, para Ecuador 13.96 casos, Panamá 43 casos, Costa Rica 55.2, Colombia 60.9 casos por año (Arias, 1996). En el Viejo mundo se encuentra en el sur de Europa, Asia (Oriente Medio, Afganistán, Pakistán) y África (Gómez, 2007). Según la OMS, la enfermedad adquirió proporciones de epidemia en Afganistán y en los campamentos para refugiados de este país en Pakistán. La organización Health Net International (HNI), que desde 1993 dirige clínicas con apoyo de la OMS en este país, estimó que la enfermedad ya es prevalente en 7 % de los 75 000 habitantes de Kabul (Yusufzai, 2006).

Sin embargo, los datos oficiales no reflejan la realidad de la afección humana debido a varios factores limitantes: 1) numerosos casos no son diagnosticados o no se declaran, 2) la mayoría de los datos oficiales se obtienen exclusivamente a partir de la detección pasiva de los casos, 3) el número de personas infectadas asintomáticas, es mucho mayor que el número de casos que manifiestan la enfermedad y, finalmente, 4) la leishmaniasis es de declaración obligatoria en sólo 40 de los 88 países endémicos (INS, 2007). Estos aspectos hacen que la leishmaniasis conjuntamente con la *malaria*, *esquistosomiasis*, *filariasis*, *trypanosomiasis* y *tuberculosis*, sean consideradas por la Organización Mundial de

la Salud (OMS) como las seis enfermedades tropicales de mayor importancia en términos de investigación para nuevos métodos de prevención, diagnóstico y tratamiento. (González, 2003).

La ciencia no ha desarrollado aún el remedio universal frente a las enfermedades tropicales y es muy poco probable que una solución única exista. Se sabe que el estado inmunológico, refiriéndose al desarrollo de inmunidad adquirida, es fundamental en la resolución de estas infecciones. Sin embargo, a pesar de los esfuerzos realizados aún no existe una vacuna para prevenir ninguna de estas dolencias (Reguera, 2007).

En leishmaniasis, la quimioterapia empleada como tratamiento consiste en la administración de antimoniales pentavalentes (Pentostan, Neostibosán y Glucantime), anfotericina B y su formulación lipídica Ambisome^a y Pentamidina (Croft, 2006).

Los antimoniales fueron introducidos por primera vez en 1945 y aún son la primera línea de tratamiento por su efectividad contra algunas formas de leishmaniasis. Sin embargo, la necesidad de someter al paciente a una administración parenteral del fármaco durante 28 días, la eficacia variable frente a leishmaniasis visceral y cutánea, su elevado costo, así como la emergente resistencia a dicho fármaco, comprometen su uso en gran medida (Yépez, 2003; Rangel, 1997).

La anfotericina B ha sido probada con una alta eficacia frente a leishmaniasis visceral resistente a antimoniales, sin embargo, su elevada toxicidad y la necesidad de la perfusión intravenosa lenta durante al menos cuatro horas, dificulta su éxito como tratamiento (Ortiz, 2005). Una alternativa eficaz fue el desarrollo de una formulación asociada a lípidos, comercialmente conocida como Ambisome, que tiene la propiedad de reducir los efectos colaterales, tiene una vida media más prolongada permitiendo una mejor captación del compuesto por los macrófagos; sin embargo su elevado costo continúa limitando su uso (Croft et al., 2003). Las

diaminas, al igual que la anfotericina B, constituyen un tratamiento de segunda elección ya que presentan una elevada toxicidad. Se suelen administrar cuando se observa una falta de respuesta de la infección frente a la administración de antimoniales (Croft et al., 2003)

Hay que señalar que añadido a la toxicidad, la mayoría de estos fármacos no son fáciles de manejar, requieren tratamientos largos, costosos y en muchas ocasiones no están libres de efectos secundarios (Rivas et al., 2004; Burton, 2001).

Por otro lado, la sombra de estas enfermedades amenaza hoy a los llamados países desarrollados. Los intercambios culturales y turísticos, fruto de la globalización y los procesos de inmunodepresión ligados a ciertas enfermedades, son factores que han hecho renacer estas dolencias donde se pensaba que habían sido definitivamente erradicadas (Rivas, 2004).

Es por esto que el diseño y desarrollo de fármacos frente a estas enfermedades suscita un creciente interés en la comunidad científica internacional, ocupando el lugar dejado por las grandes empresas farmacéuticas que no encuentran estímulo en hacer inversiones en donde no se esperan grandes beneficios económicos (Hotez, 2007).

1.2 JUSTIFICACION DEL PROBLEMA

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en la región costa, tropical y subtropical del Ecuador. Las regiones bajas al oeste de los Andes ecuatorianos en la provincia de Pichincha, representan una población de 350.386 personas en riesgo de adquirir la enfermedad (INEC, 2001).

A nivel de país, la incidencia de *leishmaniasis* entre 1990 y 2003 se ha mantenido relativamente estable con un total de 21.805 casos reportados durante este periodo sobre todo en la región costa. La incidencia anual de la enfermedad cambia con los fenómenos naturales, siendo mayor durante las estaciones lluviosas. En el 2004, 2.494 casos fueron reportados en Ecuador, determinando una incidencia de 0.2 por 1000 habitantes (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2004).

Sin embargo, es posible considerar que probablemente la incidencia de *leishmaniasis* se incrementaría en los años siguientes por el aumento de las personas expuestas al vector y el establecimiento de nuevas colonias en las áreas rurales, un proceso asociado con la rápida deforestación y el número decreciente de mamíferos pequeños que son los reservorios del parásito en su ciclo de natural (Desjeux, 2001).

El impacto socio económico de la *leishmaniasis* no ha sido cuantificado en el Ecuador. La estigmatización y el aislamiento de los pacientes provoca consecuencias sociales y económicas en las comunidades afectadas por la enfermedad (Calvopiña, 2004).

El tratamiento de la *leishmaniasis* es exigente. El protocolo actual en Ecuador consiste en 20 inyecciones intramusculares de antimonio de Meglumine en una dosis equivalente a 20 mg Sb^v (antimonio)/Kg/día, seguido por varias inyecciones intra lesionales hasta que la úlcera desaparezca completamente (Moskowitz ,1999).

El Glucantime[®] (antimonio de Meglumine) es distribuido por el Ministerio de Salud Pública, pero la disponibilidad de la medicina es limitada. El 15% de los individuos afectados lo utilizan como tratamiento único, el 79% utiliza tratamientos no convencionales, el 5.8% utiliza los dos (Weigel, 2001). Las dificultades para tratar *leishmaniasis* están contribuyendo a la persistencia de la enfermedad en el ambiente.

La ruta de administración, la intensidad del dolor, el costo, los efectos adversos de su aplicación y la creciente resistencia parasitaria a los antimoniales, resultan en una baja tasa de adherencia al tratamiento (Le Pont F, 1994). Esto fue confirmado por Weigel en el 2001, quien describió que solo el 32.6% de los pacientes de una población rural en Ecuador completan el tratamiento.

Dadas las limitaciones asociadas con las modalidades del tratamiento actual, nuevas estrategias terapéuticas son requeridas urgentemente. La fagocitosis de la droga en macrófagos, la célula blanco de infección por *Leishmania*, ha sido un problema crítico en el tratamiento de la enfermedad (Espuelas, 2002). Recientemente, sistemas vesiculares de administración de drogas como los liposomas, niosomas, microsferas y nanopartículas, han sido utilizadas *in vivo* e *in vitro* como esquemas de tratamiento anti leishmaniasis (Espuelas, 2002).

Las nanoemulsiones son un grupo de partículas con un rango de tamaño alrededor de 100 nm de diámetro o menor (Masmoudi, 2006). Estas partículas tienen un núcleo compuesto por agua o aceite, rodeado por un compuesto basado en aceite o agua respectivamente, que se encuentra disperso en la interfase de la gota (Masmoudi, 2006).

No hay estudios reportados que evalúen la eficacia del antimonato de meglumina en nanopartículas como estrategia terapéutica contra la leishmaniasis cutánea (LC) y dado que la administración de este medicamento se considera el tratamiento de primera línea disponible en el Ecuador para el control de la parasitosis, la utilización de nanotecnología en el desarrollo de una alternativa de administración tópica de este fármaco constituiría una importante contribución en la lucha contra esta enfermedad.

1.3 OBJETIVOS DE LA INVESTIGACION

1.3.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* el efecto toxico del antimonio de meglumine en una nanoemulsión contra parásitos del género *Leishmania*.

1.3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la eficacia antileishmaniásica de una nanoemulsión en un modelo *in vitro* de infección con macrófagos peritoneales de ratones Balb/c.
- Evaluar la carga parasitaria correspondiente a la infección de los macrófagos antes y después de la aplicación del tratamiento.
- Determinar la concentración inhibitoria de la nanoemulsión de Glucantime en la que se observe un efecto antileishmaniásico del 50%.
- Evaluar la respuesta inmunológica generada por los macrófagos después de la aplicación del tratamiento.

1.4 MARCO TEORICO

1.4.1 Generalidades

La leishmaniasis es una parasitosis causada por un protozoo intracelular transmitido por un vector y se caracteriza por una gran diversidad y complejidad de presentación y respuesta a la infección. (Solanny, 2006). Afecta principalmente poblaciones de áreas rurales y semiurbanas donde prevalece la pobreza y donde los sistemas de salud son deficientes. La *leishmaniasis* es endémica en áreas tropicales y subtropicales alrededor del mundo (Desjeux, 1996; Moreno 2008). En el continente americano se han reportado 14 especies de parásitos propios de la región (Grimaldi, 1989).

Esta enfermedad es considerada un problema de salud pública en el Ecuador (Hashiguchi, 1991; Stanley, 2006) y ocupa el sexto lugar de importancia entre las enfermedades tropicales, debido a que conduce a mutilaciones, deformaciones e incapacidad física (Brito, 2006).



Ilustración 1.1 Distribución de *Leishmaniasis* en el Mundo (Handman, 2001)

En Ecuador las infecciones por *Leishmania* se han reportado en 20 provincias. Los casos han sido registrados en regiones geográficas que alcanzan los 2700 msnm (Calvopina, 2004). Dada las diferencias en el tamaño de población, la incidencia más alta se encuentra en la región Oriental (66,67 por cada 100.000 habitantes para el 2008) (EPI, 2).

Como en otras áreas endémicas para leishmaniasis en latinoamérica, el incremento de la incidencia de la parasitosis puede ser atribuido al uso de la tierra, nuevos asentamientos poblacionales y la creciente exposición de humanos a la picadura de los mosquitos vectores. (Desjeux, 2001). La enfermedad es una zoonosis y los humanos son hospedadores accidentales dentro del ciclo de vida de las diferentes especies de parásitos patógenos (Torres, 2000).

La variabilidad de los casos de leishmaniasis puede deberse también al fenómeno del Niño en el Ecuador, del que no se tiene evidencia (Davies et al. 2000). Sin embargo las tasas y casos más altos coinciden con dicho fenómeno.

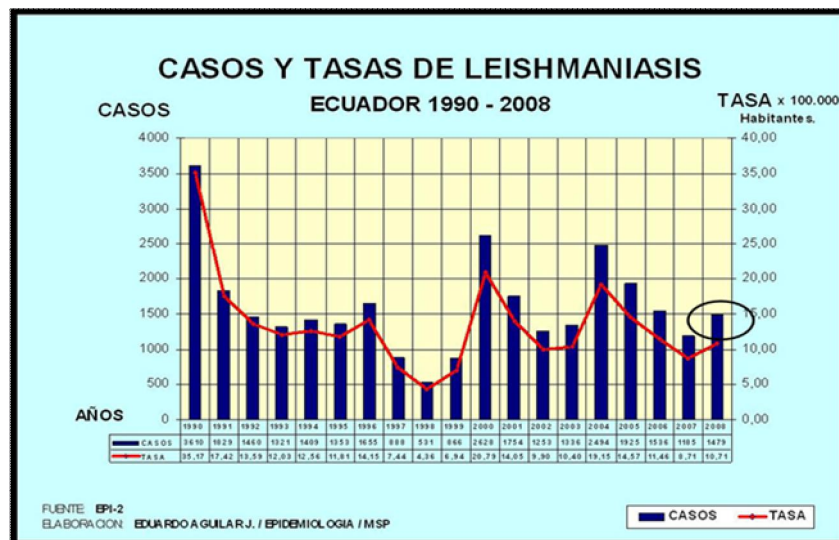


Ilustración 1.2 Tasas de incidencia anual de Leishmaniasis (Aguilar, 2008), Ministerio de Salud Pública

Las formas clínicas más comunes reportadas en el Ecuador son la Leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Siendo que por cada caso de leishmaniasis mucocutánea reportado, se registran tres casos de Leishmaniasis cutánea (Hashiguchi y Gómez 1991). La Leishmaniasis visceral es una parasitosis considerada hasta ahora, rara dentro de los países andinos (Colombia, Perú, Bolivia, Venezuela y Ecuador) en Ecuador y Bolivia sólo se reportaron casos ocasionales (Davies, 2000).

Nombres populares para esta enfermedad varían de región a región, en la costa se la conoce como *õsarna bravaö*, en la amazonia *õúlcerã bravaö*, para leishmaniasis cutánea, *õlepra de montañaö* y para leishmaniasis mucocutanea como *õnigua de ratónö* o *õgrano maloö* (Calvopina, 2004).

Siete especies de parásitos son responsables de las infecciones reportadas en el país: *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (V.) panamensis*, *Leishmania (V.) guyanensis*, *Leishmania (L.) mexicana*, *Leishmania mexicana pifanoi*, *Leishmania (L.) amazonensis*, y *Leishmania (V.) equatorensis* (Grimaldi, 1992).

1.4.2 Agente Causal

Leishmania es un protozoo flagelado del orden Kinetoplastida. Este orden también incluye a los tripanosomas que dan nombre a la familia a la que pertenecen; Trypanosomatidae (OMS, 1990).

Este parásito es digénico porque realiza parte de su ciclo biológico en el tubo digestivo del hospedador invertebrado en forma flagelada (promastigotes), en condiciones aeróbicas, con temperaturas de 25 - 27°C y pH 7 (Campos, 2008). En el vertebrado, dentro de las células del sistema retículo endotelial, sobre todo en los macrófagos el parásito se presenta en forma aflagelada (amastigote) y se mantiene a 37°C y pH 4-5 (Campos, 2008; Chang KP et al., 1985). Si la infección por

amastigotes no es controlada por los macrófagos, los parásitos se multiplican con sucesivas divisiones binarias (Antoine et al., 1990).

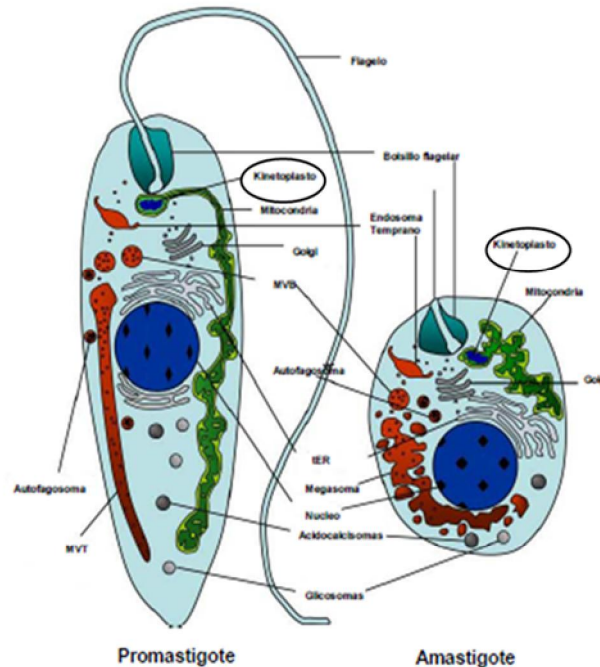


Ilustración 1.3 Representación de Leishmania en forma promastigote y amastigote (McConville et al., 2002)

Un vector parasitado ingurgita sangre de un vertebrado e incula con su saliva los parásitos (promastigotes metacíclicos). El parásito en el hospedador vertebrado, es fagocitado por el macrófago que lo engloba en una vacuola parasitófora para tratar de eliminarlo mediante metabolitos, entre los que destacan el óxido nítrico y la liberación de hidrolasas lisosomales que son vertidas en el espacio intravacuolar (Alvar, 2001). Sin embargo el parásito evade las reacciones inmunológicas inespecíficas del macrófago para sobrevivir y multiplicarse en su interior (Ortiz, 2005).

La leishmaniasis depende de la respuesta inmune y la virulencia del protozoo. Si sobreviven, los amastigotes en los macrófagos parasitados son ingurgitados por otro vector, en cuyo intestino se liberan y recuperan la forma flagelada. Después de

varios días, alcanzan la capacidad infectiva (metacicloogénesis), quedando dispuestos para ser inoculados. Con este cambio se cierra su ciclo vital (Ver Ilustración 1.4 (Moody SF, 1993).

La metacicloogénesis es un proceso que experimentan naturalmente los promastigotes de *Leishmania* en el tracto digestivo del insecto vector y consiste en una serie de cambios que conlleva la transformación de promastigotes no infectivos o poco infectivos (prociclicos) en promastigotes infectivos (metaciclicos) (Sacks, 1989) capaces de sobrevivir en el hospedero vertebrado (Muskus, 2002).

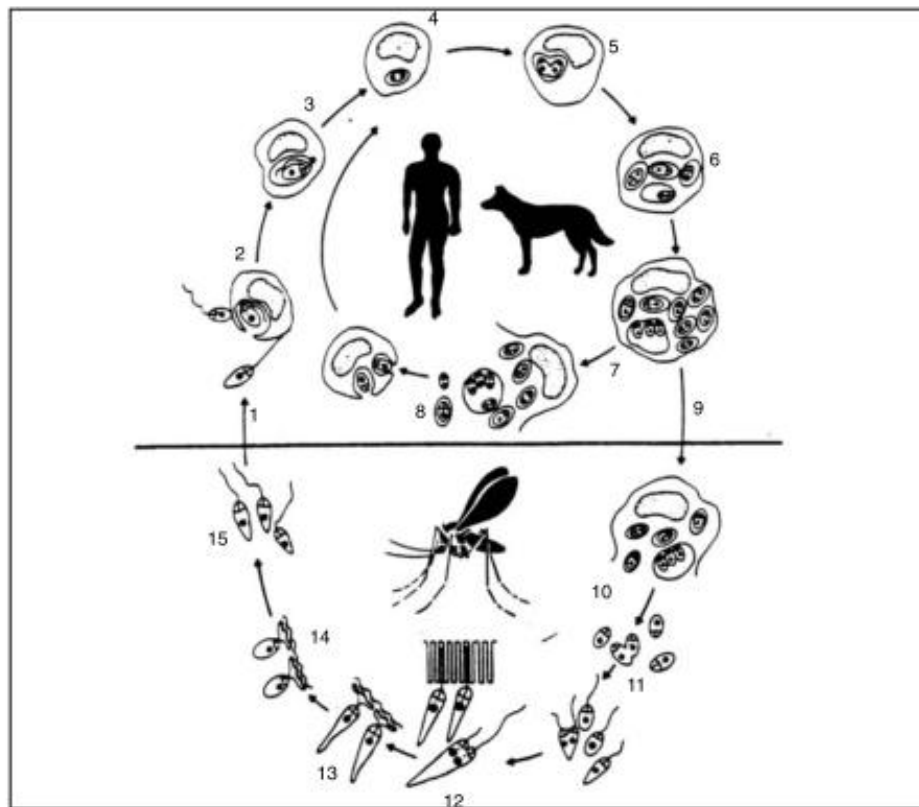


Ilustración 1.4 Ciclo de *Leishmania* en los hospedadores vertebrados e invertebrados (Chang, 1985)



Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

1.4.2.1 Clasificación del parásito

El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros, según la caracterización del desarrollo del parásito en el intestino de los vectores: El subgénero *Leishmania* se desarrolla en el intestino medio o anterior, y el sub género *Viannia*, en el intestino posterior, medio y anterior de los flebótomos (vector) (Bonfante, 2002). Morfológicamente las distintas especies de *Leishmania* no se pueden identificar, pero pueden diferenciarse por su composición, antígenos, patología y sensibilidad a fármacos (Grimaldi et al., 1989; Walton, 1989).

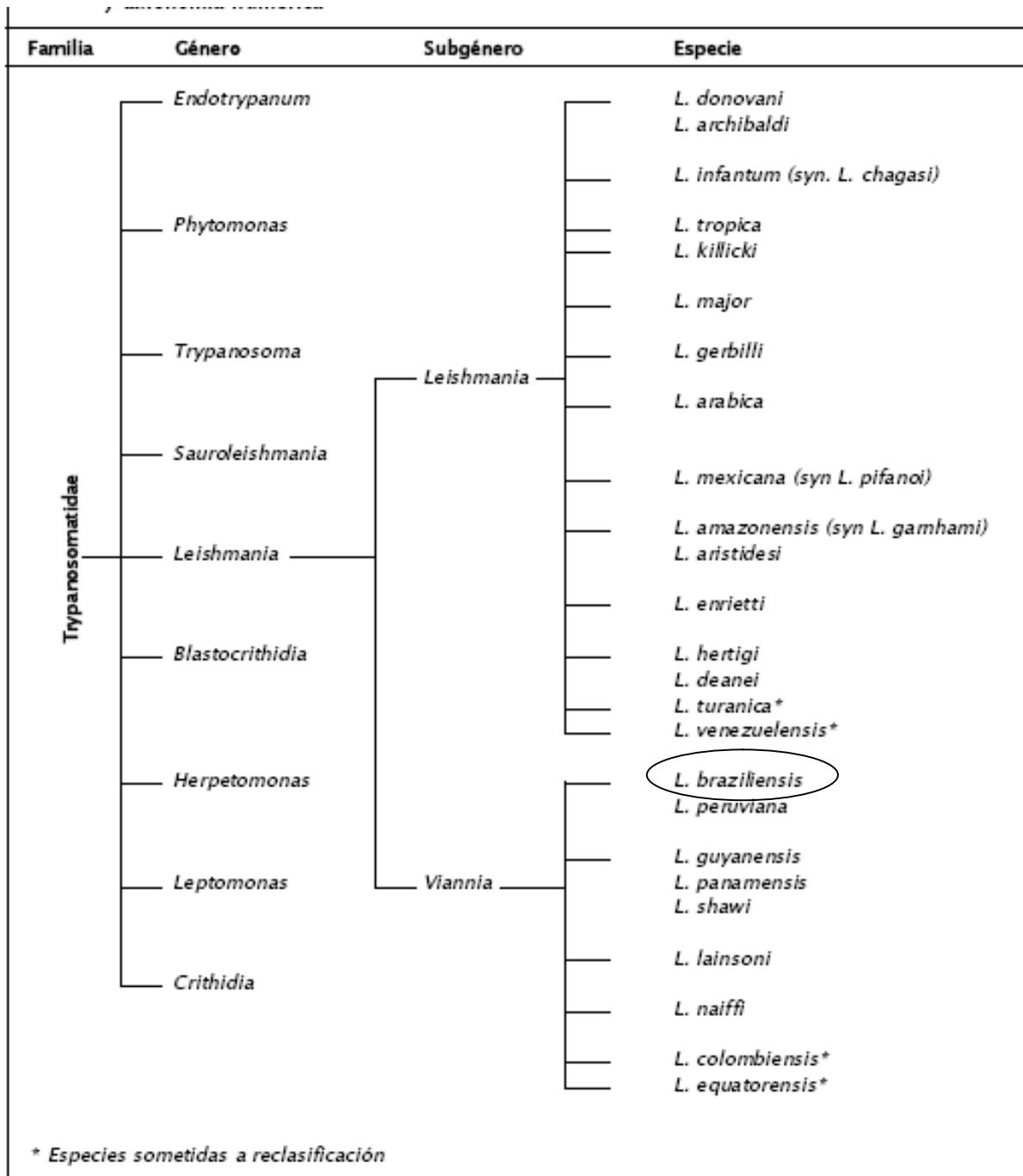


Ilustración 1.5 Clasificación de los parásitos del género *Leishmania* basada en caracteres intrínsecos (isoenzimas) y taxonomía numérica (Dedet, 1993)

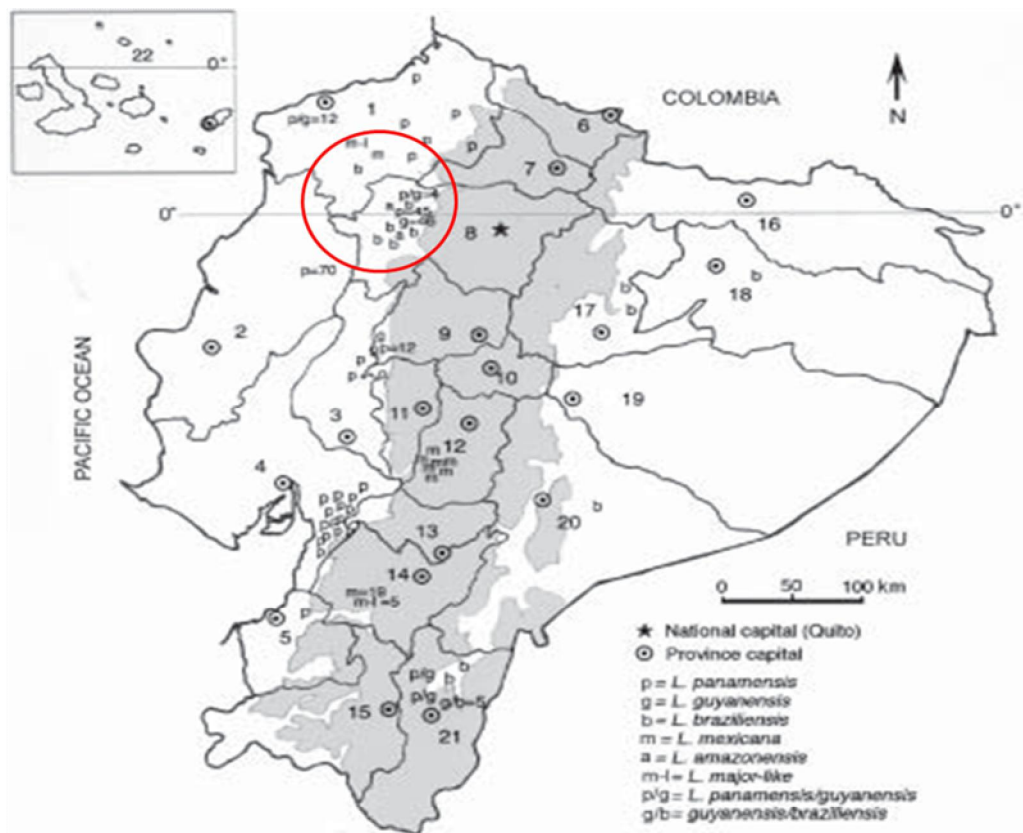


Ilustración 1.6 Distribución Geográfica de Cepas de *Leishmania* en el Ecuador (Calvopiña, 2004)

1.4.2.2 Biología Molecular y Bioquímica del parásito

Las especies del orden Kinetoplástica, presentan ciertas características que la diferencian del resto de organismos eucariotas. Una de las características celulares importantes es la presencia de un orgánulo característico denominado kinetoplasto en el que se concentra el DNA de la única mitocondria que poseen y se localiza cerca del cuerpo basal del flagelo (Feagin, 2000).

Está formado por maxicírculos y minicírculos que se enlazan entre sí para formar una red de DNA que representa el 10-15 % del DNA total del parásito. En los maxicírculos se encuentra el DNA que codifica RNAs ribosomales y transferentes,

además de proteínas mitocondriales como citocromosö (Simpson, 1987; Shapiro et al, 1995; Morris et al, 2001).

Otra de las características importantes es que el genoma de *Leishmania* tiene elevada plasticidad por lo que abundan los procesos de amplificación génica que se utilizan en caso de estrés como la exposición a fármacos (Campbell et al., 2003).

Algunos estudios metabólicos demuestran que los promastigotes de *Leishmania* utilizan como principal fuente de energía algunos aminoácidos y catabolizan la glucosa sólo al final de la fase exponencial y al principio de la fase estacionaria de crecimiento (Cazzulo et al., 1985). Este comportamiento se da como una adaptación del parásito a ambientes pobres en glucosa libre y ricos en proteínas como son el intestino del vector (Campos, 2008). En el caso de los amastigotes, estos tienen significativamente incrementada la β -oxidación de los ácidos grasos y consumen poca glucosa y aminoácidos, lo que sugiere que los ácidos grasos son su principal fuente de energía (Opperdoes, 1995).

1.4.3 Vector de transmisión

La leishmaniasis es transmitida por la picadura de flebótomos, pequeños insectos, la distribución de estas poblaciones de insectos es variada encontrándose desde zonas húmedas hasta zonas áridas y en altitudes comprendidas entre los 100 y 800 msnm, es decir desde valles hasta zonas elevadas semi montañosas (Carcelén, 2005). Los factores medio ambientales necesarios para el desarrollo del ciclo del vector son escasos, destacando entre ellos la necesidad de temperaturas entre 15 y 20°C en zonas protegidas de la luz solar directa con humedad moderada y abundante materia orgánica de origen animal y vegetal. Su periodo de actividad es variable dependiente de la climatología (Carcelén, 2005) (Ampuero, 2000).

Se reconocen cinco géneros de flebotomos: *Phlebotomus*, *Sergentomya*, *Lutzomyia*, *Warileya* y *Brumptomya*. Como vectores de *Leishmania* se describe a *Phlebotomus* en Europa, Asia y África y el género *Lutzomyia* en América (Ampuero, 2000).

Se han identificado 47 especies de flebotomos, las especies infectadas naturalmente por *Leishmania* son la *Lu. Trapidoi*, *Lu. Hartmani* y *Lu. Gomezzi* (Sánchez, MSP Bolivia, 2000). En la región de los andes específicamente, se encuentra a *Lu. Ayacuchensis* y *Lu. osornoi* (Takaoka et al., 1990). Para todas las regiones en el Ecuador el nombre común del vector es de *õmanta blancaö* o *õtiraö* (Ampuero, 2000; Calvopiña et al., 2004).

Algunos factores presentes en la saliva de los vectores parecen incrementar la infectividad de los promastigotes (Theodos, 1993).

1.4.4 Reservorio

Existe una gran variedad de animales silvestres y domésticos que son considerados como reservorios de las especies de *Leishmania* en América. Es evidente la relación ecológica estrecha que existe entre los vectores de un parásito y su animal reservorio (Sánchez-Saldaña, 2004).

La leishmaniasis puede ser zoonosis si el reservorio es animal o antroponosis si el reservorio es un humano, la mayoría corresponden al primer grupo por tanto las medidas de control difieren (Alvar, 2001).

Para que un animal sea considerado reservorio debe cumplir ciertas condiciones como la longevidad y un gran número de individuos para asegurar la fuente de alimentación para el vector. Un reservorio secundario se considera a aquel que cumpla parcialmente dichas características, se considera también que los reservorios principales son escasos mientras los secundarios son abundantes (Alvar, 2001).

Por regla general existe un ciclo selvático mantenido entre un reservorio salvaje y los vectores del entorno. Después el ciclo se aproxima al ámbito periférico doméstico para, finalmente arraigarse entre los animales y vectores domésticos (Alvar, 2001).

En las áreas andinas, se ha encontrado infectado de forma natural al perro doméstico (*Canis familiaris*), *Didelphys albiventis* y a una gran variedad de roedores, que incluye a la rata (*Rattus rattus*), entre otros. Se encontró en algunos estudios, que los parásitos aislados en infecciones humanas y en ratas pertenecían a la misma especie (Sánchez-Saldaña, 2004).

1.4.5 Infección por *Leishmania*

Las infecciones por *Leishmania* inducen tanto inmunidad humoral como celular; no obstante, la respuesta humoral tiene poca participación protectora (Torres, 2009). La inmunidad en la leishmaniasis depende de la manifestación clínica y la respuesta del hospedador. La inmunidad mediada por células tiene una influencia dominante en la determinación de la enfermedad (Díaz, 2002).

El curso de la leishmaniasis es complejo ya que la misma especie puede producir diferentes formas clínicas dependiendo de las interacciones parásito-hospedador, las cuales están genéticamente predeterminadas, muchas de ellas expresados en el complejo mayor de histocompatibilidad (Torres, 2009).

Después de ser inoculado en el hospedador, *Leishmania* ingresa en el macrófago mediante fagocitosis mediada por receptores, y se ha demostrado que tanto glicoproteínas asociadas a membranas como lípidos de la superficie del parásito están implicados en la adhesión de éste a la membrana plasmática del macrófago. (Henríquez y de Souza 2000).

Se asume que para su supervivencia, el parásito depende de la interacción de las tres membranas concéntricas presentes: la membrana plasmática del macrófago, la membrana de la vacuola parasitófora (fagolisosoma) y su membrana plasmática (Cortázar, 2006).

Las *Leishmanias* poseen estrategias complejas para atacar, infectar y sobrevivir dentro de los macrófagos. Algunas cepas pueden resistir la acción microbicida de los macrófagos activados y la caída de la respuesta inmunoprotectora del hospedador (Bonfante, 2002).

Las lesiones que curan espontáneamente están asociadas con una respuesta positiva de las células T antígeno específicas; las formas viscerales y cutáneas difusas, con una respuesta débil o ausente, y la forma muco cutánea, con una hiperrespuesta de las células T (Farah, 1999).

Los promastigotes también poseen un glicocalix que permite resistir la lisis por la actividad de las proteínas del complemento, esta resistencia es debida en parte a las moléculas de lipofosfoglicano (LPG) y metaloproteasa dependiente del zinc gp63 que se expresan en grandes cantidades en las membranas de los promastigotes (Spath, et al., 2000).

Sin embargo, la *Leishmania* se diferencian y se transforman en amastigotes que resisten a la agresión y se multiplican dentro de estas vacuolas hasta que los macrófagos infectados no pueden contener más parásitos y las células mueren liberando amastigotes que infectarán otras células (Sánchez-Saldaña, 2004). Los parásitos destruidos por los macrófagos liberan antígenos que son expresados en la membrana de los macrófagos y son presentados a los linfocitos T CD4+ *Leishmania* específicos. La actividad leishmanicida se debe al incremento de la capacidad de los macrófagos de producir oxígeno tóxico y radicales de nitrógeno en respuesta al interferón gamma (IFN- γ) (Sánchez-Saldaña, 2004).

Los macrófagos tienen una función esencial en el sistema inmune, como reguladores de la homeostasis y como células efectoras en infección (Orozco, 2003).

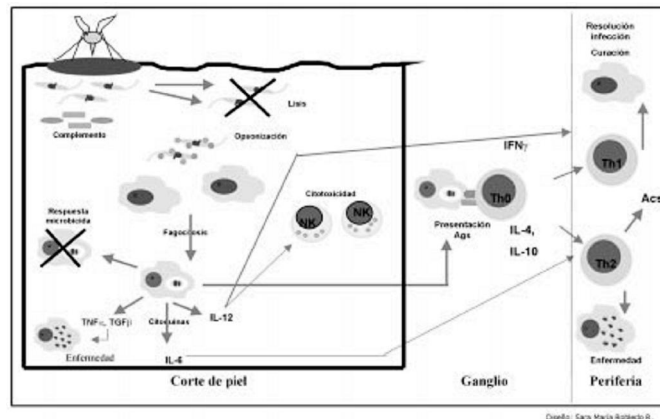


Ilustración 1.7 Mecanismos de respuesta inmune a *Leishmania spp.* El papel del complemento, la respuesta inflamatoria local y los macrófagos como células presentadoras de antígeno en la resolución de la infección o el desarrollo de la enfermedad (Agudelo, 2000).

La mayoría de las funciones de los macrófagos, incluyendo la destrucción de parásitos intracelulares y de células malignas in vitro, están incrementadas por la activación de citoquinas (Orozco, 2003). La respuesta específica de células T es la que se asocia con el control de la infección y la resolución de las lesiones (Castes, 1984).

Los análisis del perfil de citoquinas sugieren que la respuesta inmune del hospedador tiene un rol inmunorregulatorio en la expresión de la enfermedad. Así, en la leishmaniasis cutánea localizada, las principales citoquinas producidas son la IL-2 e IFN- γ y en la mucocutánea y la cutánea difusa, la IL-4 e IL-10 se reportan en concentraciones mayores (Sánchez-Saldaña, 2004).

El mecanismo de defensa dado por el sistema inmune frente a *Leishmania* es la activación de los macrófagos con IFN- γ derivado de las células T CD4+. La ausencia de IFN- γ se asocia con el desarrollo de leishmaniasis visceral y leishmaniasis cutánea difusa (Sánchez-Saldaña, 2004).

En leishmaniasis cutánea americana, los linfocitos T producen IFN- γ en respuesta a antígenos parasitarios y activan a los macrófagos para destruir al patógeno. Es posible que el desarrollo de la enfermedad dependa de la desregulación transitoria de la respuesta de las células T durante la fase inicial de la infección (Pearson, 1996).

1.4.5.1 Leishmaniasis Cutánea

La leishmaniasis cutánea presenta un espectro clínico determinado por características clínicas, histopatológicas e inmunológicas (Convit, 1993). Se puede hablar de un periodo de incubación de 2 a 3 semanas después de la picadura del insecto vector (Sánchez-Saldaña, 2004). En el polo inmunocompetente del espectro se ubica la forma localizada de la enfermedad (LCL) caracterizada por la presencia de una o pocas lesiones generalmente ulceradas. Por otro lado encontramos la forma anérgica o leishmaniasis cutánea difusa (LCD), caracterizada por múltiples lesiones de tipo pápulas, nódulos o placas que ocasionalmente se ulceran (Castro, 2003).

Los síntomas pueden durar meses hasta su curación espontánea, tras la cual, los pacientes adquieren una alta inmunidad (Glew *et al.*, 1988; Modabber, 1993).

Las lesiones causadas por *Leishmania (L.) mexicana* tienden a ser pequeñas y menos crónicas que las causadas por *Leishmania (V.) brasiliensis* que se presenta en formas ulcerosas (Pesce, 1995). La *Leishmania (V.) peruviana* presenta formas papulofoliculares y nodulares dérmicas (Sánchez-Saldaña, 2004).

1.4.5.2 Leishmaniasis cutánea localizada

Este tipo de parasitosis es producida en América por *parásitos* del subgénero *Vianna* y *Leishmania* y en el Viejo Mundo por *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica* (Dowlati, 1996). Generalmente afecta áreas del cuerpo expuestas a las picaduras de los mosquitos, incluyendo la cara, el cuello y las extremidades (Castro, 2003).

En América se presenta como una lesión primaria solitaria, mientras que en el Viejo Mundo se asocia más con múltiples lesiones primarias. Después del periodo de incubación de 1 semana a 3 meses, aparece una pápula, la cual crece hasta convertirse en un nódulo o una placa que evoluciona hacia una úlcera, con bordes infiltrados. En caso de existir infección bacteriana sobreagregada esta úlcera se torna dolorosa pudiendo simular muchas enfermedades dermatológicas (Convit, 1993).

1.4.5.3 Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD)

Se presenta como casos aislados en América latina sobre todo en Venezuela, Republica Dominicana, Brasil, México, Bolivia, Colombia y Perú; además en Estados Unidos y África (Franke, 1990). En América esta forma clínica, es producida por *L. (V) amazonensis* aunque existen casos descritos de LCD producida por *L. (V.) braziliensis*; en el viejo mundo el agente causal es *L. aethiopica* (Grevelink, 1996). Es una presentación poco común de leishmaniasis que se caracteriza por una falta de respuesta inmune mediada por células y por la gran producción de anticuerpos séricos no protectores (Castro, 2003).

Su presentación clínica se caracteriza por la aparición de pápulas, placas o nódulos eritomatosos o de color piel que generalmente están en áreas localizadas, estas lesiones pueden ser simétricas o asimétricas y casi siempre limitadas a miembros

superiores o inferiores (Rondón, 1993). Las lesiones no se ulceran a menos que sufran traumatismos. En otros casos aparece una lesión tipo úlcera que, posterior a una completa cicatrización, presenta recaída con aparición de nódulos en el borde de la cicatriz y a distancia de la misma. (Convit, 1958). En etapas avanzadas es frecuente la invasión a mucosas nasales pero sin reacción inflamatoria severa (Rondon, 1993). La respuesta inmune contra la leishmaniasis intradérmica es negativa, excepto en raras ocasiones donde se negativiza después de un período de tiempo. Los títulos séricos de anticuerpos anti-*Leishmania* son muy altos y tienden a disminuir con el tratamiento (Rondón, 1993).

1.4.5.4 Leishmaniasis muco-cutánea

Después de uno o dos años de la resolución de una leishmaniasis cutánea inicial, en estudios descritos por Tejada, se encontró que el 48.8% presentaba manifestaciones mucosas (Sánchez- Saldaña, 2004).

Después de meses o años de una lesión cutánea, los parásitos invaden la nasofaringe por vía linfática en un proceso metastásico. Se forman lesiones nodulares que evolucionan a úlceras llegando a perforar el tabique nasal, deformando la nariz. Esta manifestación clínica se conoce como ñariz de tapirö. Otras veces la lesión mucosa empieza en el paladar blando con una posterior destrucción de la úvula (Iñiguez, 2004).

Los casos de leishmaniasis mucocutanea pueden tener desenlaces fatales si existe una infección bacteriana sobreañadida o una obstrucción nasogástrica (Glew et al., 1988; Modabber, 1993).

1.4.5.5 Leishmaniasis visceral o Kala-azar:

Se caracteriza por la presencia de fiebre acompañada de hepatomegalia, esplenomegalia, pérdida de peso, inflamación de ganglios linfáticos y pérdida de pelo. Es producida principalmente por *L. donovani* y *L. infantum* (*L. chagasi* en América). Es una manifestación mortal en el 90% de los casos no tratados (Glew et al., 1988; Modabber, 1993).

1.4.6 Respuesta inmunológica

Los macrófagos juegan un papel muy importante en la defensa del hospedador contra la invasión de una amplia variedad de agentes patógenos, que incluyen bacterias, virus, hongos y protozoos. Se trasladan hacia ellos guiados por un gradiente de moléculas quimiotácticas que secretan los microorganismos. Después de la fagocitosis, vía por la que leishmania entra en el macrófago, está mediada por receptores y se ha demostrado que tanto glicoproteínas asociadas a membrana con lípidos de la superficie del parásito están implicados en la adhesión de este a la membrana plasmática del macrófago (Henriques y De Souza, 2000). Sin embargo, existen ciertos patógenos intracelulares que pueden replicarse dentro de esta célula, entre los que se enlista a *Listeria monocytogenes*, *Salmonella*, *Mycobacterias*, *Toxoplasma*, o *Leishmania* (Nathan et al, 1980).

Los amastigotes son más resistentes que los promastigotes a los mecanismos antimicrobianos inducidos por citoquinas dependientes del oxígeno, lo que refleja una adaptación al crecimiento intracelular (Hall, 1991).

Los macrófagos tienen propiedades fagocíticas, presentación de antígenos y activación de las células T, así como una extensa capacidad secretora. (Nathan, 1987). De los productos de secreción de los macrófagos, hay que destacar las

citoquinas por su importancia en el control y en la especificidad de la respuesta inmune (Orozco, 2003).

Las citoquinas de mayor importancia son IFN- γ , IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12, TNF- α , TNF- β , IFN- α , IFN- β , PDGF, TGF- β , GM-CSF, M-CSF, y el inhibidor de IL-1 (Adams y Hamilton, 1988; Fairchild and Moorhead, 1985).

IL-4 e IL-10 son producidas por las células Th2, y contribuyen a la progresión de la infección, favoreciendo el desarrollo de esta sub población celular. Además, pueden actuar directamente sobre el macrófago impidiendo su activación (Chávez, 2002).

La IL-10 en el macrófago da lugar a una disminución de la expresión del Complejo mayor de histocompatibilidad II (MHC II, por sus siglas en inglés), reduce la endocitosis e inhibe la producción de las citoquinas proinflamatorias y la generación de óxido nítrico (Orozco, 2003). Datos recientes sugieren también que la ausencia de IL-4 puede evitar la respuesta Th2 (Guler *et al.*, 1996).

Las células T citotóxicas producen IFN- γ y TNF- α (Fong y Mosmann, 1990; Muller *et al.*, 1994), importantes en la activación de los macrófagos para la destrucción de *Leishmania* (Liew y Dhaliwal, 1987; Liew *et al.*, 1990).

1.4.7 Antimoniatos Pentavalentes

El tratamiento de primera línea para tratar la leishmaniasis son las sales de antimonio pentavalente (Sb^V) que se presentan como stibogluconato de sodio (Pentostan[®]) y antimoniato de meglumine (Glucantime[®]). El primero contiene 100 mg Sb/ml y el segundo 85 mg Sb/ml. El mecanismo de acción del fármaco se basa en la inhibición de la glicolisis y la beta-oxidación de ácidos grasos en el metabolismo del parásito, provocando una disminución en la generación de ATP y GTP (Tracy, 2001).

El antimonato se presenta como un pro fármaco que genera la reducción del Sb^V a Sb^{III} que es más eficaz (Roberts et al., 1995). Antimonio pentavalente es mejor tolerado que antimonio trivalente, aunque estudios recientes describen los mismos efectos secundarios de Sb^V (Chulay et al., 1995).

En un estudio comparativo los parámetros farmacocinéticos de las dos valencias de antimonio (pentavalente y trivalente), presentan una conversión sistémica de pentavalente hacia trivalente de 23,62% a las 24 horas (Vásquez de Ricciardi, 2008). Tal reducción surge preferentemente en la etapa de amastigote, recientemente se identificó una enzima, la reductasa de As^V con capacidad de reducir Sb^V a la forma Sb^{III} . La sobre expresión de dicha enzima en los promastigotes incrementó su sensibilidad a los fármacos (Zhou et al., 2004).

La forma trivalente de antimonio constituye la forma activa de la droga contra los parásitos (Maharjan et al., 2008).

La dosis recomendada es de 20 mg Sb/kg de peso/día por vía intravenosa (I.V.) o intramuscular (I.M.) La duración del tratamiento depende de la forma clínica a tratar; generalmente el antimonato es administrado por 20 días con una eficiencia en la resolución de la enfermedad del 90 al 95% (Berman, 1996).

Presentan una fase de absorción inicial con una vida media de absorción en promedio de 0,85 horas, una fase de eliminación rápida con una vida media de 2,02 horas, seguida de una fase de eliminación terminal más lenta con una vida media en promedio de 76 horas. Esta fase podría relacionarse con la reducción del antimonial referida anteriormente; estos parámetros farmacocinéticos son similares cuando se administran por vía intravenosa o intramuscular (Chulay, 1988).

A pesar de su efectividad y su administración por más de 60 años los efectos secundarios y la aparición de cepas resistentes limitan y restringen su uso. Las reacciones adversas incluyen síntomas como dolor en el sitio de la inyección,

síntomas gastrointestinales, mialgias, dolores articulares y trastornos electrocardiográficos que aunque son reversibles pueden causar arritmias graves (Hepburn, et al., 1994; Phillips, et al., 2006). Puede observarse aumento de las transaminasas y hay casos reportados de pancreatitis, neumonitis y toxicidad renal (Berman, 1996; Sampaio, 1985; Veiga, 1983). Estos efectos se relacionan con la dosis, y duración del tratamiento (Serenio, et al., 1998).

En caso de resistencia o de efectos colaterales severos a los antimoniales, como drogas de segunda línea se recomienda la utilización de otros medicamentos sistémicos como la anfotericina B, licochalcone A, miconazol, isoniazida, dapsona, rifampicina, plantas medicinales, trimetoprim sulfametoxazol, e INF- γ . También se han experimentado varias formas de tratamiento local, a saber: curetaje, rayos láser, criocirugía, termoterapia, cirugía, entre otros (Torres, 1999).

La terapia clásica contra leishmaniasis presenta tres dificultades: 1. Escasez y alto costo de las drogas. 2. Elevada toxicidad y 3. Grandes diferencias en la respuesta individual. Además depende de la especie de parásito y sobre todo del estado inmunológico del hospedador (Grimaldi, 1989).

Se han descrito diversos mecanismos que explican la resistencia entre los que se menciona 1) disminución de la reducción de Sb^V a Sb^{III} ; 2) Reducción en la expresión de la aquagliceroporina, proteína responsable de la entrada de Sb^{III} ; 3) el secuestro intracelular del Sb^{III} ; 4) el eflujo de Sb^{III} , entre otras (Mittal et al., 2007; (Ashutosh et al., 2007; Singh, 2006).

1.4.8 Nanoemulsión

Recientemente se ha explorado la aplicación de la nanotecnología en el área médica especialmente en el desarrollo de sistemas que faciliten la administración de drogas.

Los nuevos sistemas de transporte y liberación de fármacos desarrollados permiten controlar la absorción, las concentraciones plasmáticas, el metabolismo, la distribución tisular y la captación celular de agentes farmacológicamente activos (Juliano, 1980).

La nanotecnología se define como: ñel diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales, aparatos y sistemas funcionales a través del control de la materia, la explotación de fenómenos y propiedades de la materia a nanoescalañ (Paz, 2007). Los materiales tienen propiedades únicas incluyendo su tamaño entre 1 y 100 nm, gran superficie, alta reactividad e interacciones únicas con sistemas biológicos (Zhang, et al, 2008).

Las nanosuspensiones son diferentes de las nanopartículas dado que estas últimas son generalmente transportadores poliméricos coloidales de la droga. Las nanopartículas sólidas lipídicas son transportadores lipídicos de los fármacos; en las nanosuspensiones las drogas son mantenidas en estado cristalino con partículas de tamaño reducido mejorando la biodisponibilidad de la medicina por un efecto de disolución (Chingunpituk, 2007).

Las ventajas de la administración de fármacos basados en nanopartículas incluyen la capacidad para proteger la molécula encapsulada frente a su eventual degradación; la facultad de atravesar barreras biológicas como la piel, las mucosas gastrointestinal o respiratoria, la barrera hematoencefálica, la posibilidad de alcanzar el órgano, tejido o grupo celular diana donde la molécula debe ejercer su acción; la capacidad para alcanzar compartimentos intracelulares y controlar la liberación de la molécula activa en su lugar de acción o absorción (Irache, 2008).

Algunos tipos de nanopartículas como liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas lipídicas y dendrímeros han sido ampliamente investigados como plataformas para el suministro de medicamentos mejorando la

farmacocinética y el índice terapéutico comparado con el de la droga libre (Zhang, 2010). Las formulaciones en emulsiones son una alternativa atractiva como sistemas de entrega de medicamentos poco solubles en agua como Palitaxel y Difluprednate (Yamaguchi, 2005; Tiwari, 2006). Nikolosy probó satisfactoriamente nanoemulsiones de aspirina en modelo animal con ratones sugiriendo éste como un método posible para reducir efectos adversos asociados con altas dosis de aspirina. Las nanopartículas incluyen a los liposomas, las nanopartículas poliméricas, las nanopartículas solidas lipídicas y dendrimeros y son utilizadas de acuerdo a su modo de acción (Ilustración 1.8) (Zhang, 2010).

Los liposomas son vesículas esféricas de bicapa lipídica con estructuras de membrana formada por moléculas de lípidos anfifílicos (Zhang, 2006). La aplicación de liposomas como transporte de drogas es reconocida y probada en la práctica (Bangham, 1983). AmBisome (Farmacia Nexstar, San Dimas, EE.UU.) y formulación liposómica de anfotericina B (AMB), ha sido ampliamente utilizado en el tratamiento de *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, y para el tratamiento de leishmaniasis (Walsh, et al., 2001) productos como DaunoXomeTM, y PevarylTM-Lipogel, liposomas con rutas principales de administración parenteral y tópica (Jores, 2004).

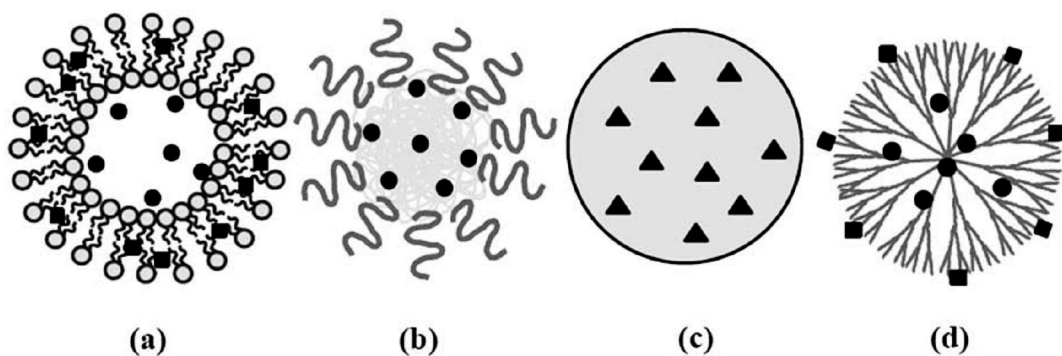


Ilustración 1.8 Figura esquemática de formas diferentes de nano partículas para el desarrollo de drogas, (a) liposoma, (b) nanopartícula polimérica, (c) nanopartícula solida lipídica, (d) dendrimero. Círculos negros representan drogas hidrofóbicas; cuadrados negros representan drogas hidrofílicas; y triángulos negros representan otras drogas hidrofóbicas o hidrolíticas.

Los liposomas tienen alta capacidad de carga, pero pueden liberar el fármaco muy rápido o retenerlo fuertemente, los liposomas son capturados fácilmente por el retículo endoplasmático como ocurre con las nanopartículas después de una administración intravenosa (i.v.), por lo que, un sistema de transporte ideal a menudo es necesario en este modo de administración (Madrigal-Carballo, 2007).

Las emulsiones son sistemas heterogéneos compuestos de dos fases líquidas inmiscibles, una de las cuales está dispersa en la otra (Becher, 1972), y cuya estructura es estabilizada por un agente surfactante (emulsionante). En la mayoría de los casos en los cuales se hace una emulsión con dos líquidos inmiscibles, uno de los líquidos es una fase acuosa y el otro una fase aceite (Hernández, 2004). La obtención de emulsiones finas y estables es, entre otros, uno de los objetivos de la formulación de sistemas surfactante-aceite-agua. Estas emulsiones llamadas miniemulsiones o nanoemulsiones se caracterizan por tener un pequeño tamaño de gota (50-500nm), apariencia translúcida y alta estabilidad cinética; debido a esto, son sistemas que tienen una diversidad de aplicaciones en la industria química, farmacéutica, alimenticia y cosmética (Hernández, 2004).

Existen diferentes tipos de emulsiones dependiendo de cómo se encuentra el agua o aceite en el sistema disperso pueden ser simples, donde la fase acuosa contiene gotas de aceite o gotas de agua en aceite, las hay también emulsiones múltiples que se trata de un sistema combinado de emulsiones simples y por último puede existir también las biemulsiones que contienen dos fases internas diferentes que puede variar en el tamaño y naturaleza (Hernández, 2004).

1.4.9 Nanoemulsión de antimonioato de meglumine

La nanoemulsión se define como una emulsión de aceite en agua o agua en aceite, su preparación se lleva a cabo en un homogenizador convencional de alta velocidad (por ejemplo: Microfluidizer® Processor). El tamaño de las partículas debe ser menor o igual a 100nm (Janjic, 2008). Las nanoemulsiones son termoestables y tolera un rango amplio de pH (2.0 a 8) (Nicolosi, 2008).

Pero en los últimos años se ha hecho evidente que el desarrollo de nuevos fármacos por sí solo no es suficiente para asegurar el progreso en la terapia de drogas.

Las nanopartículas utilizadas como plataformas inmunoterapéuticas son atractivas por varias razones, estos sistemas pueden encapsular el compuesto bioactivo de alta densidad que puede estimular la inmunidad contra la infección, estos sistemas pueden ser fabricados de materiales que pueden realzar la encapsulación de compuestos que pueden durar más tiempo como días o meses y finalmente por que estos sistemas pueden ser modelados de forma extensiva para mejorar la actividad biológica o el transporte del mismo en células y órganos dentro del cuerpo (Look, 2009). Un adicional a estas razones es que el encapsulamiento en nanopartículas mejora la estabilidad durante el transporte (Holzer, 2009) además de la biodistribución después de la administración (Kleemann, 2005).

2 MATERIALES Y METODOS

2.1 Colaboradores

La investigación se realizó con el apoyo de Manuel Baldeón MD. Ph.D. como Director del Proyecto "Nueva estrategia terapéutica basada en nanotecnología contra Leishmaniasis cutánea en Ecuador" desarrollado en la Universidad San Francisco de Quito, y con financiamiento de dicha institución.

Se contó también con la colaboración de Fernanda Loayza MSc. Colaboración técnica y la experiencia científica de Ángel Guevara Ph. D. y Marcelo Grijalva MD. Ph. D., docentes de la Facultad de Biotecnología de la Escuela politécnica del Ejército.

Se contó con el apoyo del Laboratorio de Diagnostico Molecular y Citogenética DISERLAB, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, en la Persona de la Ing. Cecilia Cruz, así también de Renato León Ph.D en el Laboratorio de Entomología de la Universidad San Francisco.

2.2 Zona de Estudio

Esta investigación se llevo a cabo en el Laboratorio de Inmunología del Colegio de Ciencias de la Salud de la Universidad San Francisco, que se encuentra en Cumbayá en el Hospital de los Valles.

2.3 Periodo de Investigación

La investigación se realizo en un periodo de 12 meses, iniciándose en el mes de julio del 2009 y finalizándose en Octubre 2010

2.4 Diseño

El Diseño es Factorial con un modelo Lineal General de un factor univariante con prueba de Tukey.

2.5 Procedimientos

2.5.1 Parásitos

Gracias a la gentil colaboración del Instituto de Enfermedades Tropicales de la Universidad Cayetano Heredia de Perú, en nombre del Dr. Jorge Arévalo, se utilizó las cepa, *Leishmania (V) braziliensis*, MHOM/BR/75/M2903 (M2903).

2.5.2 Cultivo de Parásitos

El parásito se mantuvo en fase móvil (promastigotes) en medio bifásico de cultivo Ushmaru (sangre desfibrinada de conejo al 15% suplementada con 18 ul de Gentamicina a una concentración de 40 mg/ml y PBS -Dulbecco's Phosphate-Buffered Saline; Mediatech, Inc Manassas, VA 20109 Cellgro). Debe ajustarse el pH a 7.2. Se realizó pases sucesivos en medio fresco cada 7 días, es posible mantener las cepas de leishmania en medio líquido BHI (Bacto Brain Heart Infusion; Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD 21152) suplementado con hemina (Hemin Chloride; CALBIOCHEM, EMD Biosciences, Inc. La Jolla, CA 92039-2087).

Para los experimentos de infección se utilizaron promastigotes metacíclicos obtenidos al séptimo día de cultivo. Esta fase del ciclo de vida del parásito es la etapa infectiva; (Ramtin, 2006). Para el desarrollo de amastigotes axénicos, los parásitos se cultivaron a 37°C en una atmosfera del 5% CO₂ y humedad de 90% en medio MAA/20 descrito en la metodología de Sereno (1997).

2.5.3 Cultivo de Macrófagos Peritoneales

Los experimentos de infección y susceptibilidad se realizaron en macrófagos peritoneales (Mø) de ratón (*Mus musculus*) de la cepa Balb/c, (susceptibles a infección por Leishmania (Nicolas, 2002)). Los ratones Balb/c fueron inyectados intraperitonealmente con 3ml de tioglicolato al 3% (DIFCO Laboratories, Detroit MI 448232-7058 USA). Después de 72 horas los Mø fueron recolectados por lavado peritoneal usando 7ml de RPMI-1640 (SIGMA- ALDRICH, Inc, 3050, St. Louis, 026K83582) (Lira, 1999). Las células una vez aisladas, se contaron en cámara de Neubauer y se sembraron en placas de cultivo celular de 6 pocillos (CELLSTAR, Greiner Bioóone) en los que previamente se colocó un cubreobjetos estéril por

pocillo para ser removidos posteriormente. La concentración de las células inoculadas por pocillo fue 7×10^5 con 3mL de RPMI-1640 (GIBCO, Invitrogen, USA). El RPMI-1640 fue suplementado con 10% de suero fetal bovino, bicarbonato de sodio y una fórmula antibiótica antes descrita (Young-Ki, 2007). Los macrófagos se cultivaron por 24h a 37° C en una atmósfera del 5% CO₂ y humedad del 90% en una incubadora (Thermo Scientific, REVCO).

2.5.4 Cultivo de macrófagos RAW 264,7

El cultivo de la línea celular macrófagos Raw 264,7, se mantuvo en medio RPMI-1640 suplementado como se mencionó en el punto 2.5.3. Para subcultivar, las células fueron levantadas con la ayuda de un scraper en 10 ml de medio de cultivo, posteriormente se contaron en cámara Neubauer y se sembraron en placas del cultivo de 8 cm² de área para mantener la línea. Por otro lado también se cultivó estas células en placas de 6 pocillos (CELLSTAR, Greiner Bioóone) para trabajar en el análisis de expresión de genes en la extracción de RNA.

2.5.5 Infección de macrófagos ó promastigotes de *Leishmania*

Después de 24 horas, las placas de cultivo celular fueron lavadas con RPMI- 1640 para retirar células libres y se infectaron con promastigotes metacíclicos, en una relación 4:1 (parásitos/macrófagos). Para determinar el tiempo de infección óptimo, se realizó una curva de infección exponiendo los Mø a los parásitos entre 1 a 5 horas, el ensayo se realizó por duplicado.

La nanoemulsión de antimonio de meglumine utilizada para este estudio está preparada con los componentes en la Tabla 2.1 (Nicolosi, 2008). Usando un Microfluidizer Processor-Model M-110EH (Microfluidics Newton, MA).

Tabla 2.1 Composición de Nanoemulsión de Antimonio de meglumine

INGREDIENTES	FUNCIÓN	CANTIDAD
Soybean	Lípidos	5 gramos
Polysorbate 80	Emulsificador	5 gramos

2.5.6 Tratamientos

A los cultivos de Mø infectados se aplicó los siguientes tratamientos: Tratamiento 1 (T1) = antimonio de meglumine; Tratamiento 2 (T2) = Nanoemulsión de antimonio de meglumine; Tratamiento 3 (T3) = Nanoemulsión vacía sin Glucantime y Control sin tratamiento (T4). Las dosis del fármaco utilizadas con o sin nano-emulsión fueron de 50, 100, 150, y 300 ug/ml de antimonio pentavalente (Sb^v) (Eliane de Moraes, 2008). En el caso de la nano-emulsión vacía, solamente se aplicó el volumen correspondiente de las dosis de Nanoemulsión con antimonio de meglumine.

2.5.7 Determinación de la carga parasitaria

2.5.7.1 Amastigotes intracelulares en placa

El número de amastigotes de células infectadas se determinó utilizando tinción con Giemsa: Wrigth (QUIMEDICAL). Las placas cubre objetos con Mø infectados se fijaron con metanol puro, durante 5 segundos colorearon, dejando secar al ambiente, se utilizó Euparal como medio de montaje. Las muestras se observaron en microscopio óptico de luz, bajo lente de 100X. La lectura de las células fue realizada por un investigador ciego a los tratamientos de cada una de las placas, se contó el número de amastigotes intracelulares en 100 células infectadas por placa (Barroso, 2007; Roy, 2000). El porcentaje de inhibición se calculó con la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de Inhibición} = \frac{\text{Control} - \text{Muestra}}{\text{Control}} * 100$$

2.5.7.2 Viabilidad de parásitos - MTT

Los métodos colorimétricos son utilizados para determinar el número de células vivas presentes en los cultivos. Se basan en la reducción de la sal 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium bromide, (MTT) (TCI America, Tokyo Chemical Industry; Tokyo, Japan), realizada por las deshidrogenasas mitocondriales de las células viables formando cristales de formazan, el número de células vivas presentes en los cultivos (Mossman, 1983; Cole, 1986; Berg et al., 1994).

La viabilidad de amastigotes y promastigotes después del tratamiento se realizó por medio de un ensayo colorimétrico MTT a 570 nm. . El ensayo muestra una relación directa entre el número de células viables y la absorbancia medida. . Tanto los amastigotes cultivados como los aislados de Mø infectados se colocaron en una

placa para ELISA de 96 pocillos en triplicado (CELLSTAR, Greiner Bioóone). Se incubó por 24 horas en 100 μ l de RPMI-1640 suplementado en una atmósfera de 5% de CO₂ y 90% de humedad. Subsecuentemente se añadió 10 μ l de MTT (10mg/ml) por 3 horas y se detuvo la reacción con 100 μ l de solución STOP (10% SDS en 50% de isopropanol) (Serenó, 1996). La lectura se realizó dentro de las 2 horas posteriores en un lector semiautomático (DYNEX MRX Revelation). Los amastigotes liberados de macrófagos infectados se obtuvieron por centrifugaciones repetidas a 3000 rpm para romper los macrófagos y liberar los amastigotes. El porcentaje de viabilidad celular se calculó en la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de viabilidad: } \frac{\text{Abs muestra}}{\text{Abs control}} * 100$$

2.5.7.3 Determinación de Carga Parasitaria por PCR en Tiempo Real.

Con el propósito de evaluar la carga parasitaria se empleó una técnica de PCR en tiempo real (qPCR) basada en la amplificación del DNA del kinetoplasto del minicirculo de promastigotes de leishmania, método específico para detectar y cuantificar *Leishmania (V) braziliensis*, de cultivos de macrófagos infectados con promastigotes del parásito; se utilizó FastStart DNA Master SYBR Green (Roche Diagnostics), lo que permite un rápido ciclo de PCR y el seguimiento de la incorporación del tinte fluorescente SYBR verde I en la cadena doble del DNA en el instrumento LightCycler® (Roche Diagnostics) (Nicolas, 2002).

La extracción de DNA se llevó a cabo bajo los procedimientos descritos en el set de reactivos comercialmente distribuido (High Pure PCR Template Preparation Kit;

Roche) y fueron almacenadas a -20° C hasta su procesamiento. Para el ensayo se prepararon reacciones en un volumen final de 20ul con 5ul de DNA extraído y diluido a una concentración de 1ug/μL. Los ciclos de amplificación se explican en la Tabla 2.2. Para la determinación de las curvas de calibración fue necesario el establecimiento de muestras con un número ascendente determinado de parásitos correspondientes a concentraciones variables de DNA de leishmanias (Mary, 2004).

Tabla 2.2 Condiciones para LightCycler para PCR - Tiempo Real

Análisis	Ciclos	Proceso	Temperatura	Time	Modo de Adquisición
Pre-incubation					
None	1		95°	10 min	None
Amplification					
Quantification	45	Denaturation	95 °	10s	None
		Annealing	56 °	20 ul 5s	None
		Extension	72 °	4.8 s	Single
Melting Curve					
Melting Curves	1	Denaturation	95 °	0s	None
		Annealing	65 °	60s	None
		Melting	95 °	0s	Continuous
Cooling					
None	1		40 °	30s	None

*Modificado del Inserto de LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I para el Análisis de DNA de Leishmania con primers JW11 y JW12.

2.5.8 Primers

Para la detección de DNA de *Leishmania* se utilizaron los primers (Forward, 5'-CCTATTTTACACCAACCCCAAGT-3' 10303 [JW11]; revers, 5'GGGTAGGGGCGTTCTGCGAAA-3' [JW12]) que amplifican un fragmento de 120bp de los minicírculos del kinetoplasto (kDNA) del parásito (Nicolas, 2002). Los primers fueron provistos comercialmente (Roche Diagnostics).

2.5.9 Expresión de citoquinas

Se evaluó la expresión de IL-10, IL-12, IFN- γ , iNOS, TNF- α y GAPDH como control positivo, mediante Reacción de Cadena de Polimerasa con transcripción reversa (RT-PCR) a partir de mRNA de macrófagos infectados y tratados. Para este método la extracción de RNA se realizó con TRIZOL (INVITROGEN) (Nagajyothi, 2008). Las muestras de RNA fueron almacenadas a -80°C y tratadas con DNAsa I (INVITROGEN) para eliminar contaminación con DNA. La RT-PCR se realizó usando el Kit Superscrip II One Step with Platinum *Taq* (INVITROGEN), de acuerdo a las instrucciones del inserto. El cDNA obtenido, se utilizó para análisis de PCR con los primers correspondientes a cada interleuquina (Tabla 2.3) (Giulietti, et al. 2001; Overbergh L, 2003). La separación de los productos de PCR se logró por electroforesis en gel al 2% y su cuantificación por análisis densitométrico usando TotalLabQuant.

Tabla 2.3 Secuencias de sondas y primers para interleuquinas de ratón

Interleuquina		Secuencia (5'→3')	Tamaño (bp)
iNOS	Rv	CATTGGAAGTGAAGCGTTTCG	95
	Fw	CAGCTGGGCTGTACAAACCTT	
INF-γ	Rv	TGGCTCTGCAGGATTTTCATG	92
	Fw	TCAAGTGGCATAGATGTGGAAGAA	
GAPDH	Rv	GCTAAGCAGTTGGTGGTGCA	168
	Fw	TCACCACCATGGAGAAGGC	
IL-10	Rv	ACCTGCTCCACTGCCTTGCT	191
	Fw	GGTTGCCAAGCCTTATCGGA	



2.6 Análisis de Datos

Los datos obtenidos fueron analizados según el diseño factorial, utilizando el programa estadístico SPSS Vs 15.00. Las herramientas estadísticas utilizadas fueron la prueba de Tukey al 0.05 de probabilidad para la separación de promedios y determinación de la diferencia estadística entre tratamientos.

CAPITULO 3

3 RESULTADOS

3.1 Efecto de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine en cultivos de *Leishmania*

Con el propósito de evaluar el efecto antileishmanicida de la Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine se administró el fármaco en cultivos de promastigotes y amastigotes, en diferentes dosis de tratamiento (Ver Materiales y Métodos).

Los datos se expresaron como el porcentaje de viabilidad que se estimó dividiendo la absorbancia obtenida de los pocillos con parásitos con los diferentes tratamientos para la absorbancia de los parásitos control (sin tratamiento). Los datos muestran que dosis crecientes de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine disminuyeron significativamente la viabilidad de promastigotes de *leishmania* y esta disminución fue dosis dependiente. La estimación del IC_{50} para Nanoemulsión con Antimoniato de meglumine es de 148ug/ml de Sb^V . El tratamiento de Antimoniato de meglumine solo no produjo ningún efecto en la viabilidad en promastigotes de *leishmania*. El porcentaje de viabilidad a 300ug/ml de Sb^V , es estadísticamente significativo entre Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine y Nanoemulsión sola (Tabla 3.1).

Tabla 3.1 Análisis de viabilidad celular con MTT para Promastigotes de *Leishmania (V) braziliensis (M2903)*

Sb ^v (ug/ml)	ANTIMONIATO DE MEGLUMINE				NANOEMULSION DE ANTIMONIATO DE MEGLUMINE				NANOEMULSION VACIA			
	Abs	SD±	% De Viabilidad	SD±	Abs	SD±	% De Viabilidad	SD ±	Abs	SD±	% De Viabilidad	SD±
300	0.1706	0.02	117	13	0.3124	0.036	64**	8	0.19300	0.017	103	9
150	0.1662	0.02	120	12	0.1896	0.011	104	6	0.18320	0.013	108	8
75	0.1844	0.02	108	11	0.1808	0.009	109	6	0.19040	0.012	104	7

*p<0.05 entre las dosis; ** p<0.05 entre tratamientos.

El porcentaje de viabilidad de amastigotes fue calculado de la misma forma que con los cultivos de promastigotes. Los datos exponen que dosis crecientes de la Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine disminuyen significativamente la viabilidad y esta disminución también fue dosis dependiente. El tratamiento de amastigotes con Antimoniato de meglumine no causó disminución en la cantidad de amastigotes.

El porcentaje de viabilidad a 300ug/ml de Sb^v es estadísticamente significativo entre Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine y Nanoemulsión sola (Tabla 3.2).

Tabla 3.2 Viabilidad celular con MTT para Amastigotes de *Leishmania (V) braziliensis (M2903)*

Sb ^v (ug/ml)	ANTIMONATO DE MEGLUMINE				NANOEMULSION DE ANTIMONATO DE MEGLUMINE				NANOEMULSION VACIA			
	Abs	SD±	% De Viabilidad	SD ±	Abs	SD±	% De Viabilidad	SD±	Abs	SD±	% De Viabilidad	SD±
300	0.16633	0.02	119	15	0.27600	0.010	71**	2	0.21300	0.03	93	13
150	0.14033	0.03	143	29	0.19067	0.011	103	6	0.20267	0.05	101	24
75	0.16267	0.05	129	42	0.17433	0.045	118	35	0.19467	0.03	102	15

*p<0.05 entre dosis; **p<0.05 entre tratamientos

Es importante considerar que hubo un incremento en el número de amastigotes de leishmania con tratamiento de Antimoniato de meglumine. La diferencia de sensibilidad a

Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine de cultivos de promastigotes y amastigotes de *Leishmania* se observa en la tabla 3.3, estableciéndose un IC₅₀ de 148 ug/ml Sb^v para promastigotes, casi el doble de lo requerido para amastigotes con IC₅₀ de 88 ug/ml de Sb^v (Tabla 3.3).

Tabla 3.3 Concentración inhibitoria al 50 % (IC50) de los tratamientos para Amastigotes y Promastigotes de Leishmania

	IC50 (ug/ml) de Sb ^v ± (Desviación estándar)		
	Antimoniato de meglumine	Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine	Nanoemulsión vacía
Promastigotes	189 ± 61,39	148 ± 2,5	260 ± 34,87
Amastigotes	141 ± 23,5	88 ± 12,5	249 ± 88,4

3.2 Toxicidad de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine en macrófagos peritoneales y macrófagos de la línea celular RAW 264.7 de ratones BALB/C.

Una vez establecido el efecto antiparasitario de la Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine se procedió a determinar el probable efecto toxico que esta formulación pudiera tener en la viabilidad de macrófagos (célula hospedadora de *Leishmania*). Este parámetro se evaluó en cultivos primarios de macrófagos peritoneales y en la línea celular Raw 264.7 de ratones BALB/c por el método de MTT. Los Macrófagos peritoneales y macrófagos de la línea celular fueron aislados y sembrados como se indica en materiales y métodos, los cultivos fueron tratados como se muestra en la Ilustración 3.1 y 3.2 por 24h.

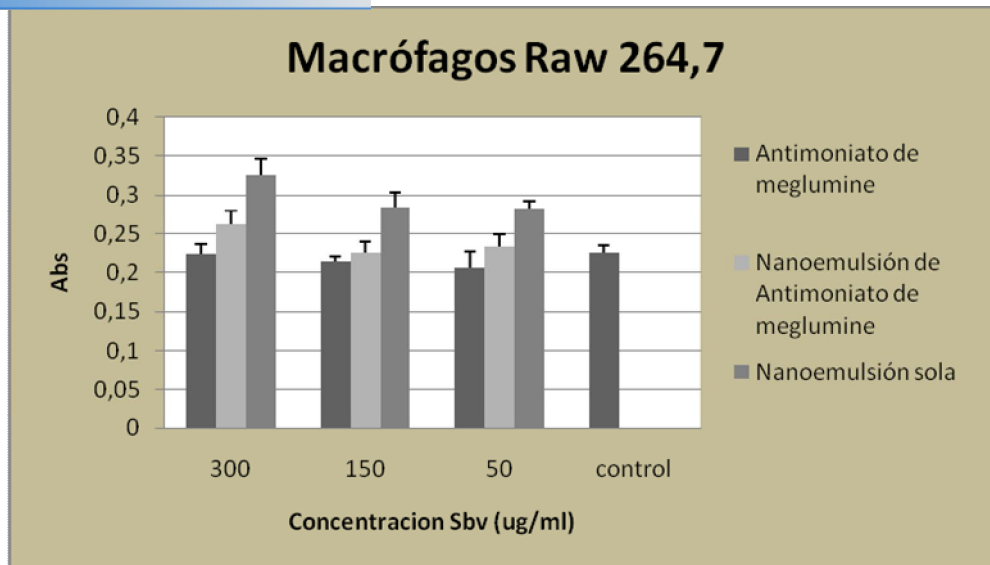


Ilustración 3.1 Efecto toxico de tratamientos en macrófagos de línea celular Raw 264.7

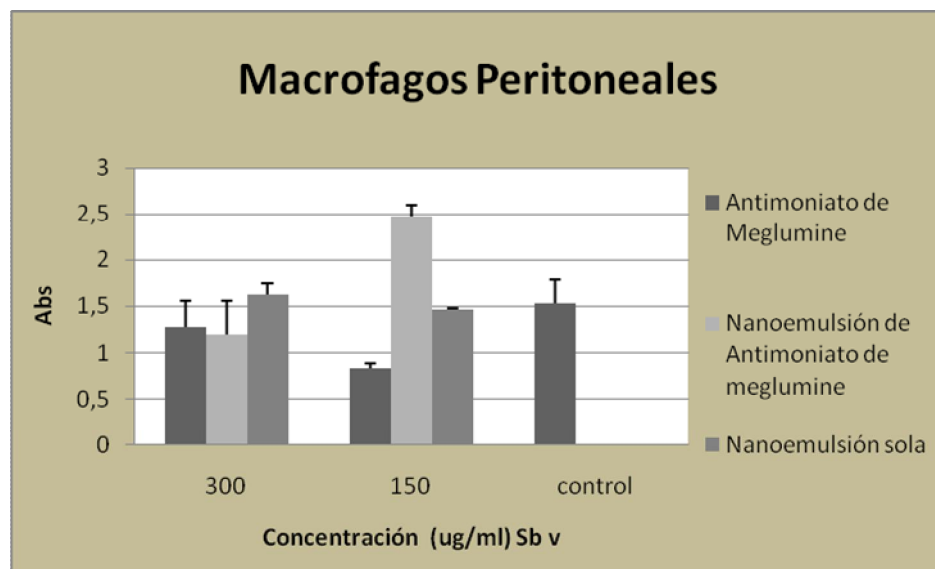


Ilustración 3.2 Efecto toxico de tratamientos en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

3.3 Sistema *in vitro* de infección en Macrófagos

Con el propósito de establecer las mejores condiciones de infección para un sistema *in vitro*, inicialmente se infectaron macrófagos con promastigotes de *Leishmania (V. braziliensis* MHOM/BR/75/M2903 (M2903) y se evaluó el número de parásitos intracelulares cada hora por 5 horas, (Ilustración 3.3). La cantidad de amastigotes intracelulares se incrementó con el tiempo de infección. Sin embargo, a partir de las 3 horas la integridad de las células infectadas se vió afectada por el gran número de parásitos intracelulares, por lo que se determinó el tiempo de infección de dos horas para la aplicación de los tratamientos.

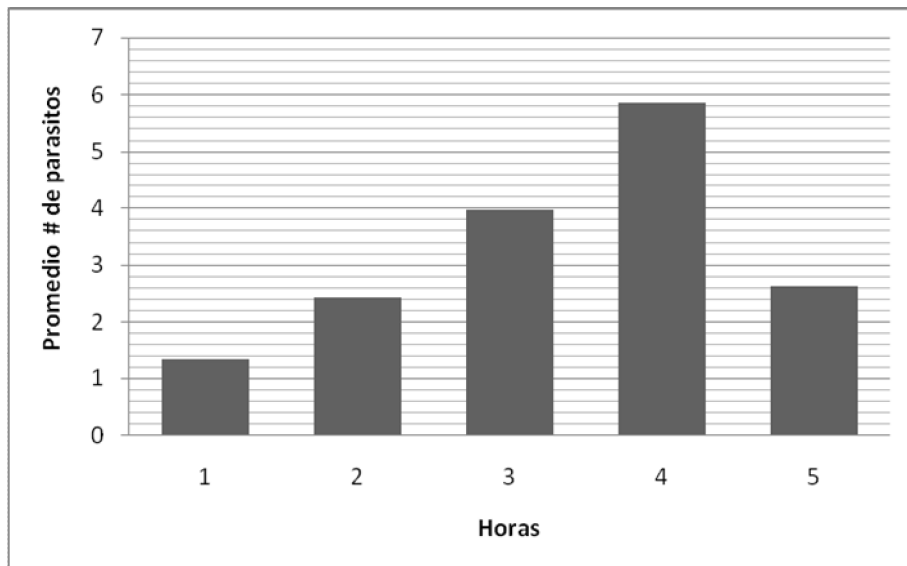


Ilustración 3.3 Amastigotes intracelulares en macrófagos peritoneales de ratón BALB/c

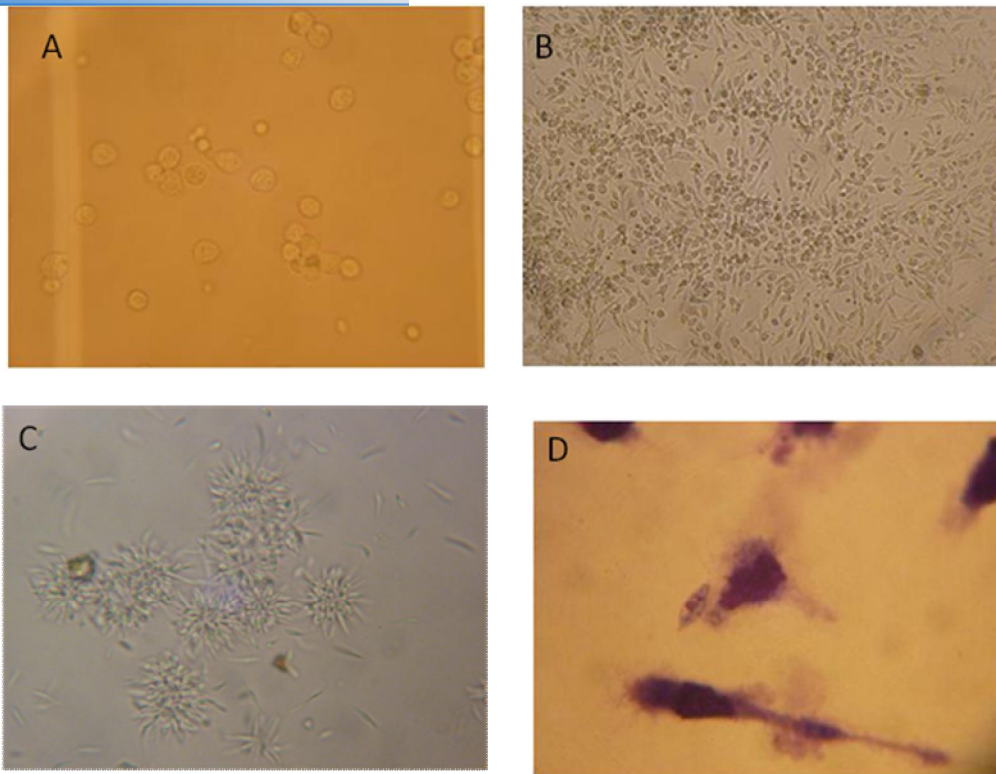


Ilustración 3.4 Infección de macrófagos con promastigotes de *Leishmania*. A) Macrófagos obtenidos de lavado peritoneal; B) Macrófagos adheridos a la base de las placas de cultivo; C) Promastigotes de *Leishmania*, cultivo de 7 días; D) Macrófagos y parásito en placa bajo microscopio

3.4 Efecto toxico de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine en sistema *in vitro* de infección en macrófagos

Para determinar el efecto antileshmaniásico de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine en un sistema *in vitro* de infección en macrófagos, concentraciones crecientes (50ug a 300ug/ml) de Sb^v de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine, fueron evaluadas después de 48h de tratamiento (Ilustración 3.4), la actividad de la droga se determinó contando el número de amastigotes intracelulares en 100 macrófagos tratados y en cultivos de grupo control, expuesto en la tabla 3.4.

El número menor de amastigotes intracelulares se obtiene a una concentración de 300µg/ml con Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine.

El resultado del ensayo de porcentaje de inhibición (Ilustración 3.6) utilizando Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine, muestra un efecto toxico, dosis dependiente, siendo a mayor concentración de la droga mayor poder inhibitorio. Por otro lado, los tratamientos con Antimoniato de meglumine y Nanoemulsión sola no presentaron un efecto toxico significativo en comparación a Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine.

Tabla 3.4 Amastigotes intracelulares en placa

Sb v (ug/ml)	ANTIMONATO DE MEGLUMINE		NANOEMULSION DE ANTIMONATO DE MEGLUMINE		NANOVACIA	
	Promedio	SD±	Promedio	SD±	Promedio	SD±
0	224	35	389	178	423	123
50	236	79	364	78	471	70
100	250	77	315	79	483	133
150	203	48	319	84	370	152
250	255	63	344	60	495	52
300	210	47	149	122	453	129

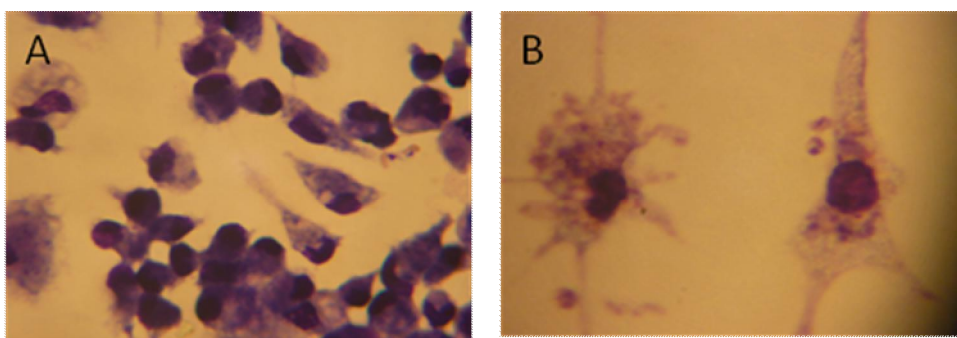


Ilustración 3.5 Macrófagos teñidos, A) Macrófagos sin infección B) Macrófagos infectados con *Leishmania*

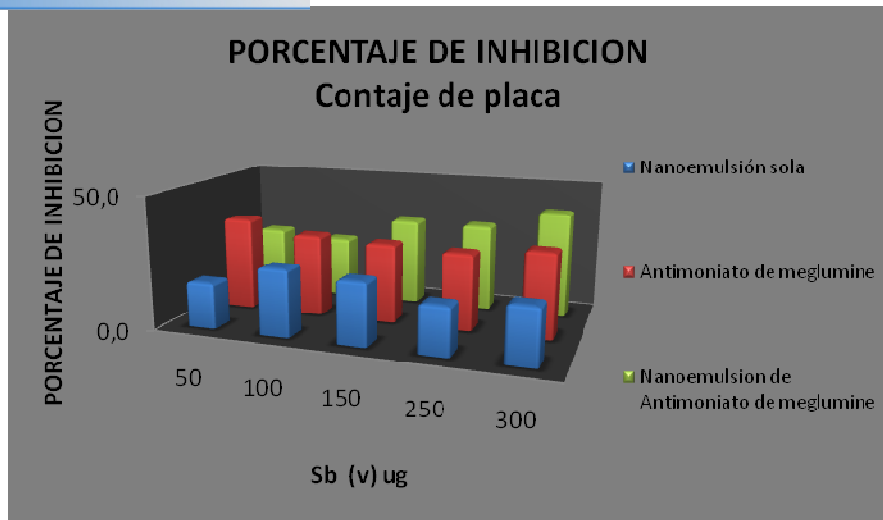


Ilustración 3.6 Porcentaje de Inhibición de amastigotes intracelulares en placa teñida

3.5 Efecto antileishmanicida de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine por PCR en Tiempo Real

El efecto tóxico de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine fue evaluado con la determinación del número de parásitos intracelulares en un sistema de infección in vitro utilizando *PCR en tiempo real*. (Ilustración. 3.7).

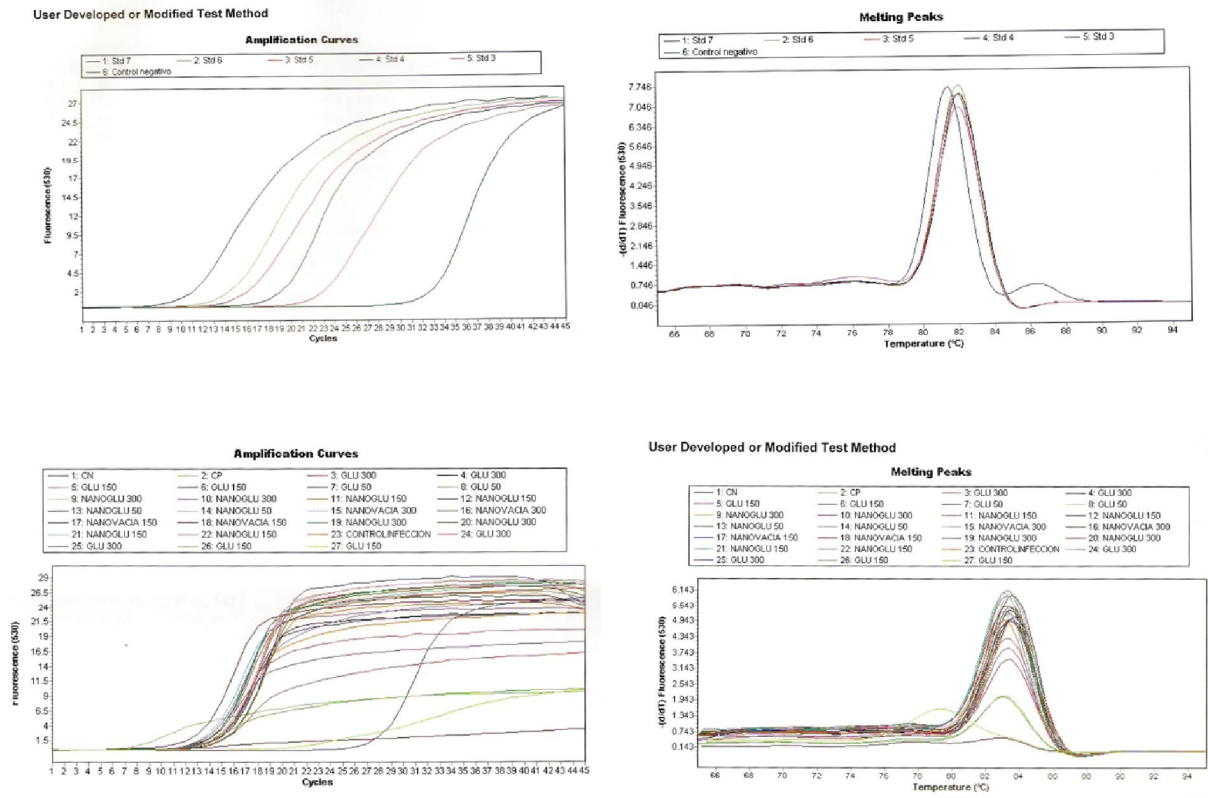


Ilustración 3.7 Amplificación de DNA para Curva estándar y muestras, incluyen el control con la temperatura de Melting

El porcentaje de inhibición en este análisis no fue estadísticamente significativo, sin embargo se observa un efecto de Antimoniato de meglumine, seguido por la Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine (Ilustración 3.8). Es importante notar que el porcentaje de inhibición a una dosis de 300 ug/ml con Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine es igual al porcentaje inhibitorio de Antimoniato de meglumine a dosis de 150ug/ml de Sb^v.

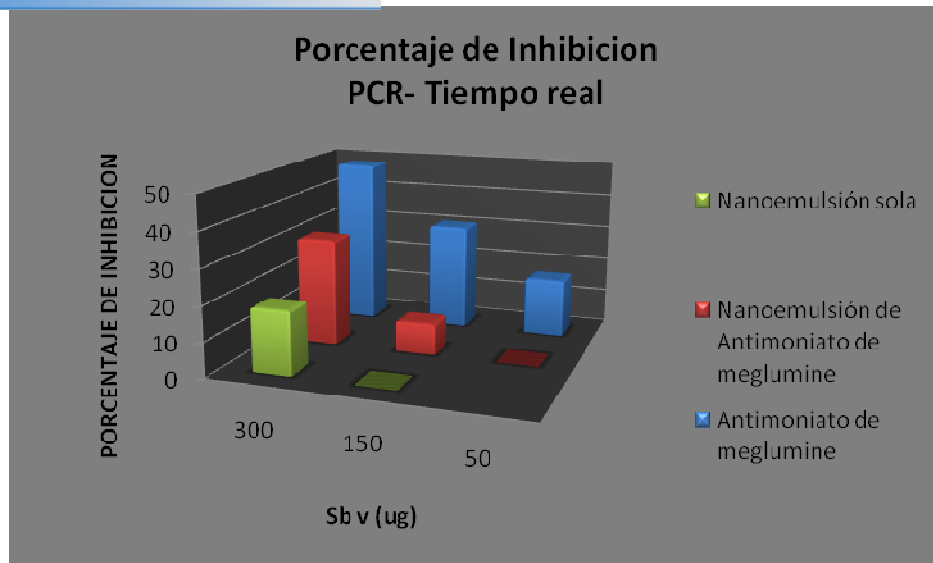


Ilustración 3.8 Porcentaje de Inhibición PCR en Tiempo Real

3.6 Respuesta inmune de macrófagos infectados con *Leishmania*. Expresión de iNOS y Citoquinas

El efecto de la Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine sobre la expresión de genes fue evaluado por transcripción reversa en una reacción en cadena de polimerasa (RT-PCR). Los experimentos fueron realizados en macrófagos RAW 264.7 con y sin infección parasitaria. Los perfiles de expresión fueron comparados con aquellos obtenidos después de un tratamiento de LPS como control positivo. La densidad de gliceraldehido 3- fosfato dehidrogenasa (GAPDH) en muestras de mRNA fue usado para normalizar la expresión de cada gen entre diferentes experimentos. Los niveles de RT-PCR de los transcritos fueron expresados como porcentaje de la señal interna del estándar (GAPDH) definido como 100%.

Tabla 3.5 Porcentajes de expresión de citoquinas a los diferentes tratamientos según GAPDH

PORCENTAJE EXPRESION DE iNOS y CITOQUINAS				
Tratamientos	IL-10	INF	iNOS	TNF
Antimoniato de meglumine 300 ug/ml	0	63	93	76
Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine 300 ug/ml	0	56	82	75
Nanoemulsión sola 300ug/ml	0	66	39	0
Nanoemulsión sola 150 ug/ml	0	52	76	69
Macrófagos + LPS	63	47	76	88
Macrófagos	0	53	82	85
Macrófagos + <i>Leishmania</i>	0	65	91	79

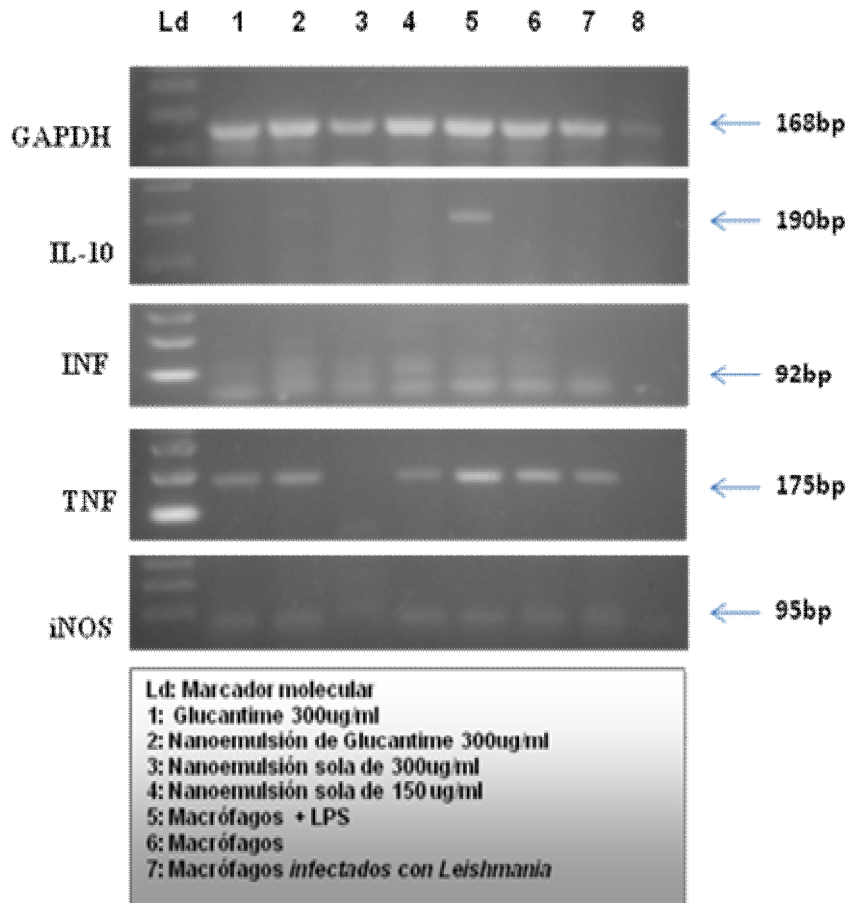


Ilustración 3.9 Expresión de iNOS y Citoquinas en geles de agarosa al 2%

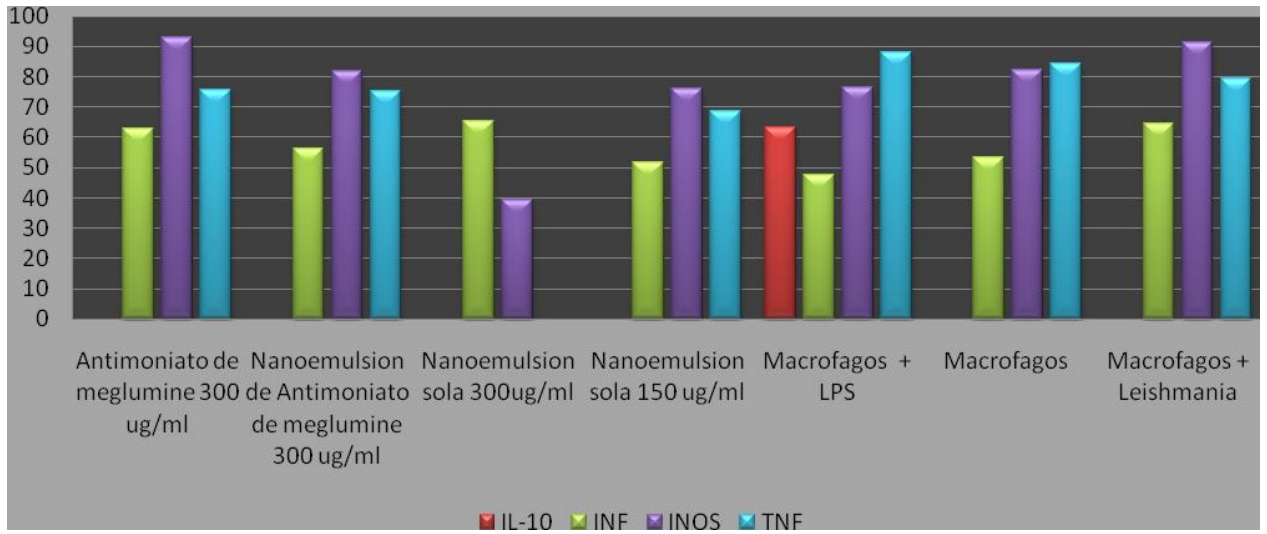


Ilustración 3.10 Porcentaje de citoquinas a los diferentes tratamientos

CAPITULO 4

4 DISCUSION

La aplicación de la nanotecnología en medicina ha sido ampliamente estudiada en varias áreas especialmente en el desarrollo de drogas, al cargar estas en nanopartículas la farmacocinética y el índice terapéutico de las drogas mejoran significativamente la acción de la misma en comparación con la droga libre (Zhang, 2010). Algunos tipos de nanopartículas como liposomas, nanopartículas poliméricas, nanopartículas sólidas lipídicas y dendrímeros han sido ampliamente investigados como plataformas para la administración de medicamentos y han sido introducidos en el mercado farmacéutico como AmBisome (Farmacia Nexstar, San Dimas, EE.UU.) y formulación liposómica de anfotericina B (AMB), utilizado en el tratamiento de *Candida spp.*, *Aspergillus spp.*, *Fusarium spp.*, otros hongos infecciones y para el tratamiento de leishmaniasis (Walsh, et al., 2001) productos como DaunoXome™, y Pevaryl™-Lipogel, liposomas con rutas principales de administración parenteral y tópica (Jores, 2004).

La formulación de Nanoemulsión de antimonio de meglumine utilizada en este estudio demostró una actividad antileishmaniasica *in vitro* efectiva contra la cepa de *Leishmania (V) braziliensis (M2903)*. La concentración efectiva de Nanoemulsión de Antimonio de meglumine está entre los 80 y 300ug/ml de Sb^v.

La razón de evaluar el efecto de la Nanoemulsión de antimonio de meglumine en las dos formas del parasito se debe a las características morfológicas y fisiológicas distintas y esto tiene implicaciones en el tratamiento mismo de la enfermedad (Rainey, 1991). Tanto los promastigotes como los amastigotes en los ensayos *in vitro* fueron sensibles a

Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine, siendo las formas intracelulares mas susceptibles a la formulación con un IC_{50} de 88ug/ml de Sb^V . Este dato es similar al reportado por Miguel (2009) con $77,3 \pm 12,1$ ug/ml de antimonio de meglumine, se reporta también datos superiores a 250ug/ml de antimonio para otras cepas de *leishmania*.

La diferencia obtenida entre Nanoemulsión de antimonio de meglumine y el antimonio de meglumine en amastigotes permite observar que la aplicación en esta forma de nanopartícula mejora el efecto de la droga en un 50% esto se expresa de forma similar en la utilización de Anfotericina B y Nanoemulsión de anfotericina B trabajo realizado por Manandhar (2008) donde la formulación en Nanoemulsión es un 30% más efectiva que la droga sola.

Resultados similares se observan para las formas extracelulares del parasito (promastigotes) donde la las formulaciones en nanoemulsiones son un 70% más efectivas que sus respectivas drogas libres (antimonio de meglumine y anfotericina B).

Esto puede deberse a la concentración activa de la droga dentro del fagolisosoma del macrófago conteniendo al amastigote, que metaboliza la droga a una forma con mayor actividad (Callahan *et al.*, 1997, Ephros *et al.*, 1997). La captación endocitica de las nanopartículas son principalmente importantes por presentar una actividad mejorada (Kayser, 200). Sin embargo se describe que la composición del medio puede afectar la susceptibilidad de los promastigotes (Petrillo-Peixoto y Beverly, 1987) otros factores como la densidad celular, grado de crecimiento y posibles alteraciones inducidas por la droga en el medio de cultivo, pueden influir en los resultados con promastigotes (Moreira *et al.*, 1995; Carrión *et al.*, 2000) es decir que el IC_{50} de 148ug/ml de Sb^V de Nanoemulsión de Antimonio de meglumine puede variar.

Es importante tomar en cuenta que las formas amastigotes tienen bajos niveles de actividad deshidrogenasa que a sus correspondientes formas flageladas (promastigotes) (Serenó, 1997), por lo tanto esta diferencia puede deberse al pobre desarrollo de la mitocondria en la forma aflagelada (Marr, 1980; Mukkada et al. 1985), es decir que los resultados obtenidos para amastigotes pueden depender no solo de la aplicación de los diferentes tratamientos

sino de la actividad propia del amastigote según esto la diferencia en las concentraciones para efecto leishmanicida puede ser mayor o menor a los resultados obtenidos.

En el ensayo de macrófagos infectados, el porcentaje de inhibición o control de la parasitosis fue mayor con la Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine que con la administración libre del fármaco, además, se mostró un comportamiento dependiente de la dosis administrada en cada ensayo. El modelo *in vitro* de infección a macrófagos, los resultados obtenidos evidencian que Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine no es tóxico para macrófagos peritoneales ni para macrófagos de la línea celular RAW 264,7 al no presentar diferencia significativa en relación al control (macrófagos sin tratamiento).

Siguiendo este modelo de infección en macrófagos se reporta menor cantidad de amastigotes intracelulares con Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine, seguido del tratamiento con Antimoniato de meglumine, por otro lado Nanoemulsión vacía no presenta efecto alguno en la carga parasitaria de macrófagos infectados con *Leishmania*. Además cabe mencionar que el efecto de Antimoniato de meglumine es casi constante para todas las dosis del tratamiento en comparación con Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine. Estos resultados no son del todo confiables para determinar carga parasitaria debido a errores del observador y errores sistemáticos. La activación de la proteína quinasa puede jugar un papel esencial durante la infección de leishmania, porque esta activación podría activar un componente de NADPH oxidasa ($p47^{phox}$) catalizar el estallido oxidativo y por consiguiente la generación de radicales de oxígeno que puede matar amastigotes intracelulares en macrófagos (Murray, 1997).

El efecto tóxico de compuestos antimoniales como el antimoniato de meglumine podría ser debido a la forma trivalente del compuesto antimonial que se crea a través de la conversión del antimonio pentavalente el glutatión o los tioles relacionados en el fagolisosoma del macrófago (Fredzard, 2001).

Bajo el principio de PCR la amplificación del DNA de parásitos aislados de macrófagos infectados y tratados basado en el sistema LightCycler con SYBR Green I. es cuantitativamente exacta y sensible, varios estudios respaldan el método basado en la amplificación de DNA del kinetoplasto debido a que es más sensitiva por que este fragmento está presente en cerca de 10 mil copias por célula (Lambson, 2000; Nicolas, 2002). Este ensayo permite amplificar de tal manera que resulta el método más seguro a la hora de determinar un efecto mayor de los tratamientos. Los resultados demuestran que la actividad de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine tiene un efecto similar a Antimoniato de meglumine lo que propone una alternativa en la administración del medicamento además de las ventajas del uso de las nanopartículas por su rápida penetración en la membrana celular o a través del tejido.

Por otro lado las citoquinas juegan un papel fundamental en la modulación de la respuesta inmune a las infecciones y otras patologías. Muchas técnicas se han utilizado para evaluar la respuesta inmune y algunos métodos como inmunoensayo enzimático (ELISA) y citometría de flujo intracelular miden la concentración de proteínas (Flelinger, 2001), mientras que otros como Northern Blot y ensayo de protección de RNAsa determinan los niveles de expresión de genes. Sin embargo, su sensibilidad relativamente baja constituye una limitación en los casos en que existe un pequeño volumen de muestra. La aplicación de la RT-PCR convencional o semicuantitativa ha superado estas limitaciones (Perrin, 1990). En la actualidad RT-PCR es el método más adecuado para la cuantificación de la expresión génica, pero el uso de termocicladores especializados y costosos reactivos ha dificultado su uso.

Durante la invasión inicial de leishmania las células T y las citoquinas juegan un papel importante para determinar la naturaleza de la respuesta inmune y por tanto la respuesta de infección en el hospedador (Etges, 1998). Los macrófagos pueden eliminar microorganismos fagocitados y por lo tanto ayudan a eliminar la amenaza de la infección. Sin embargo algunos parásitos como *Leishmania* se han adaptado a sobrevivir dentro de los macrófagos y el uso del espacio intracelular les proporcionan el medio para la evasión inmune (Phillips, 2010).

En leishmaniasis se asocia un control de la enfermedad a una respuesta inmunológica de tipo Th1 donde citoquinas como INF- γ , IL-2 e IL-12 controlan la diseminación de la misma mientras que las citoquinas IL-4, IL-5, IL-13 y IL-10 se asocian con la progresión de la enfermedad, es decir con una respuesta de tipo Th 2 (Reiner, 1995; Etges, 1998). Los efectos antileishmanicidas dependen de la activación mediada por macrófagos (Barroso, 2007).

La evaluación del perfil de citocinas expresadas en los macrófagos infectados y tratados con Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine determinó que la expresión de iNOS y citoquinas como IL-10, TNF e INF- γ correspondían a un perfil de respuesta inmune Th1 asociada con el control de la leishmaniasis

La producción de óxido nítrico (NO) desde iNOS, es la vía final común para mediar la persistencia o la destrucción del parásito por los macrófagos. Esto significa que la inhibición de la producción de NO les da a los macrófagos la incapacidad de restringir la replicación de *Leishmania* (Awasthi, 2004). Tanto los niveles de INF- γ y TNF- α fueron altos durante este tratamiento lo que provoca una activación de los macrófagos para controlar parásitos (Rogers y Titus, 2004), son también necesarias para la expresión del efecto leishmanicida de antimonio pentavalente (Murray, 2000).

La expresión de citoquinas ante el tratamiento de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine demuestra que los niveles de iNOS mediante la óxido nítrico sintetasa inducido es elevado sobre el 80% lo que explica que hay acción de destrucción contra el parásito, esto a su vez inducido por la producción de INF- γ (Rogers y Titus, 2004).

Se utilizó en este estudio como control positivo la activación de los macrófagos con LPS dando como resultado solamente la expresión de IL-10 a este tratamiento, es decir que este resultado, comparado con el resto de tratamientos resulta de la estimulación del receptor innato de reconocimiento en la membrana celular (TLR4) y por tanto lleva a la célula a

activar mecanismos de regulación con la secreción de IL-10 y otras citoquinas moduladoras de la respuesta. IL10 tiene la capacidad de inhibir la producción de NO mediante la inhibición de la producción de IFN- .

Realizando una comparación entre tratamientos, los niveles de iNOS para Antimoniato de meglumine, Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine y Nanoemulsión sola disminuyen respectivamente lo que sugiere lo antes mencionado, una respuesta efectiva en el control de los parásitos intracelulares en presencia de Antimoniato de meglumine ya sea en Nanoemulsión o sin ella.

Por otro lado el tratamiento con la Nanoemulsión sola no evidencia expresión de TNF- por lo que no existe una correcta activación del macrófago para controlar al parásito aunque el INF- esté presente.

En un análisis general los porcentajes de expresión de citoquinas dan como resultado una tendencia a una respuesta positiva asociada al control de la enfermedad. Recientemente se ha informado que los promastigotes de *Leishmania* modulan el patrón de citoquinas y que esta regulación está influenciada por el estadio de promastigotes (Muskus, 2002).

Los modelos *in vitro* para estudiar el metabolismo, la expresión génica o nuevos compuestos frente a *Leishmania* son diferentes dependiendo de la especie de *Leishmania*, el estadio del parásito, las condiciones del cultivo, y preparación usada en los ensayos.

El tratamiento de Leishmaniasis en el Ecuador está dado por el uso de Antimoniato de meglumine como fármaco de primera línea, sin embargo se ha evidenciado que el tratamiento es poco exitoso debido a su eficacia variable, administración complicada, costo elevado y resistencia. El uso de la nanotecnología como una herramienta para mejorar dicho tratamiento pretende ser la solución más óptima y de fácil aplicación.



PDF
Complete

*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

Las drogas desarrolladas bajo esta tecnología son preferentemente atrapadas por los macrófagos por lo que el proceso de fagocitosis ayuda a que la droga llegue al sitio deseado y por tanto mejora la administración del fármaco. La formulación de emulsión de Antimoniato de meglumine es una alternativa para desarrollar nuevos sistemas de administración. Las nanoemulsiones, definidas como aceite en agua o agua en aceite preparadas con un tamaño de partícula menor o igual a 100nm, son termoestables a altas temperaturas (Pinnmaneni, 2003) y de dispersión homogénea por lo que no afecta sus características o actividad original de la droga.

5 CONCLUSIONES

El efecto antileishmaniasico de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine es efectivo para parásitos de *Leishmania (V)braziliensis*, MHOM/BR/75/M2903 (M2903) este resultado posibilita el estudio con otros patógenos intracelulares de la misma familia incluso parásitos del mismo orden.

Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine disminuye la carga parasitaria en amastigotes intracelulares en un sistema *in vitro* de Macrófagos infectados.

Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine disminuye la carga parasitaria de cultivos *in vitro* de amastigotes y promastigotes de *leishmania* con mejores resultados que los obtenidos con Antimoniato de meglumine.

Antimoniato de meglumine, Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine y Nanoemulsión sola no presenta efecto toxico contra macrófagos peritoneales y macrófagos de la línea celular RAW 264.7 provenientes de ratones BALB/c.

La concentración inhibitoria al 50% de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine se determino en 88 y 148 ug/ml de Sb^v para amastigotes y promastigotes de *leishmania* respectivamente, amastigotes son más sensibles a esta formulación.

Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine está asociada a una respuesta inmune positiva, Th1 es decir control parasitario de macrófagos infectados.

CAPITULO 6:

6 RECOMENDACIONES

Al probar nuevas drogas leishmanicidas es necesario probar en ambos estados del parasito promastigotes extracelulares y amastigotes intracelulares.

Es necesario el análisis de más interleuquinas tanto de una respuesta Th1 como Th2 para determinar la respuesta inmune a los medicamentos o compuestos a probar.

Es importante tomar en cuenta que los resultados obtenidos pueden o no ser los mismos para otras cepas de *leishmania* debido a que estas varían en composición bioquímica y genética, por tanto el efecto observado de Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine no puede tener el mismo efecto.

CAPITULO 7:

7 BIBLIOGRAFÍA

Adams, D.O. y Hamilton, T.A. (1988); Phagocytic cells: cytotoxic activities of macrophages. En: Inflammation: Basic principles and clinical correlates. Raven Press, Ltd. (New York), pag. 471.

Alexander, J.; Satoskar, A.; Russell, D. 1999; Leishmania species: models of intracellular parasitism. J. Cell Sci. 112: 2993-3002.

Alvar Ezquerro Jorge, 2001, Las leishmaniasis: de la biología al control Centro Colaborador de la OMS para Leishmaniasis Servicio de Parasitología Centro Nacional de Microbiología Instituto de Salud Carlos III Madrid 2ª edición Para la revisión de esta edición J. A. recibió apoyo del Fondo de Investigaciones Sanitarias (B.A.E. 99/5038) y del Christs College, Universidad de Cambridge

Ampuero J, 2000; Leishmaniasis; Ministerio de Salud del Perú, Medica, Magister en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias por la Universidad de Brasilia, Brasil

Antoine JC, Prina E, Jouanne C, Bongrand P. 1990; Parasitophorous vacuoles of *Leishmania amazonensis* infected macrophages maintain an acidic pH. Infect Immun; 58:779-87.

Arias J, Beltran F, Desjeux P, Walton B. (1996). Epidemiologia y control de Leishmaniasis en las Americas, por país o territorio. Oficina sanitaria Panamericana. Washington, D.c.: OPs, Cuaderno Tecnico n° 44, ix, p 52.

Ashford RW. 1997. The leishmaniasis as model zoonoses. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 91: 693-701.

Awasthi A et al. Indian J Med Res. 2004; 119: 238-258.

Bangham, A. D. 1983. *Liposome Letters*, Academic Press London.

Berg K, Zhai L, Chen M, Kharazmi A, Owen TC (1994) The use of a water- soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. *Parasitol Res.* 80: 235- 239.

Berman JD, (1996). Treatment of New World Cutaneous and Mucosal Leishmaniasis. *Clin Dermatol*; 14: 519-22.

Bonfante R, Barruela S. 2002. Leishmaniasis y Leishmaniasis en América con especial referencia a Venezuela. Caracas: Tipografía y Litografía Horizonte C.A. [STANDARDIZEDENDPARAG]

Brito. S. et al., 2006 Eficacia de un ácido kaurenico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asteraceae) contra *Leishmania (Vianna) braziliensis*.

Callahan HL, Portal AC, Devereux R, Grogl M. 1997. An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 41: 818-822.

Calvopiña, M. 2004. Epidemiology of Leishmaniasis in Ecuador. Current Status of Knowledge ó A Review. *Memorias del Instituto Oswaldo Cruz*. November. Vol. 99(7): 663-672.

Campos J. 2008; Farnesil Difosfato sintetasa de leishmania major: Estudios de una potencial diana terapéutica; Instituto de Parasitología y Biomedicina López-Neyra. Consejo Superior de Investigaciones Científicas (C.S.I.C); Granada

Carcelen J, 2005, Utilizacion de la proteína multicomponente quimera de de leishmania infantum en inmunoprofilaxis y diagnostico de la leishmaniosis canina, Unidad de parasitología y enfermedades parasitarias, Universidad de Extremadura, Facultad de Veterinaria, Departamento de medicina y sanidad animal.

Castes M, Agnelli A, Rondon AJ. 1984; Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. Clin Exp Immunol; 57: 279-286.

Chang KP et al.,s, 1985. En: Leishmaniasis. Chang KP y Bray RS (ed.). Elsevier, Amsterdam. Pag. 1-30.

Charles Mary, Françoise Faraut, Laurie Lascombe, and Henri Dumon, 2004. Quantification of Leishmania infantum DNA by a Real-Time PCR Assay with High Sensitivity; Laboratoire de Parasitologie, Hôpital de la Timone, Marseille, France.

Chávez MA, Sáenz EM. 2002; Estudio clínico epidemiológico de la leishmaniasis en el Hospital Militar Central, 1997-2000. Tesis para obtener Título de Segunda Especialización en Dermatología. Universidad Nacional Mayor de San Marcos. Facultad de Medicina. Lima: 1-60.

Chulay, J.D., Fleckenstein, L., Smith, D.H. 1988; Pharmacokinetics of antimony during treatment of visceral leishmaniasis with sodium stibogluconate or meglumine antimoniate. Trans R Soc Trop Med Hyg; 82: 69-72

Cole SPC, (1986) Rapid chemosensitivity testing of human lung tumor cells using the MTT assay. Cancer Chemother Pharmacol 17: 259-263.

Convit J and Pinardi ME; Published (1974) *Cutaneous Leishmaniasis The Clinical and Immunopathological Spectrum in South America*, by ASP (Elsevier-Excerpta Medica-North Holland) Amsterdam p. 160-6.

Convit J Ulrich M, Fernandez CT, Tapia FJ, Caceres- Dittmar G, Castes M and Rondón AJ, 1993; The clinical and Immunological Spectrum of American Cutaneous Leishmaniasis . *Trans R Soc Trop Med Hyg*; 87: 444-8.

Convit J. 1958, Leishmaniasis Tegumentaria Difusa. Nueva Entidad Clínico Patológica y Parasitaria. *Rev San Asistencia Soc XXIII* 1,2:1-23.

Cortázar T, Hernandez J, Echeverry MC, Camacho M, 2006; Papel de la vacuola parasitófora de macrófagos de ratón infectados por *Leishmania amazonensis* en la adquisición de moléculas; Laboratorio de Biofísica, Centro Internacional de Física, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, Departamento de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. Laboratorio de Parasitología, Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá, D.C., Colombia. *Supl.1*:26-37.

Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. 2006; Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev*; 19: 1116126.

Croft, S., Coombs, G., (2003) Leishmaniasis- current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *TRENDS in Parasitology*. 19 (11) 502- 508.

Davies C, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodríguez N, 2000, The epidemiology and control leishmaniasis in Andean countries. *Cad S Pub Rio de Janeiro*; 16: 925-50.

Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg von, [urn:nbn:de:gbv:3-000007006](http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007006) <http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007006>

Desjardins, M., 1995. Biogenesis of phagolysosomes: the kiss and run hypothesis. *Trends Cell Biol.* 5:183

Desjeux P. 1996. Leishmaniasis: public health aspects and control. *Clinics in Dermatology*, 14: 41723

Desjeux P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp.*

Diaz NL, Zerpa O, Ponce LV; 2002. Intermediate or chronic cutaneous leishmaniasis: leukocyte immunophenotypes and cytokine characterization of the lesion. *Exp Dermatol*; 11:34-41.

Ephros M, Waldman E, Zilberstein D. 1997. Pentostam induces resistance to antimony and the preservative chlorocresol in *Leishmania donovani* promastigotes and axenically grown amastigotes. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **41**: 1064-1068.

EPI, 2. Aguilar Eduardo, MSP

ESPUELAS M.S., LEGRAND P., LOISEAU P.M., BORIES C., BARRATT G., IRACHE J.M. 2002, In vitro antileishmanial activity of Amphotericin B loaded in poly(epsilon-caprolactone) nanospheres. *Drug Target. Dec*; 10(8):593-9.

Etges R, Muller I. 1998. Progressive disease or protective immunity to *Leishmania major* infection: the result of a network of stimulatory and inhibitory interactions. *J Mol Med*; 76(6):372-90.

Farah F, Klaus N, Frankeburgs, et al. 1999; Infecciones por Protozoarios y Helminths. En: Fitzpatrick T. *Dermatología en Medicina General*. Buenos Aires: Ed. Med. Panamericana; 3:2767-2777.

Feagin, J.E. (2000); Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol* 30: 371-390.fuente:

http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S012140042006000200001&script=sci_arttext

Garba ML, Flelinger JA. 2001. Intracellular cytokine staining for TGF- β . *J Immunol Methods* 2001;258:19368.

Gilliland G, Perrin S, Blanchard K, Bunn HF, 1990. Analysis of cytokine mRNA and DNA: Detection and quantification by competitive polymerase chain reaction. *Proc Natl Acad Sci USA*;87:272569.

González, (2003), Búsqueda de genes que codifican proteínas útiles para la inmunoprotección frente a Leishmaniasis director Enrique Martínez Carretero basilio valladares hernández curso 2003/04 ciencias y tecnologías/4 i.s.b.n.: 84-7756-590-2 soportes audiovisuales e informáticos serie tesis doctorales.

Grevelink S, Lemer E. 1996; Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*; 34:257-70.

Grimaldi, O; Tesh, R. and McMahon-Pratt, D. 1989. "A review of the geographic distribution and epidemiology of leishmaniasis in the new world". *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 41:687-700.

Hall BF, Gramiccia M, Gradoni L, et al. 1991; Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defenses. *Parasitol Today*;12: A22-A27.

Handman E. 2001. Leishmaniasis: current status of vaccine development. *Clinical Microbiology Reviews*, 14: 229-243.

Hepburn N, Nolan J, Fenn L, Herd R, Neilson J, Sutherland G, et al. 1994, Cardiac effects of sodium stibogluconate: Myocardial, electrophysiological and biochemical studies. *QJM*, 87(8):465-472.

INEC. 2001. VI Censo Nacional y V de Vivienda.

INS- Instituto Nacional de Salud, 2007, Subdirección de Vigilancia y Control, Protocolo de Vigilancia de la Leishmaniasis, pag: 1-24.

Katja Jores, 2004, Lipid nanodispersions as drug carrier systems -a physicochemical characterization, Mathematisch-Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät

Krishna Das Manandhar, Thakur Prasad Yadav, Vijay Kumar Prajapati, Subodh kumar, Madhukar Rai, Anuradha Dube, Onkar Nath Srivastava and Shyam Sundar, 2008. Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate, Infectious Disease Research laboratory, Department of Medicine, Institute of Medical Sciences, Banaras Hindu University, Varanasi 221005, India; Division de Parasitology, Central Drug Reserch Institute, Lucknow 226001, India.

Larabi, M., P. Legrand, M. Appel, S. Gil, M. Lepoivre, J. P. Devissaguet, F. Puisieux, and G. Barratt. 2001. Reduction of NO synthase expression and tumor necrosis factor alpha production in macrophages by amphotericin B lipid carriers. *Antimicrob. Agents Chemother.* **45**:5536562.

Le Ponti F., Leon R., Moucheti J., Echeverria R., Guderian R.H. 1994. Leishmaniasis in Ecuador. 2. Man/vector contacts in Leishmaniasis: the case of *Lutzomyia trapidoi* and *Lu. Gomezi*. *Annales de la Societe Belge de Medicine Tropicale*. March. Volume 74(1):13-21.

Lira R., Sundar S., Makharia A., Kenney R., Gam A., et all., (1999)., Evidence that the high incidence of treatment failures in Indian kala-Azar is due to the emergence of antimony resistant strains of *Leishmania donovani*. *J Infect Dis* 180; 564-567.

M. Holzer, V. Vogel, W. Mantele, D. Schwartz, W. Haase, K. Langer, 2009, Physicochemical characterisation of PLGA nanoparticles after freeze-drying and storage, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 72, 4286437.

Marr J.J, 1980; Carbohydrate metabolism in Leishmania. In: Levandowsky M, Hunter SH (eds) Physiology and biochemistry of protozoa vol 3. Academic Press, New York, pp 171-210.

Matte C, Oliver M; 2002; Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: Modulation of proinflammatory mediators. J Infect Dis; 185:673-81.

Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología. Módulos Técnicos. Serie de Monografías. Leishmaniasis. 2000; Lima, Perú;08-83.

Moreno *et al.*, 2008, Actividad in vitro de la mezcla de alcaloides de *Ervatamia coronaria* (Jacq)Staff. Apocynaceae sobre amastigotes de *Leishmania braziliensis*, Ponteficie Universidad Javeriana, Facultad de Ciencias Basicas Departamento de Biología Bogota Colombia.

Moskowitz P.F., Kurban A.K. 1999. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis: retrospectives and advances for the 21st century. Clin. Dermatol. May-Jun;17(3):305-15.

Mukkada AJ, Meade JC, Glaser TA, Bonventre PF, 1985; Enhanced metabolism of *Leishmania donovani* amastigotes at acidic pH: an adaptation for intracellular growth. Science 229:1099-1101.

Muñoz D.L., Cardona D.P. , Cardona A., Carrillo L.M., Quiñones W., Echeverri F., VÉLEZ I.D. y Robledo S.M; Efecto de hidrazonas sobre amastigotes intracelulares de *leishmania panamensis* y una proteasa de cisteína parasitaria

Muskus C, Marin M, 2002; Metaciclologénesis: Un proceso fundamental en la biología de *Leishmania*; Biomedica, vol. 22, numero 002, Instituto Nacional de Salud, Bogota, Colombia pp 167- 177.

Nicolas Luc, Eric Prina, Thierry Lang, and Geneviève Milon, 2002. Real- Time PCR for Detection and Quantitation of *Leishmania* in Mouse Tissues; Unité

d'Immunophysiologie et Parasitisme Intracellulaire, Institut Pasteur, 75724 Paris Cedex 15, France.

Organización Mundial de la Salud (2000). Leishmaniasis and Leishmaniasis/HIV co-infection. En: WHO report on global surveillance of Epidemic-prone infections diseases (WHO/CDS/CRS/ISR/2000.1) <http://www.who.int/emc/diseases/leih/index.html>.

Oswaldo Miranda Gómez; My. Iván González Barea 2007, Leishmaniasis cutánea Especialista de I Grado en Higiene y Epidemiología. ^{II} Especialista de I Grado en Medicina Interna. Revista Cubana de Medicina Militar versión impresa ISSN 0138-6557 Rev Cub Med Mil v.36 n.4 Ciudad de la Habana oct.-dic.

Papermaster BW, Pincus JH, Lincoln P, Reisfeld RA. 1974; Probit analysis of cytotoxicity data. Transplantation;18(6):541-4.

Paredes R, Laguna F, Clotet B. Leishmaniasis in HIV-Infected persons.

Pearson RD, De Quiroz Sousa A. 1996; Clinical spectrum of leishmaniasis. Clin Infect Dis;22:1-13.

Peter J. Hotez, M.D., Ph.D., David H. Molyneux, Ph.D., D.Sc., Alan Fenwick, Ph.D., Jacob Kumaresan, M.B., B.S., Dr.P.H., Sonia Ehrlich Sachs, M.D., Jeffrey D. Sachs, Ph.D., and Lorenzo Savioli, M.D. 2007. Control of Neglected Tropical Diseases; From the Sabin Vaccine Institute, and George Washington University, Washington, DC (P.J.H.); Liverpool School of Tropical Medicine Support Center and the Global Alliance to Eliminate Lymphatic Filariasis, Liverpool United Kingdom (D.H.M.) N Engl J Med 2007;357: 1018-27.

Phillips M, Stanley S. 2006, Quimioterapia de infecciones por protozoos. Amebosis, Giardiasis, Tricomoniasis, Tripanosomiasis, Leishmaniasis y otras infecciones por protozoos. En: Brunton LL, Lazo JS, Parker KL, editores. Goodman & Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 11ª edición. México: McGraw Hill; p.1049-1071.

Phillips R., Svensson M., Aziz N, Maroof M., Brown N., Beattie L., Signoret N., Kaye M. 2010. Innate Killing of *Leishmania donovani* by Macrophages of the Splenic Marginal Zone Requires IRF-7, Centre for Immunology and Infection, Hull York Medical School and Department of Biology, University of York, York, United Kingdom, Center for Infectious Medicine, Department of Medicine, F59, Karolinska Institutet, Karolinska University Hospital, Huddinge, Stockholm, Sweden, 3 The Technology Facility, Department of Biology, University of York, York, United Kingdom, Volume 6, Issue 3, e1000813.

Rangel HR, Dagger F, Compagnone RS. 1997, Antiproliferative effect of illimaquinone on *Leishmania mexicana*. *Cell Biol Int*, 21:337-9.

Reguera Rosa M., Perez-Pertejo Yolanda, Redondo Carmen M., Diaz-Gonzalez Rosario, Balaña-Fouce Rafael, (2007); 67: 747-757, La ADN topoisomerasa tipo I de protozoos patógenos como diana terapéutica de fármacos antitumorales, Departamento de farmacología y toxicología (intoxcal), Universidad de León, España.

Reiner SL, Locksley RM. 1995. The regulation of immunity to *Leishmania major*. *Annu Rev Immunol*; 13:151-77.

Rivas L, Moreno J, Cañavate C, Alvar J, (2004). Virulence and disease in leishmaniasis: what is relevant for the patient? *Trends Parasitol*; 20: 297-301.

Rogers Kathleen, Titus Richard, 2004. Characterization of the early cellular immune response to *Leishmania major* using peripheral blood mononuclear cells from *Leishmania*-naive humans. Department of Microbiology, Immunology and Pathology, College of Veterinary Medicine and Biomedical Sciences, Colorado State University, Fort Collins, Colorado, pp 568- 576.

Rondon L, 1993, *Leishmaniasis tegumentaria americana*. *Clin Dermatol Venez*; 31:12-17.

Sacks DL. 1989, Metacyclogenesis in leishmania promastigotes. *Exp Parasitol*, 69:100-3.

Sanchez-Saldaña et al.,, 2004; Leishmaniasis, *Dermatologia Peruana* vol 14: N°2
Departamento de Dermatologia del hospital Militar Central (DDHMC).

Sereno D, Lemesre J, 1997; Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. ORSTOM, Laboratoire d'Epidemiologie de Maladies à Vecteurs, Unité de Biologie Parasitaire, BP 5045, F-34032 Montpellier Cédex 1, France.

Shaw JJ. 1994. Taxonomy of the genus *Leishmania*: present and future trends and their implications. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 471-78.

Solanny et al.,; 2006; Eficacia de un ácido kaurenico extraído de la planta venezolana *Wedelia trilobata* (Asteraceae) contra leishmania (*Viannia*) *braziliensis*; Universidad de Oriente, Cumana, Estado Sucre, Venezuela; Instituto de Biomedicina, Universidad Central de Venezuela, Caracas Venezuela.

Theodos y Titus, 1993. *Parasite Immunol.* 15:481.

UNDP/World Bank/WHO, 2002, Who report on global surveillance of epidemic-prone infectious Cap. 10: Leishmaniasis and *Leishmania*/HIV co-infection. Geneva: WHO.

Walsh, T. J.; Goodman, J. L.; Pappas, P.; Bekersky, I.; Buell, D.N.; Roden, M.; Barrett, J.; Anaissie, E. J. 2001, Safety, tolerance, and pharmacokinetics of high-dose liposomal amphotericin B (AmBisome) in patients infected with *Aspergillus* species and other filamentous fungi: maximum tolerated dose study. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45, 3487-96.

Weigel M.M., Armijos R.X. 2001. The traditional and conventional medical treatment of LC in rural Ecuador. *Pan American Journal of Public Health.* Volume 10, Number 6, December. pp. 395-404.

Yépez J, scorza D. 2003, Quimioterapia de la leishmaniasis cutánea localizada. *Bol Malariol San Amb*, 43:9-20.

Young-Ki Parka, Heather E. Rasmussena, Sarah J. Ehlersa, Kara R. Blobauma, Fan Lub, Vicki L. Schlegalc, Timothy P. Carra, Ji-Young Lee, 2007, Repression of proinflammatory gene expression by lipid extract of *Nostoc commune* var *sphaeroides* Kützing, a blue-green alga, via inhibition of nuclear factor- B in RAW 264.7 macrophages, Department of Nutrition and Health Sciences, University of Nebraska, Lincoln, NE 68583, USA, Algaen Corporation, Winston Salem, NC 27101, USA, Department of Food Science and Technology, University of Nebraska, Lincoln, NE 68583, USA.

Yusufzai A. 2006, Mosca infecta a afganos y pakistaníes. OMS. Día de la salud. [serie en Internet] [aprox. 5 p.]. Disponible en: <http://domino.ips.org/ips%5Cesp.nsf/vwWebMainView/373343094C9E29E7C12571480068E94F/?OpenDocument>

Zhang, L.; Gu, F. X.; Chan, J. M.; Wang, A. Z.; Langer, R. S.; Farokhzad, O. C. 2008; Nanoparticles in medicine: therapeutic applications and developments. *Clin. Pharmacol. Ther.*, 83, 761-9.

ANEXOS

1. ANEXO: Resultados estadísticos

1.1 Promastigotes pruebas de viabilidad celular con MTT

Factores inter-sujetos

		Etiqueta del valor	N
Medicación	1	Antimoniato de meglumine	21
	2	Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine	21
	3	Nanoemulsión	18
Dosis Sb v (ug/ml)	75		20
	150		20
	300		20

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Abs 57 nm

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,124(a)	8	,015	24,154	,000
Intersección medicación	,001	1	,001	2,023	,161
dosis	,037	2	,018	28,632	,000
dosis medicación *	,020	2	,010	15,652	,000
dosis	,065	4	,016	25,420	,000
Error	,033	51	,001		
Total	,158	60			
Total corregida	,157	59			

a R cuadrado = ,791 (R cuadrado corregida = ,758)

Abs 570 nm

DHS de Tukey

Medicación	N	Subconjunto		
		1	2	3
Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine	21	-		
Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine	18	,026571	,008278	
Significación	21		,032286	
		1,000	1,000	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,001.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 19,895

b Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c Alfa = ,05.

Abs 570 nm

DHS de Tukey

Dosis Sb v (ug/ml)	N	Subconjunto	
		2	1
300	20	-,022150	
75	20		,013550
150	20		,022050
Significación		1,000	,542

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

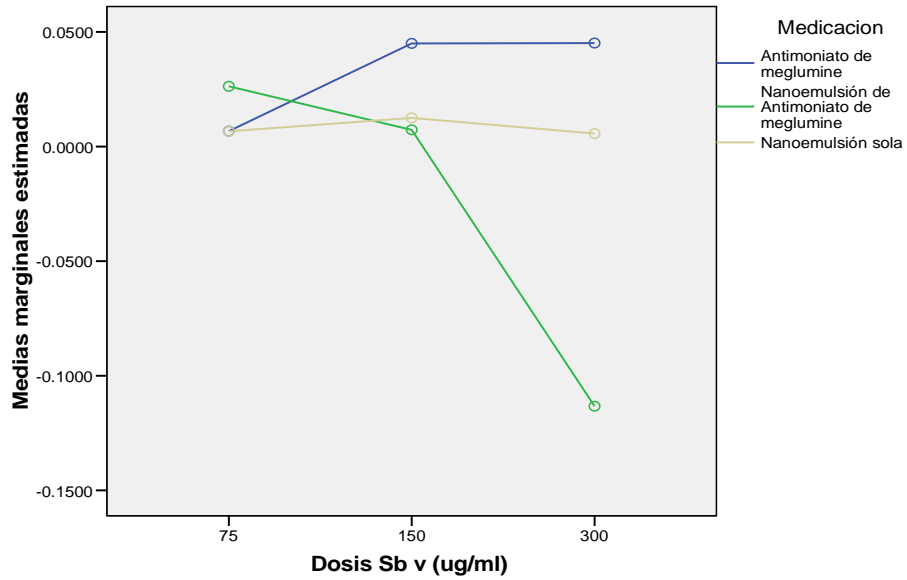
Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,001.

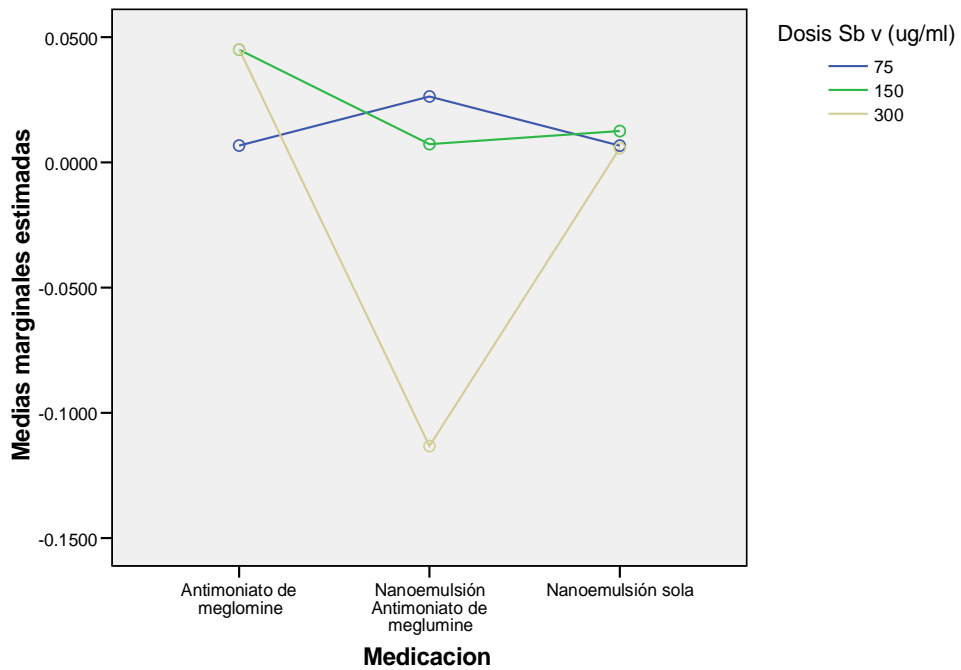
a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 20,000

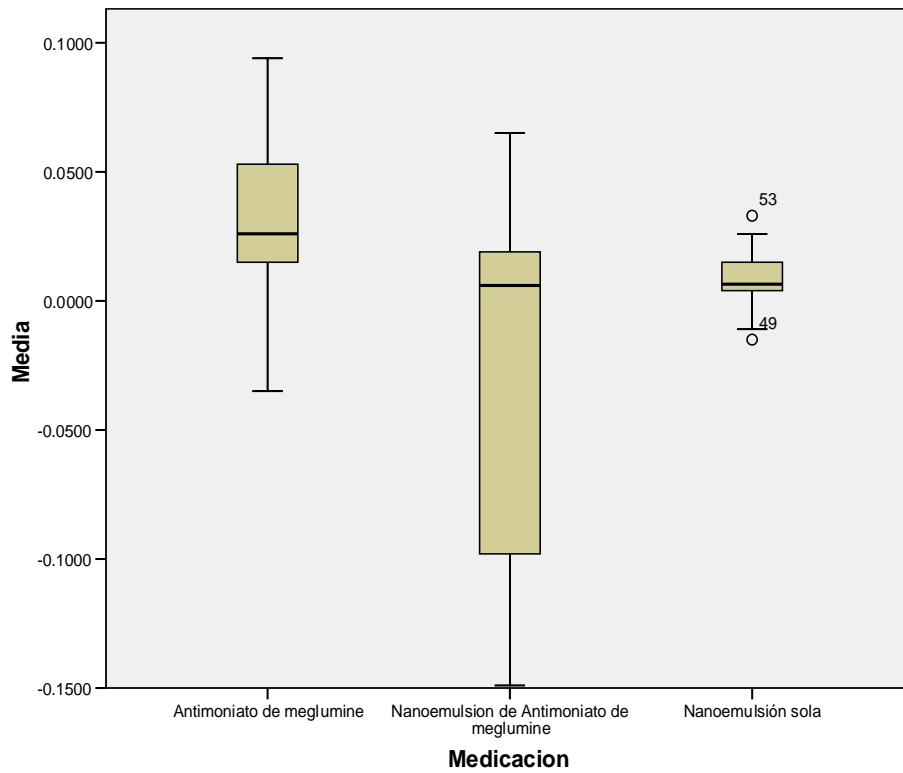
b Alfa = ,05.

Medias marginales estimadas de Abs 570 nm



Medias marginales estimadas de Abs 570 nm





1.2 Amastigotes pruebas de viabilidad celular con MTT

Factores inter-sujetos

	Etiqueta del valor	N
Medicación 1	Antimoniato de meglumine	9
2	Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine	9
3	Nanoemulsión	9
Dosis de Sb v (ug/ml) 75		9
150		9
300		9

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Absorbancia a 570nm

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	,036(a)	8	,005	3,875	,008
Intersección	,001	1	,001	,534	,474
MEDICACION	,017	2	,008	7,149	,005
DOSIS	,010	2	,005	4,279	,030
MEDICACION * DOSIS	,010	4	,002	2,036	,132
Error	,021	18	,001		
Total	,058	27			
Total corregida	,057	26			

a R cuadrado = ,633 (R cuadrado corregida = ,469)

Absorbancia a 570nm

DHS de Tukey

Medicación	N	Subconjunto	
		1	2
Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine	9	-,017667	
Nanoemulsión de Antimoniato de meglumine	9	-,007444	
Significación		,804	1,000

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,001.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,000

b Alfa = ,05.

Absorbancia a 570nm

DHS de Tukey

Dosis de Sb v (ug/ml)	N	Subconjunto	
		2	1
300	9	-,022444	
150	9	,018111	,018111
75	9		,018778
Significación		,054	,999

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

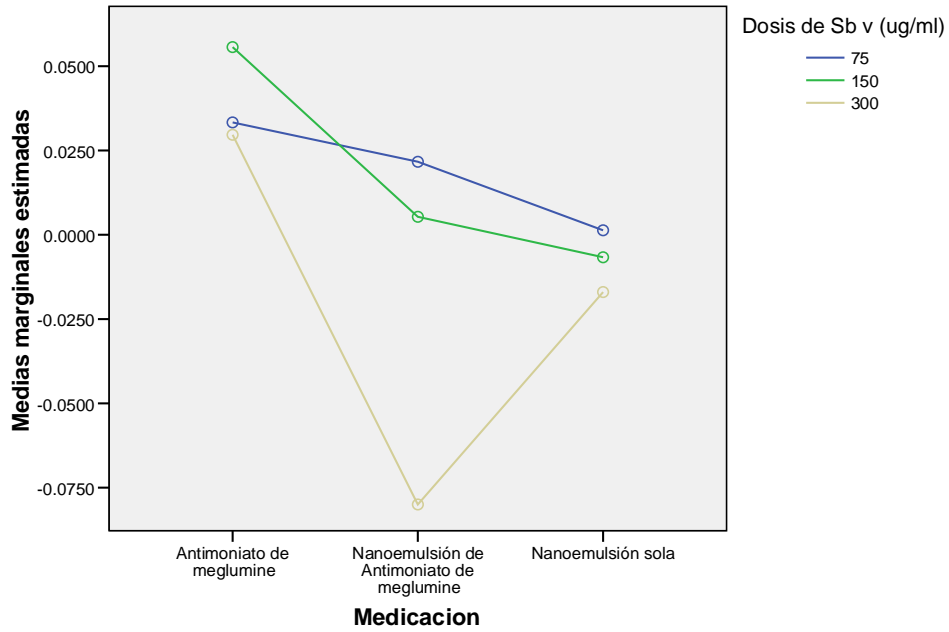
Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = ,001.

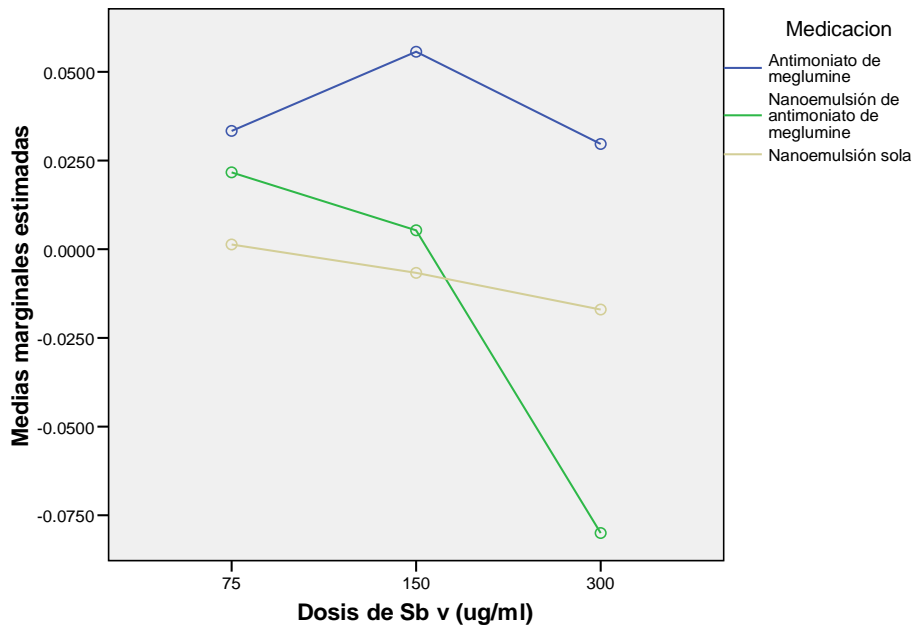
a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 9,000

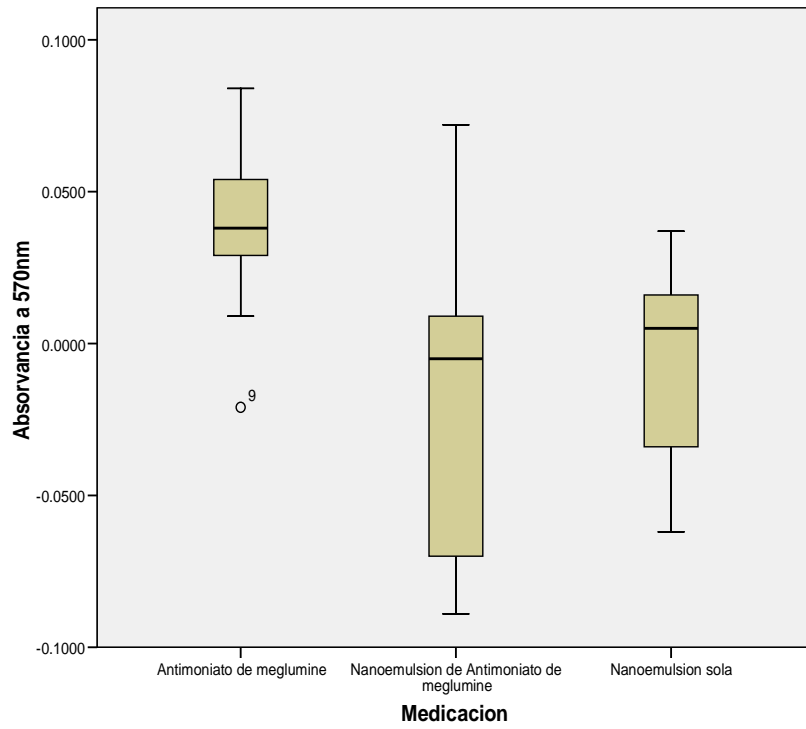
b Alfa = ,05.

Medias marginales estimadas de Absorvancia a 570nm



Medias marginales estimadas de Absorvancia a 570nm





1.3 Amastigotes intracelulares en placa

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Número de amastigotes (parásitos intracelulares) por cada 100 células

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación
Modelo corregido	976377.083(a)	17	57433.946	5.856	.000
Intersección	12462370,083	1	12462370,083	1270.73	.000
Medicación	868360.722	2	434180.361	44.272	.000
Dosis	55533.306	5	11106.661	1.132	.349
Medicación * Dosis	52483.056	10	5248.306	.535	.861
Error	882649.833	90	9807.220		
Total	14321397,000	108			
Total corregida	1859026.917	107			

a R cuadrado = .525 (R cuadrado corregida = .436)

Número de amastigotes (parásitos intracelulares) por cada 100 células

DHS de Tukey

Medicación para combatir el parásito	N	Subconjunto		
		1	2	3
Antimoniato de meglumine	36	229.58		
Nanoemulsión de antimoniato de meglumine	36		340.28	
Nanoemulsión	36			449.22
Significación		1.000	1.000	1.000

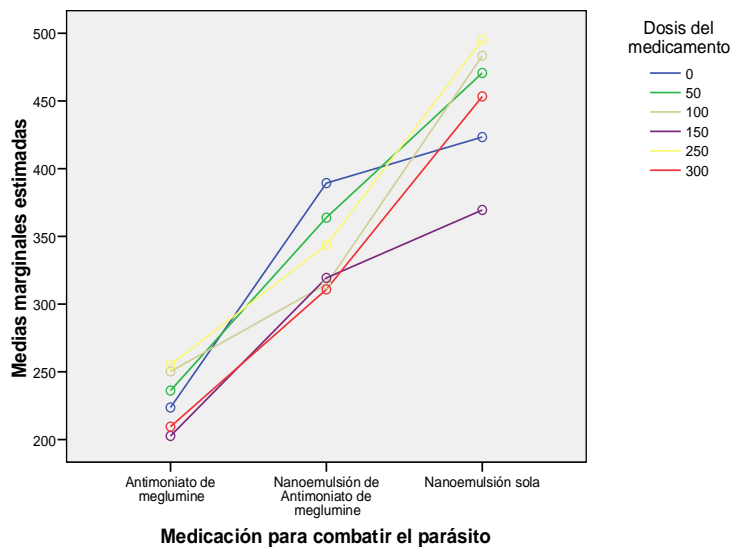
Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 9807.220.

- a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 36.000
- b Alfa = .05.

Medias marginales estimadas de Número de amastigotes (parásitos intracelulares) por cada 100 células



1.4 Análisis PCR- Tiempo Real

Factores inter-sujetos

		Etiqueta del valor	N
Medicación	1	Antimoniato de meglumine	5
	2	Nanoemulsión de antimoniato de meglumine	5
	3	Nanoemulsión	2
Dosis	50		2
	150		5
	300		5

Pruebas de los efectos inter-sujetos

Variable dependiente: Parásitos

Fuente	Suma de cuadrados tipo III	gl	Media cuadrática	F	Significación	Eta al cuadrado parcial	Parámetro de no centralidad	Potencia observada(a)
Modelo corregido	94447,517(b)	7	134924,931	1,897	,280	,769	13,282	,247
Intersección medicación	45179,451	1	451796,451	63,534	,001	,941	63,534	1,000
dosis	11609,124	2	580458,062	,816	,504	,290	1,633	,117
medicación * dosis	35428,815	2	177143,908	2,491	,198	,555	4,982	,263
Error	60011,194	3	200038,732	2,813	,172	,678	8,439	,313
Total	28444,870	4	711107,718					
Total corregida	59473,868	12						
	12289,387	11						

a Calculado con alfa = ,05

b R cuadrado = ,769 (R cuadrado corregida = ,363)

Parásitos

DHS de Tukey

Medicación	N	Subconjunto
		o
		1
Antimoniato de meglumine	5	187766,6660
Nanoemulsión de antimoniato de meglumine	5	201166,9640
Nanoemulsión	2	217424,8100
Significación		,895

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 7111073222,718.

a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,333

b Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c Alfa = ,05.

Parásitos

DHS de Tukey

Dosis	N	Subconjunto
	1	1
300	5	157446,4120
150	5	197519,6420
50	2	302343,7500
Significación		,181

Se muestran las medias para los grupos en subconjuntos homogéneos.

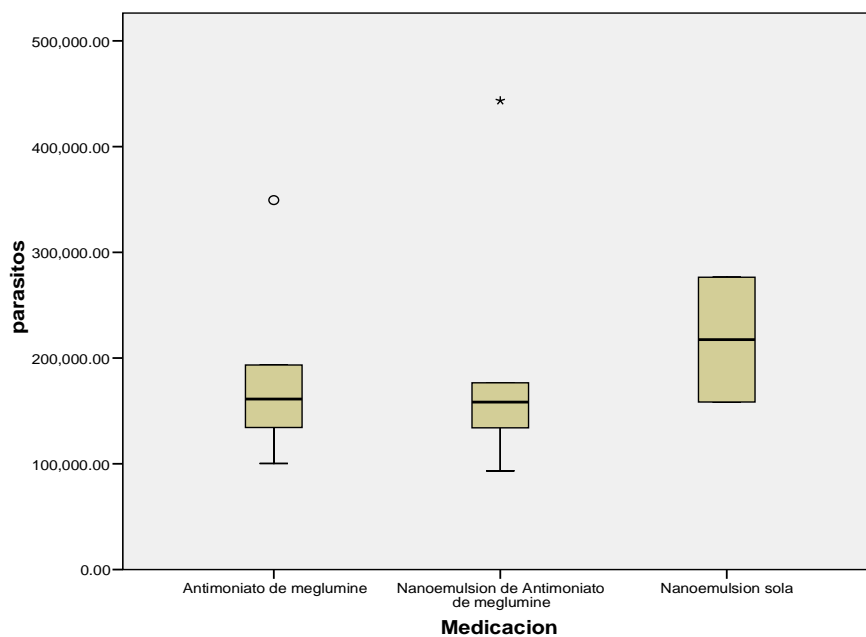
Basado en la suma de cuadrados tipo III

El término error es la Media cuadrática (Error) = 7111073222,718.

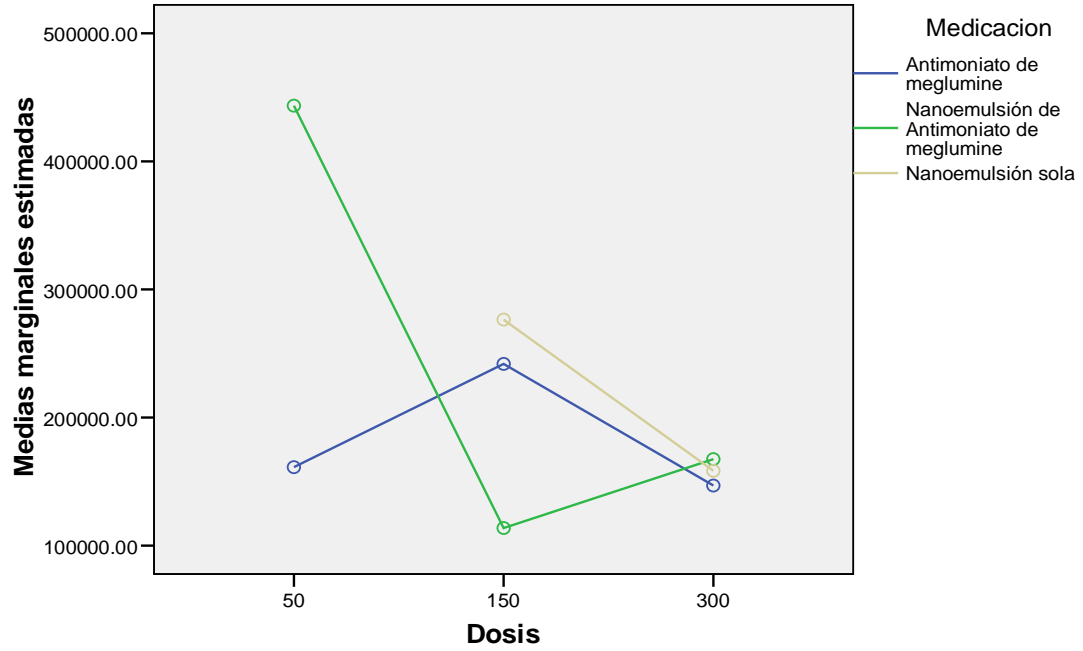
a Usa el tamaño muestral de la media armónica = 3,333

b Los tamaños de los grupos son distintos. Se empleará la media armónica de los tamaños de los grupos. No se garantizan los niveles de error tipo I.

c Alfa = ,05.



Medias marginales estimadas de parasitos



Las medias no estimables no se representan



*Your complimentary
use period has ended.
Thank you for using
PDF Complete.*

[Click Here to upgrade to
Unlimited Pages and Expanded Features](#)

2. ANEXO: Análisis LightCycler