

**ACTIVIDAD DE NANOTUBOS DE CARBONO ACOPLADOS A ÁCIDO FÓLICO
CONTRA *Leishmania panamensis* DESPUÉS DE IRRADIACIÓN CON LUZ
INFRARROJA CERCANA**

LEIDY VIVIANA NOVOA LIZARAZO

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2012**

**ACTIVIDAD DE NANOTUBOS DE CARBONO ACOPLADOS A ÁCIDO FÓLICO
CONTRA *Leishmania panamensis* DESPUÉS DE IRRADIACIÓN CON LUZ
INFRARROJA CERCANA**

LEIDY VIVIANA NOVOA LIZARAZO

Trabajo de investigación para optar al título de
Maestro en Ciencias Básicas Biomédicas

Directora:

PATRICIA ESCOBAR RIVERO
Bacterióloga, M.Sc., Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA

2012

Este trabajo está dedicado a Dios
y a mis mayores fuentes de orgullo e inspiración ...

...A mis Padres

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, a Doctora Patricia Escobar, por sus enseñanzas, consejos, apoyo y paciencia en mi proceso de formación profesional y personal.

A mis padres, por sus infinitos cuidados y eterno amor

A mis amigos de siempre, Mayte, Roció, Oscar y a mis nuevos y eternos amigos, compañeros “quinta cohorte y asociada”, Mayra, Linda, Juan Guillermo, Laurentino, y Luisa, por su amistad, enseñanzas de vida, compañerismo y sincero cariño.

Al profesor Fernando Martínez Ortega y el estudiante de Doctorado John Castillo por el apoyo en la preparación y caracterización de los conjugados de NTC, de igual forma al profesor, Enrique Mejía por la orientación científica en su área y el prestamos de la fuente de irradiación.

Al Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales, al Centro de investigación en Catálisis, y a todas las personas que nutren estos centros, por facilitar el espacio, colaborar en la realización de los experimentos y apoyar el proceso de investigación.

A COLCIENCIAS por la financiación de este trabajo.

A la Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, su profesores y personal administrativo por toda su colaboración, en mi formación y e la realización de este proyecto.

Y muy especialmente a Javi por su paciencia.

CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	19
1 MARCO TEÓRICO Y/O ESTADO DEL ARTE	23
1.1 Leishmaniasis: Parásito y enfermedad	23
1.2 Tratamiento de la leishmaniasis.....	32
1.2.1 Tratamientos sistémicos:	33
1.2.2 Tratamientos Tópicos.	37
1.2.3 Tratamientos físicos.....	40
1.3 Uso de nanotecnología en medicina	43
1.3.1 Uso de la nanotecnología en leishmaniasis.....	47
1.4 Nanotubos de carbono (NTC).....	49
1.4.1 NTC como nanovectores	51
1.4.2 Funcionalización de NTC.....	52
1.4.3 NTC y la activación por IRC.	56
1.5 Fuentes de Irradiación	56
1.5.1 Efecto de NTC activados con IRC en cáncer	57
1.5.2 Efecto de NTC activados con IRC en microorganismos.....	58
1.5.3 Efecto de NTC activados con IRC en <i>Leishmania</i>	58
2 OBJETIVOS	59
2.1 OBJETIVO GENERAL	59
2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	59
3 PREGUNTA DE INVESTIGACION	60
4 HIPOTESIS	60
5 MATERIALES Y METODOS	61
5.1 ASPECTOS METODOLOGICOS	61
5.2 COMPUESTOS Y REACTIVOS	61
5.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CON NTCS.....	64
5.4 PARÁSITOS Y LINEAS CELULARES	65
5.5 DETERMINACION DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FIJADORAS DE FOLATO (PFF).	66
5.6 ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN.....	68
5.7 REGISTRO FOTOGRÁFICO.....	68
5.8 SISTEMA DE IRRADIACIÓN.....	68

5.9	EFFECTO DEL IRC EN LAS CELULAS	69
5.10	PRUEBA DE TOXICIDAD EN CÉLULAS DE MAMÍFERO	70
5.11	ACTIVIDAD FOTOTÓXICA.....	71
5.12	Prueba de fototoxicidad en células de mamíferos.....	71
5.13	Ensayos en promastigotes de <i>L. panamensis</i>	72
5.14	Ensayos de toxicidad en amastigotes intracelulares de <i>L panamensis</i> . 72	
5.15	ANALISIS DE RESULTADOS	73
6	RESULTADOS.....	75
6.1	ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES DE NTC	75
6.1.1	Los NTC-Ch fueron solubles en soluciones acuosas.....	75
6.1.2	Los NTC-Ch-AF fueron solubles y estables en soluciones acuosas pero presentaron una alta toxicidad en células.....	76
6.1.3	La solución de NTC-AF tuvo una alta concentración de NTC, fue soluble en soluciones acuosas y estables en el tiempo.	77
6.2	EXPRESIÓN DE PROTEINAS LIGADORAS DE FOLATO.	77
6.2.1	Los promastigotes de <i>L. panamensis</i> presentaron una alta expresión de PFF.	78
6.2.2	Las células THP-1 mostraron una baja expresión de PFF.....	78
6.2.3	Las células THP-1 infectadas con <i>L. panamensis</i> muestran una moderada expresión de PFF	78
6.2.4	Las células THP-1 con limitación de AF, sobreexpresaron PFF.....	79
6.2.5	La infección con amastigotes de <i>L. panamensis</i> aumenta moderadamente la expresión de PFF en las células hospedero.	84
6.3	INTERINTERNALIZACIÓN DE SOLUCIONES DE NTC EN CELULAS DE MAMIFERO	85
6.3.1	El porcentaje de internalización de NTC-Ch en células HOS y THP-1 aumenta a través del tiempo.	85
6.3.2	El porcentaje de internalización de NTC-Ch y NTCAF en células HOS es dependiente de la concentración de NTC.....	85
6.3.3	Los NTC fueron internalizados en células THP-1 con variación en los conjugados y concentraciones probadas a través del tiempo.	87
6.4	ANALISIS CUALITATIVO DEL REGISTRO FOTOGRAFICO	89
6.4.1	Los conjugados NTC-Ch se localizaron en agrupaciones en el citoplasma celular.....	89
6.4.2	La internalización de los conjugados de NTC en células HOS mostraron formación de una vacuola única y definida.....	89

6.4.3	El conjugado NTC-AF mostró una ubicación intracelular más definida en células THP-1 que el NTC-Ch.	89
6.5	ANALISIS ESTADISTICO DE LA INTERNALIZACION	96
6.5.1	El porcentaje de internalización en cada tipo celular varía según el conjugado aplicado.	96
6.5.2	Diferencias entre tipos celulares.....	96
6.5.3	Los tiempos de incubación influyen en el porcentaje de internalización. 97	
6.5.4	La internalización de los conjugados es dependiente de su concentración.....	98
6.6	IRRADIACION.....	98
6.6.1	El espectro de Luz obtenido de la lámpara comercial abarca el rango de 550 nm a 950 nm.	98
6.6.2	La solución con NTC aumenta su temperatura cuando es irradiada con IRC.	99
6.7	EFEECTO DE LA IRC EN CELULAS Y PROMASTIGOTES	100
6.7.1	Las células HOS y THP-1 no fueron fotosensibles a la irradiación con IRC	100
6.7.2	Los promastigotes de <i>L. panamensis</i> no fueron sensibles a la irradiación con IRC.....	101
6.8	Citotoxicidad en células de mamífero	102
6.8.1	Los conjugados NTC-Ch y NTC-AF no fueron tóxicos en oscuridad. 102	
6.9	TOXICIDAD DE LAS CELULAS Y PROMASTIGOTES.....	103
6.9.1	Las células HOS tratadas con NTC-AF no fueron fotosensibles al IRC. 103	
6.9.2	Las células THP-1 tratadas con NTC-AF no fueron fotosensibles al IRC. 104	
6.9.3	Los porcentajes de muerte celular de promastigotes tratados con NTC-AF e irradiados con IRC no superaron el 10%.	105
6.10	TOXICIDAD EN AMASTIGOTES INTRACELULARES.....	107
7	DISCUSIÓN	108
8	CONCLUSIONES.....	123
9	RECOMENDACIONES	125
10	BIBLIOGRAFIA.....	126

LISTA DE FIGURAS

	Pag.
Figura 1. Esquema taxonómico de <i>Leishmania</i> .	24
Figura 2. Esquema validado por el estudio de <i>hsp70</i> en <i>Leishmania</i>	25
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	28
Figura 4. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.	29
Figura 5. Distribución geográfica de la leishmaniasis.	31
Figura 6. Notificación de casos registrados en Colombia d el 2007 al 2010.	32
Figura 7. Nanotubos de carbono.	50
Figura 8. Representación esquemática de la vía endocítica de GPI-anclas.	55
Figura 9. Diseño experimental.	63
Figura 10. Sistema de Irradiación.	70
Figura 11. Solubilidad de NTC en chitosan y agua.	75
Figura 12. Efecto del carbonato de sodio sobre células HOS.	76
Figura 13. Fotografía de soluciones de NTC.	77
Figura 14. Comparación de la expresión de PFF.	84
Figura 15. Porcentaje de células con internalización de NTC-Ch.	86
Figura 16. Porcentajes de internalización de NTC - Ch y NTC - AF en células HOS.	87
Figura 17. Porcentajes de internalización de NTC - Ch y NTC - AF en células THP-1.	88
Figura 18. Comparación de tipos celulares vs solución de NTC.	97
Figura. 19. Comparación de tiempos de incubación vs porcentaje de internalización.	97
Figura. 20. Comparación de concentraciones versus porcentajes de internalización.	98
Figura 21. Espectro de emisión de lámpara IRC.	99

Figura 22.	Curva de calentamiento.	100
Figura 23.	Efecto de la IRC sobre células de mafireros .	101
Figura 24.	Efecto de la IRC sobre células promastigotes de <i>L. panamensis</i> .	102
Figura 25.	Efecto de la IRC sobre células HOS tratadas con NTC-AF.	104
Figura 26.	Efecto de la IRC sobre células THP-1 tratadas con NTC-AF.	105
Figura 27.	Efecto de la IRC sobre promastigotes de <i>L. panamensis</i> tratados con NTC -AF.	106
Figura 28.	Observación microscópica de amastigotes intracelulares en células antes y después de irradiar.	107
Figura 29.	Estructura química del ácido fólico.	110

LISTA DE TABLAS

	Pag.
Tabla 1. Especies de <i>Leishmania</i> de importancia clínica en humanos.	29
Tabla 2. Estructuras químicas de compuestos utilizados.	67
Tabla 3. Expresión de PRL en promastigotes de <i>L. panamanensis</i>	80
Tabla 4. Expresión de PFF en células THP-1.	81
Tabla 5. Expresión de PFF en células THP-1. Infechadas con <i>L. panamensis</i> .	82
Tabla 6. Expresión de PFF en células THP-1 con limitación de ácido fólico.	83
Tabla 7. Internalización de NTC-Ch en células HOS y THP-1 a través del tiempo.	91
Tabla 8. Internalización de NTC-Ch en células HOS.	92
Tabla 9. Internalización de NTC-AF en células HOS.	93
Tabla 10. Internalización de NTC-Ch en células THP-1.	94
Tabla 11. Internalización de NTC-AF en células THP-1.	95
Tabla 12. Actividad de los conjugados en estudio sobre células HOS y THP-1.	103
Tabla 13. Efecto de la IRC en células infectadas con <i>L. panamensis</i> tratadas con NTC-AF.	107
Tabla 14. Endocitosis de nanopartículas.	119
Tabla 15. Fototoxicidad del IRC en células tratadas con soluciones de NTC	121

ABREVIATURAS

AF	Acido Fólico
AlamarBlue	Azul de alamar
AmB	Anfotericina B
BSA	Albumina bovina sérica
BT1	Transportadores de biopterinas
CC ₅₀	Concentración citotóxica 50
CC ₉₀	Concentración citotóxica 90
Ch	Chitosan
CME	Endocitosis dependiente de clatrina.
DE ₅₀	Dosis efectiva 50
DHFR	Dihidrofolato reductasa
DHFR-TS	Dihidrofolato reductasa thymidilato sintetasa
DMC	2',6'-dihrix-4'-metoxichalona
DMSO	Dimetilsulfóxido
DOS	Densidad de estados
EDC	Carbodimida
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FITC	Isocianato de fluoresceína
FR	Receptor de folatos
FR-C17	Anticuerpo policlonal contra PFF
FS	Fotosensibilizadores
FT1	Transportadores de biopterinas de folato 1
HeLa	Células de carcinoma cervical
HepG2	Células de carcinoma hepato celular humano
HOS	Células de Osteosarcoma
Hsp70	Proteína de choque térmico de 70 kDa
IR	Radiación infraroja
IRC	Infrarrojo cercano

LC	Leishmaniasis Cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LM	Leishmaniasis mucocutanea
LNS-Amb	Anfotericina B cargada en nanoesferas lipidicas
LV	Leishmaniasis visceral
MDR1	Gen de resistencia a multidroga
MIL	Miltefosina
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazon-2-il)-2difeniltetrazolio
NTC	Nanotubos de Carbono
NTC-AF	Nanotubos de carbono funcionalizados a Acido fólico
NTC-Ch	Nanotubos de carbono funcionalizados a Chitosan
NTCM	Nanotubos de carbono de pared multiple
NTCS	Nanotubos de carbono de pared simple
OMS	Organización Mundial de la Salud
PACA	Poliacil-cianoacrilato
PBS	Buffer fosfato salino
PFF	Proteínas fijadoras de folato
PLA	Acido poliláctico
PM	Paramomicina
PMA	Acetato de Forbol miristato
PpIX	Protoporfirina IX
PSS	Poliestireno sulfonato
PVP	Poilivinil pirrolidon
SBFi	Suero bovino fetal inactivado
SbV	Antimoniales pentavalentes
SEM	Microscopia electrónica de barrido
siRNA	RNA de interferencia
TEM	Microscopia electrónica de transmisión
TFD	Terapia fotodinámica
THP-1	Células de leucemia monocitica aguda

TI50	Tiempo inhibitorio 50
TI90	Tiempo inhibitorio 90
WST1	1 [2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-disulfofenil)-2H tetrazolio

RESUMEN

TITULO: ACTIVIDAD DE NANOTUBOS DE CARBONO ACOPLADOS A ÁCIDO FÓLICO CONTRA *Leishmania panamensis* DESPUÉS DE IRRADIACIÓN CON LUZ INFRARROJA CERCANA*

AUTORES: NOVOA LIZARAZO, Leidy Viviana**

PALABRAS CLAVES: Nanotubos de Carbono, Infrarrojo cercano, Acido fólico, Proteínas ligadoras de folato, *Leishmania*.

La leishmaniasis cutánea (LC) es la forma de leishmaniasis prevalente en Colombia. El tratamiento se basa en el uso de antimoniales pentavalentes (Sb^V, Glucantime[®]) y en segunda opción de la anfotericina B (AmB), la pentamidina, la paramomicina (PM) y la miltefosina (MIL), todos presentan complicaciones como toxicidad y efectos secundarios no deseables, vías de administración dolorosas, eficacia variable y resistencia. Una alternativa de tratamiento en LC podría ser la utilización de nanocompuestos como los nanotubos de carbono (NTC). El objetivo de este trabajo fue determinar las características biológicas y la actividad anti-*Leishmania* de nanotubos de carbono acoplados con ácido fólico (NTC-AF) después de la irradiación con infrarrojo cercano (IRC)

Se prepararon mezclas solubles en soluciones acuosas de NTC funcionalizados a quitosan (Ch) y ácido fólico (AF), se evaluó la internalización de estas soluciones en células HOS y THP-1 por el método de Giemsa, se determinó por fluorescencia la expresión de proteínas ligadoras de folato (PFF) en células infectadas, no infectadas de THP-1 y promastigotes de *Leishmania*, la citotoxicidad con y sin IRC fue evaluada por los métodos de AlamarBlue y MTT.

Se obtuvo NTC solubles y estables una semana en soluciones acuosas funcionalizados con AF y Ch; se demostró la mayor expresión de PFF en células THP-1 infectadas con *L. panamensis* en comparación con las mismas células sin infectar, también se demostró la expresión de PFF en la base del flagelo de los promastigotes de *L. panamensis*, la internalización de los conjugados NTC-AF y NTC-Ch son dependientes de la concentración y del tiempo, ninguno de los conjugados probados presentaron citotoxicidad en concentraciones tan altas como 330 µg/mL de NTC, el IRC aplicado con lámpara infrarroja sobre células infectadas y no infectadas tratadas con NTC-AF no fue fototóxica en la mayoría de los experimentos realizados.

*Tesis de grado. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

**Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Directora: PhD Patricia Escobar Rivero

ABSTRACT

TITLE: ACTIVITY OF CARBON NANOTUBES COUPLED TO FOLIC ACID AGAINST *Leishmania panamensis* AFTER IRRADIATION WITH NEAR INFRARED LIGHT*

AUTHORS: NOVOA LIZARAZO, Leidy Viviana**

KEY WORDS: Carbon Nanotubes, Near Infrared, folic acid, folate-binding protein, *Leishmania*.

Cutaneous leishmaniasis (CL) is the prevalent form of leishmaniasis in Colombia. The treatment is based on the use of pentavalent antimony (SbV, Glucantime ®) and second choice of amphotericin B (AmB), pentamidine, the paromomycin (PM) and miltefosine (MIL), all complications such as toxicity and undesirable side painful routes of administration, efficacy and resistance variable. An alternative treatment in CL could be the use of nanocomposites as carbon nanotubes (CNT). The aim of this study was to determine the biological and anti-*Leishmania* activity of carbon nanotubes coupled with folic acid (CNT-FA) after irradiation with near infrared (NIR).

Mixtures soluble in aqueous solutions to CNT functionalized chitosan (Ch) and folic acid(FA), we assessed the internalization of these solutions in HOS and THP-1 cells by Giemsa method. The folate-binding protein expression (FBP) was determined in infected cells, uninfected THP-1 and *Leishmania* promastigotes by fluorescence. The cytotoxicity with and without CNT was assessed by the AlamarBlue and MTT tests.

The CNT functionalized with Ch and FA were soluble and stable in aqueous solutions for one week. We demonstrated an increased expression of FBP in THP-1 cells infected with *L. panamensis* compared with the same uninfected cells; also it was demonstrated expression of FBP at the base of the flagellum of promastigotes *L. panamensis*. The internalization of the conjugates CNT-Ch and CNT-FA were dependent of the concentration and incubation time. None of the conjugates showed cytotoxicity at concentrations as high as 330 ug / mL of CNT. The NIR applied in cells infected and uninfected with CNT-FA was not phototoxic in most experiments.

* Work degree

** Health Faculty. Basic Science Department. Master in Basic Biomedical Sciences. Director: Ph.D. Patricia Escobar Rivero

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que afecta piel mucosas y vísceras se encuentra ampliamente distribuida en el mundo, es producida por parásitos del genero *Leishmania*, y se transmite por la picadura de mosquitos hembras de la familia phemotomine, actualmente se reconoce mas de 20 especies patógenas para el humano y 30 especies de mosquitos que sirven como vector. (Desjeux ., 2004; Reithinger et al., 2007).

La leishmaniasis afecta a 88 países: 72 de ellos en vía de desarrollo y 13 subdesarrollados, las formas clínicas de la leishmaniasis son particularmente diversas, produciendo un complejo de enfermedades que son: La leshmaniasis visceral (LV), la cual es usualmente fatal sin tratamiento y que se encuentra en 65 países del mundo, el 90% de los casos se encuentra en Bangladesh, India, Nepal, Sudan y Brazil, la leishmaniasis cutánea (LC) donde el 90% de los casos ocurren en 7 países principalmente: Afganistán, Algeria, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria, también existe la leishmaniasis muco-cutánea, y la leishmaniasis cutánea difusa. (Desjeux., 2004; Pavli y Maltezou., 2010, OMS., 2010)

La LC es la forma de leishmaniasis prevalente en Colombia (Instituto Nacional de Salud. 2009). El tratamiento se basa en el uso de antimoniales pentavalentes (Sb^V , Glucantime[®]); y en segunda opción la anfotericina B (AmB), pentamidina, paramomicina (PM) y miltefosina (MIL). Todos presentan complicaciones como: toxicidad, efectos secundarios no deseables, vías de administración dolorosas, eficacia variable, además de la resistencia a los Sb^V (Croft et al., 2005, Ouellette et al., 2004, Faraut-Gambarelli et al., 1997). No existe una vacuna y los métodos orientados al control del vector han sido deficientes lo que obliga a seguir buscando alternativas terapéuticas.

Los tratamientos tópicos en LC constituyen una alternativa. Resultados promisorios se han encontrado con inyecciones intralesionales de Sb^V, el uso tópico de AmB y PM, la termoterapia y la terapia fotodinámica (Minodier y Parola., 2007).

Una alternativa de tratamiento en LC podría ser la utilización de nanocompuestos, que se desarrollan en una nueva ciencia a la que se le ha llamado, Nanomedicina, esta se define como la ciencia del diagnóstico, tratamiento y prevención de enfermedades usando biología molecular, combinada con nanotecnología (Datta y Jaitawat., 2005).

Son variados los nanocompuestos utilizados en medicina, entre estos tenemos: quantum dots, nanopartículas fluorescentes, liposomas, magnetoliposomas, dendrímeros, fulerenos, entre otros; utilizados como herramientas de liberación de drogas, imagen diagnóstica, producción de biomateriales compatibles etc (Borm y Shulte., 2006); y en enfermedades como, cáncer (Brigger et al., 2002; Shi et al., 2005; Wang et al., 2011); Micosis (Fukui et al., 2003); Chagas (Romero y Morilla., 2010), Malaria (Santos-Magalhães y Furtado Mosqueira., 2010), Leishmaniasis (Lopes et al.,2011), entre otras.

Dentro de los nanomateriales que pueden ser usados en presentaciones tópicas para el tratamiento de la leishmaniasis, se encuentra los NTC, estos pertenecen a la familia de los fulerenos, están compuestos en su totalidad por moléculas de carbono, dispuestas en formas hexagonales y heptagonales (Foldvari y Bogonluri., 2008), poseen características especiales que los hacen buenos candidatos para el tratamiento de algunas enfermedades, como su relación superficie radio de masa (Borm y Müller-Schulte 2006), además, los NTC pueden ser activados, con irradiaciones del orden del infrarrojo cercano o con radiofrecuencia, generando cambios electrónicos que producen calentamiento de su estructura (Shi et al.,

2005). Estas características pueden ser manipuladas para la generación de tratamientos contra la LC.

Los NTC, serían aplicados en formulaciones tópicas y una vez internalizados por las células infectadas podrían ser activados por un efecto foto físico, como la radiación infrarroja cercana (IRC), inocua para el ser humano, pero que puede generar un sobrecalentamiento localizado inducido por el NTC que llevaría a la muerte del parásito (Kam et al., 2005). Para mejorar la selectividad del sistema, los NTC podrían ser acoplados a ligandos de receptores encontrados en las células infectadas, como en este caso al ácido fólico (AF), dando como resultado moléculas de NTC-AF, los cuales podrían ser reconocidos por los receptores de AF presentes en las células.

Basados en los antecedentes, anteriormente descritos se planteó como objetivo general de este trabajo: determinar la actividad anti-*Leishmania* de nanotubos de carbono acoplados con ácido fólico, después de la irradiación con infrarrojo cercano (IRC).

Para esto se utilizó una metodología orientada inicialmente a la preparación y caracterización de NTC que fueran solubles en soluciones acuosas, estériles y de concentración conocida para ser usados en sistemas biológicos como el modelo *Leishmania*.

Se evaluó una posible vía de internalización de los compuestos mediada por receptor de ácido fólico (rAF), determinando por fluorescencia, la expresión de proteínas fijadoras de folato (PFF). Se determinó la internalización de los NTC y su toxicidad en oscuridad y después de irradiación con IRC.

Fue necesario estandarizar las técnicas anteriores y adaptarlas al modelo de *Leishmania*. Se estandarizaron las técnicas de preparación y funcionalización de

NTC con chitosan (Ch) y AF, la medición cualitativa por fluorescencia de PFF a través de anticuerpos, la internalización por el método de Giemsa, la citotoxicidad por el método fluorométrico de Azul de Alamar y el sistema de irradiación con IRC utilizando una lámpara comercial.

Los resultados presentados en este estudio plantearon los lineamientos sobre la forma en que interactúan los NTC en el modelo de *Leishmania*, partiendo de un sistema no tóxico para las células en oscuridad capaz de determinar su efectividad o no contra parásitos de *Leishmania* después de irradiación con IRC.

Se determinaron también cualitativamente la expresión de PFF tanto en las células hospedero de *Leishmania* como el parásito mismo, proponiéndose este receptor como una vía alternativa que puede ser evaluada en ensayos posteriores.

1 MARCO TEÓRICO Y/O ESTADO DEL ARTE

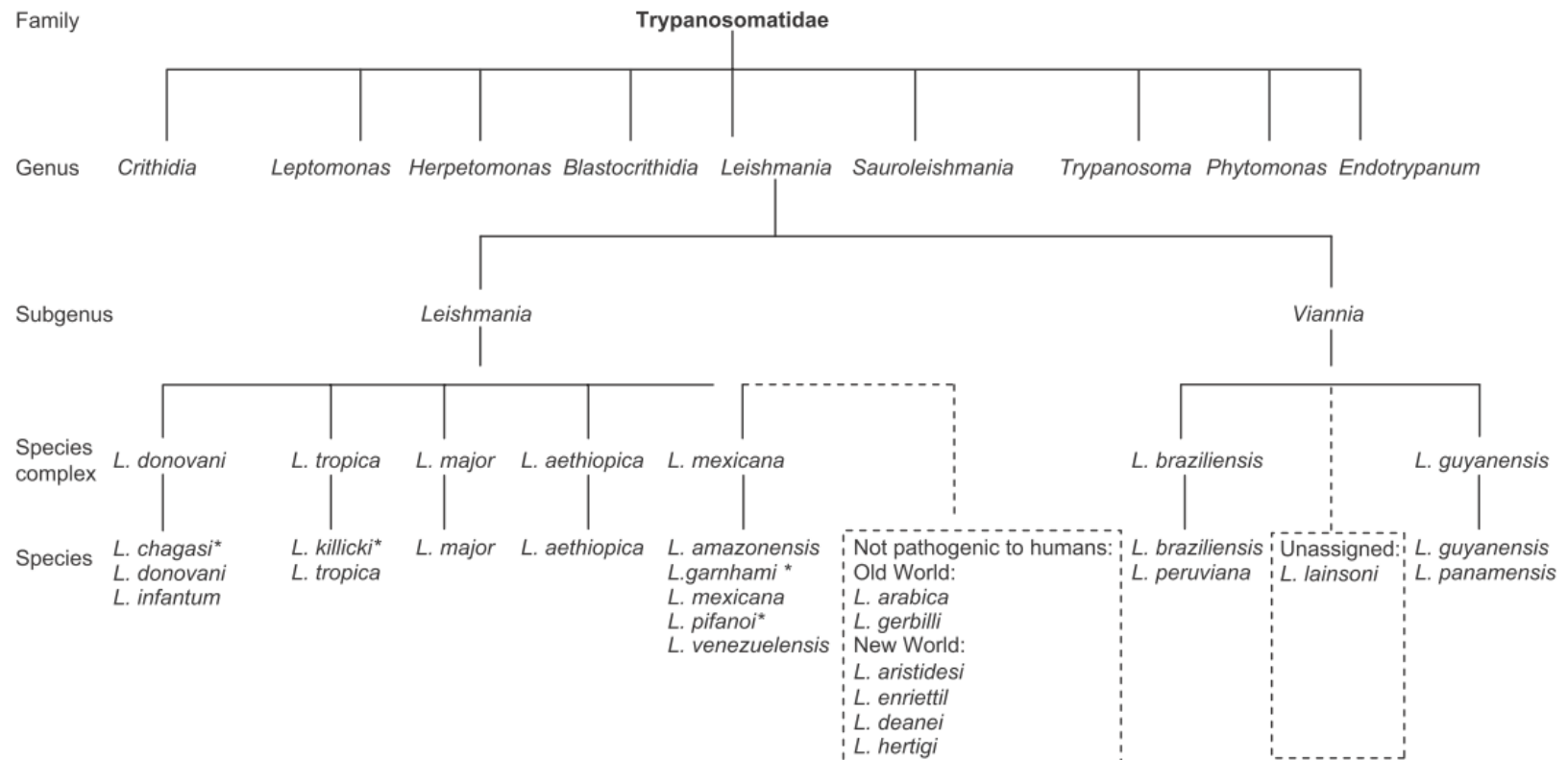
1.1 Leishmaniasis: Parásito y enfermedad

La leishmaniasis es una enfermedad que afecta la piel, las mucosas o vísceras, resultante del parasitismo de los macrófagos por protozoarios flagelados del orden Kinetoplastida, familia Trypanosomatidae, del género *Leishmania*. Se conocen alrededor de 30 especies de las cuales al menos 10 son causantes de la enfermedad en humanos. (Pearson, et al. 1981; Arias, et al. 1996; Love, et al. 1998).

La clasificación filogenética más común divide el género *Leishmania* en diferentes complejos de acuerdo a características moleculares, biológicas y genéticas (**Figura 1**). (Chan-Bacab y Pena-Rodriguez 2001). Sin embargo, en estudios más recientes publicados en 2010 por Fraga y colaboradores utilizan la expresión de la proteína de choque térmico de 70 kDa (*hsp70*) la cual se conserva a través de procariotas y eucariotas para analizar la taxonomía de *Leishmania*, llegando a proponer eliminar el concepto de complejo, dado que según sus resultados, ninguno de estos parece estar compuesto por entidades monofiléticas separadas, es decir, no proceden de líneas ancestrales diferentes, apoyando de esta forma la existencia de solo nueve especies relevantes (**Figura 2**) (Fraga, et al. 2010).

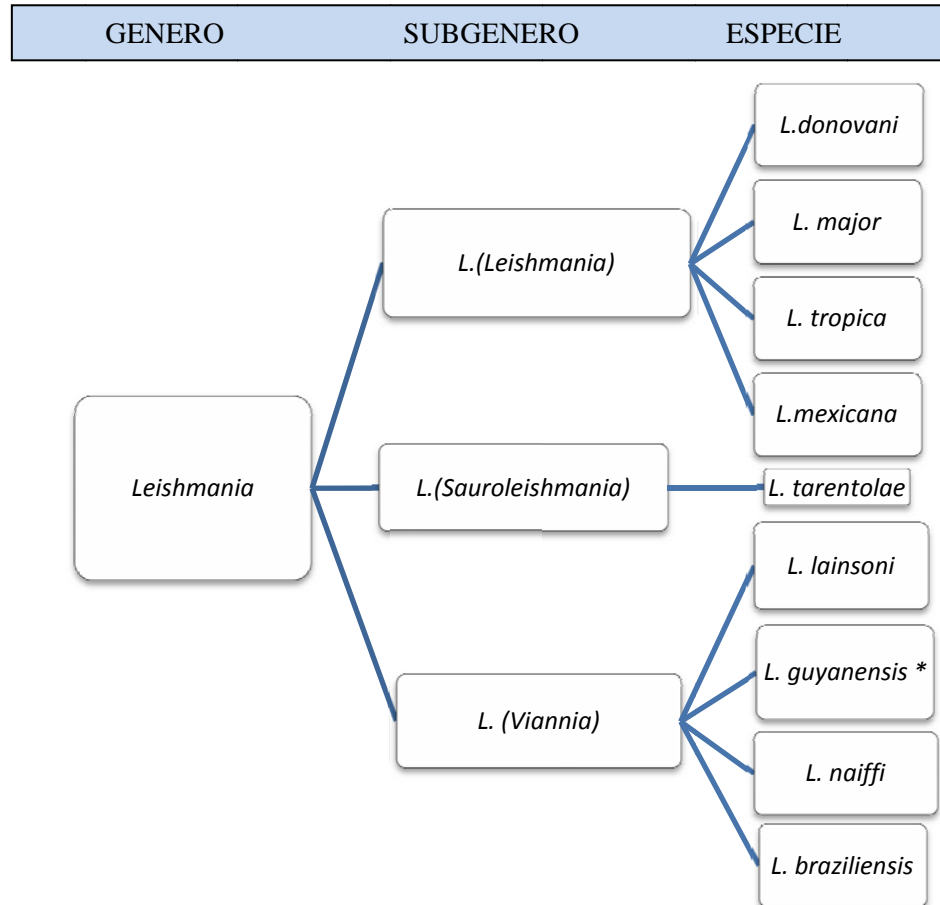
Todas las especies de *Leishmania* son morfológicamente similares y poseen básicamente dos formas principales en su ciclo biológico: los amastigotes que son formas redondeadas con una longitud de 3-5 μm y un ancho de 1,5-2,5 μm , sin flagelo visible, numerosos ribosomas, prominente mitocondria, núcleo, kinetoplasto, barra paraflagelar y aparato de Golgi bien desarrollado. Es una forma metabólicamente activa, con capacidad de división y las cuales residen en los macrófagos de hospederos vertebrados.

Figura 1. Esquema taxonómico de *Leishmania*.



Fuente: reporte técnico Organización Mundial de la Salud, Marzo 2010

Figura2. Esquema validado por el estudio de *hsp70* en *Leishmania*.



Modificado de Fraga et al. 2010. (*) Comprende la subespecie de *L. guyanensis panamensis*.

La segunda forma de vida son los promastigotes, de manera general, son formas ovoides, alargadas, poseen flagelo, abundantes lípidos, bolsillo flagelar, kinetoplasto y núcleo. Su tamaño puede variar entre 6 a 12 μm , pasan por varias etapas de desarrollo mientras migran por las diferentes zonas del intestino del vector flebotomino. Se podrían dividir en: promastigotes con capacidad de división, llamados promastigotes procíclicos, promastigotes leptomonad; y promastigotes sin capacidad de división: como la etapa nectomonad y los promastigotes metacíclicos. Estos últimos poseen la mayor infectividad debido al aumento del volumen del lipofosfoglicano (LPG) que los hace resistentes a la lisis

mediada por complemento. (Rogers, et al. 2002; Gossage, et al. 2003; Bates y Rogers 2004).

El ciclo de vida del parásito inicia, cuando hembras de diferentes especies de *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomia* (Nuevo Mundo) pertenecientes al orden díptera y a la subfamilia Phebotominae, buscan una ingesta sanguínea para la maduración de sus huevos. El mosquito pica a un hospedero vertebrado, para adquirir sangre, de esta forma toma el parásito el cual se encuentra en su forma amastigota, dentro de células del sistema fagocítico-mononuclear (de Almeida, et al. 2003).

Una parte de los parásitos ingeridos mueren y los restantes se transforman en la primera etapa morfológica, los promastigotes procíclicos, que se encuentran en el intestino medio abdominal, en este momento el parásito es metabólicamente activo y tiene capacidad de replicación, aumentando su número. Cuando la sangre es completamente digerida el parásito comienza a alimentarse de azúcares migrando a la parte anterior y transformándose en promastigotes nectomonad, una etapa sin división que se acumulan en la parte anterior del intestino medio abdominal, favoreciendo la migración al intestino medio torácico, donde se diferencia en formas leptomonad, metabólicamente activos y con capacidad de división. (Rogers, et al. 2002; Gossage, et al. 2003; Bates 2007).

Estos promastigotes leptomonad son los precursores de los metacíclicos y de las formas secretoras de gel, estos últimos muy importantes, pues forman un tampón gelatinoso que obstruye el intestino del vector, obligando al mosquito, durante la alimentación con sangre, a regurgitar los promastigotes dentro de la herida formada por la picadura. (Rogers, et al. 2002; Gossage, et al. 2003; Bates 2007).

En el humano los promastigotes evaden la defensa inmunológica del hospedero, resisten la lisis mediada por complemento y se introducen en macrófagos por

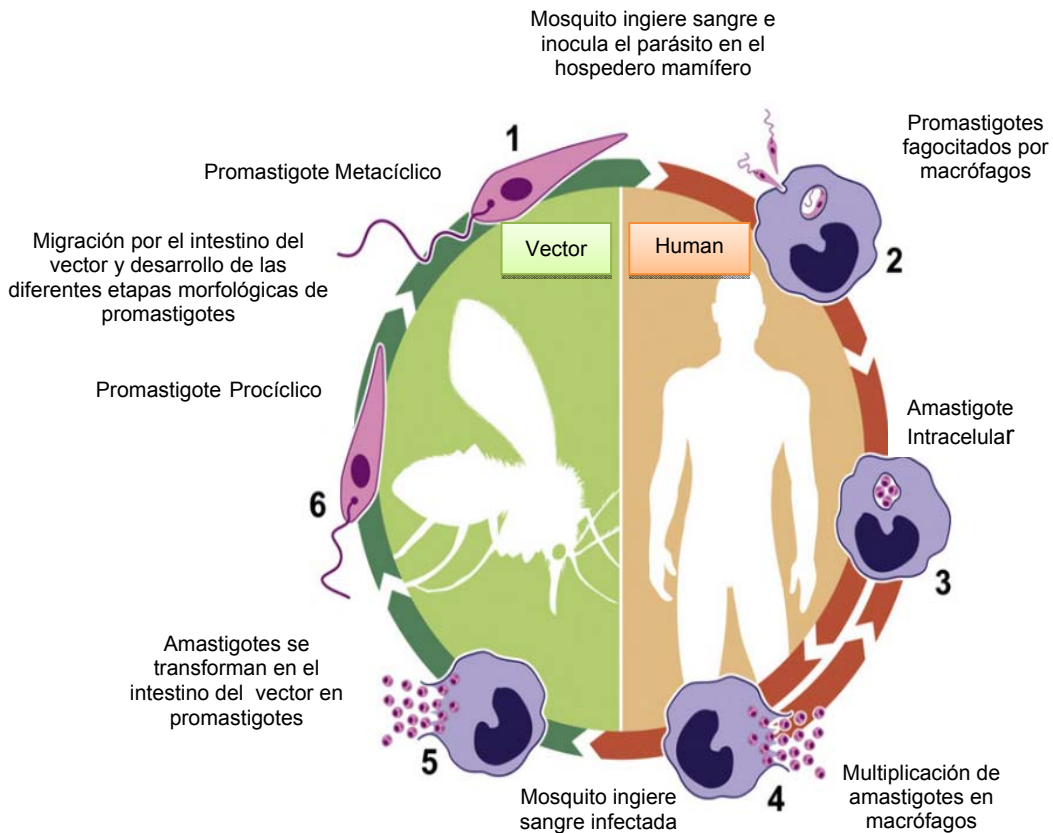
procesos mediados por receptores (Descoteaux y Turco 1999). Al internalizarse son englobados por fagosomas, después se fusiona con lisosomas y endosomas formando el fagolisosoma, que mantienen un pH alrededor de 5. En estos compartimientos se transforman en amastigotes, una forma del parásito adaptada a sobrevivir en ambientes ácidos.(Kane y Mosser 2000; Burchmore y Barrett 2001; de Almeida, et al. 2003).

Existe evidencia documentada de cómo los amastigotes pueden trastornar el sistema de endocitosis de la célula hospedero para adquirir nutrientes, como lo revisa Burchmore y Barret, quienes informaron el caso particular de la transferrina, un nutriente necesario para que los amastigotes usen como fuente de hierro. (Burchmore y Barrett 2001). De esta forma adquieren los nutrientes para sobrevivir, se multiplican dentro del macrófago hasta lisis la célula y allí infectan nuevos macrófagos, o bien se diseminan a través de la piel o la circulación cutánea hasta alcanzar las mucosas y continuar el ciclo. (**Figura 3**)

Las formas clínicas de la leishmaniasis pueden ser agrupadas en un complejo de enfermedades que son: la LC (**Figura 4a**) caracterizada por producir una lesión ulcerada, que se desarrolla en el lugar de la picadura. Pueden ser lesiones cerradas como pápulas, nódulos y placas, hasta la formación de úlceras redondeadas, de bordes elevados, eritematosos, acordonados, con centro granulomatoso limpio y base infiltrada, regularmente indoloras (Romero y Sanchez 2007, guía de atención de la leishmaniasis., 2010).

En algunos casos la enfermedad evoluciona hacia una forma infiltrada, no ulcerada conocida como leishmaniasis cutánea difusa (LCD, **Figura 4b**), más común en individuos con una respuesta inmune mediada por células defectuosa (Desjeux 2004). También puede invadir mucosas forma conocida con el nombre de leishmaniasis mucocutánea (LM, Figura 4c), comprometiendo en especial el tabique nasal, la faringe, paladar, amígdalas y laringe algunas veces aparecen

Figura 3. Ciclo de vida de *Leishmania*.



Modificado de Cuervo et al., 2010. (Cuervo, Domont et al. 2010)

lesiones externas en mucosas de nariz o labios, estas ocurren como resultado de la diseminación linfohematógena del parásito. Existe una forma clínica que compromete órganos internos conocida como “Kala Azar” o leishmaniasis visceral (LV, Figura 4d), usualmente tiene un curso crónico, que puede ser fatal sin tratamiento y se manifiesta con esplenomegalia marcada, hepatomegalia, leucopenia, trombocitopenia, anemia, pérdida de peso y debilidad progresiva (Desjeux 2004; Piscopo y Mallia Azzopardi 2007; Romero y Sanchez 2007). Las manifestaciones clínicas de esta enfermedad son producidas por diferentes especies de *Leishmania*, que son transmitidas por una variedad de especies de vectores, de igual forma, están involucrados en el ciclo varios mamíferos que sirven como reservorio del parásito. Ver Tabla 1.

Figura 4. Manifestaciones clínicas de la leishmaniasis.



Fuente: librería de imágenes de la Organización Mundial de la Salud Año 2011. LC (a), LCD (b), LMC (c), LV (d).

Tabla 1. Especies de *Leishmania* de importancia clínica en humanos.

Especie	Vector	Manifestación clínica	Hospederos mamíferos importantes	Distribución geográfica.
<i>Leishmania</i> spp Nuevo Mundo				
<i>L (Viannia) braziliensis</i>	<i>Lutzomyia wellcomei</i> , <i>Lutzomyia complexus</i> , <i>Lutzomyia carrera</i>	LC, LM	Roedores del bosque	Sur América, partes de América Central y México
<i>L (Viannia) panamensis</i>	<i>Lutzomyia trapidoi</i>	LC, LM	Perezosos	Norte de Sur América y Sur de América Central
<i>L (Viannia) peruviana</i>	<i>Lutzomyia peruensis</i> , <i>Lutzomyia verrucarum</i>	LC	Perros	Perú
<i>L (Viannia) guyanensis</i>	<i>Lutzomyia umbratilis</i>	LC	Oso hormiguero, perezosos	Sur América
<i>L (Viannia) lainsoni</i>	<i>Lutzomyia. nuneztovari</i> <i>anglesi</i>	LC	Roedores	Sur América (Brasil, Bolivia, Perú)
<i>L. (Viannia) naiffi</i>	<i>Lutzomyia. squamiventris</i> , <i>Lutzomyia. paraensis</i> , <i>Lutzomyia amazonensis</i> , <i>Lutzomyia .ayrozai</i>	LC	Armadillos	Sur América (Brasil, Guyana Francesa, Ecuador y Perú)

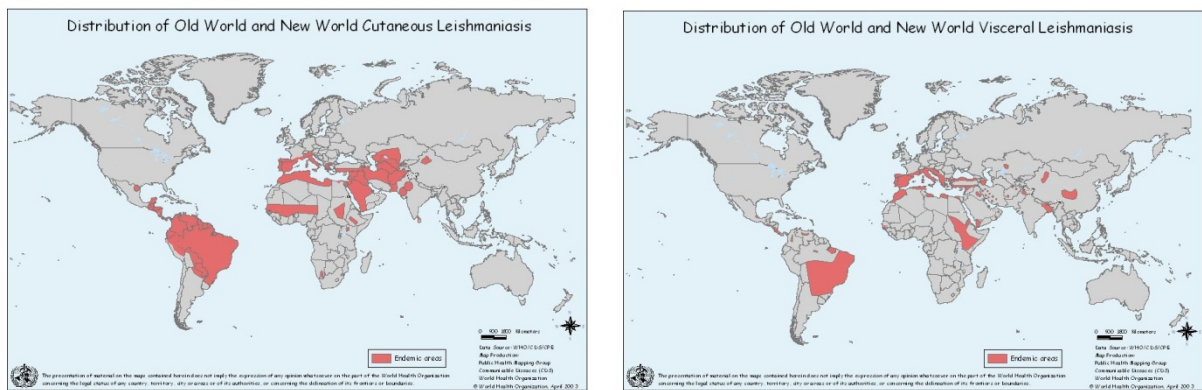
L (Viannia) colombiensis	<i>Lutzomyia. hartmanni</i>	LC	-	Norte de Sur América
L (Leishmania) amazonensis	<i>Lutzomyia flaviscutellata</i>	LC, LD	Roedores	Sur América
L (Leishmania) mexicana	<i>Lutzomyia olmeca olmeca</i>	LC, LD	Roedores	Centro América, México y EUA
L (Leishmania) pifanoi	<i>Lutzomyia. flaviscutellata</i>	LC	Desconocidos	Sur América
L (Leishmania) venezuelensis	<i>Lutzomyia. olmeca bicolor</i>	LC	Desconocidos	Norte de Sur América
L (Leishmania) garnhami	<i>Lutzomyia. youngi</i>	LC	Desconocido	Sur América
Leishmania spp. Viejo Mundo				
L (Leishmania) aethiopica	<i>Phlebotomus longipes,</i> <i>Phlebotomus pedifer</i>	LC, LD	Daman de Bruce	Etiopia y Kenia
L (Leishmania) killicki	Desconocido	LC	Desconocido	Norte de África
L (Leishmania) major	<i>Phlebotomus papatasi,</i> <i>Phlebotomus dubosqi,</i> <i>Phlebotomus salehi</i>	LC	Ratas del desierto	Asia Central, Norte y Este de África, Medio Oriente
L (Leishmania) tropica	<i>Phlebotomus sergenti</i>	LC	Damanes	Centro y Sureste de Asia, Medio Oriente y partes del Norte de África
L (Leishmania) donovani	<i>Phlebotomus argentipes,</i> <i>Phlebotomus orientalis,</i> <i>Phlebotomus martini</i>	LC, LV	Humanos	África, Centro y Sureste de Asia
Leishmania spp. Viejo y Nuevo mundo				
L (Leishmania) infantum	<i>Phlebotomus ariasi,</i> <i>Phlebotomus perniciosus</i> <i>Lutzomyia longipalpis</i>	LV, LC	Perros domésticos, Zorros.	Europa, Norte de África, América Central y Sur América

LC: leishmaniasis cutánea, LD: leishmaniasis difusa, LM: leishmaniasis mucocutánea, LV: leishmaniasis visceral. Modificado de (Bates 2007)(Reithinger, et al. 2007), OMS 2010

La leishmaniasis ha sido registrada aproximadamente en 88 países del mundo, según la organización mundial de la salud (OMS), se estima que existen alrededor de 12-14 millones de casos de leishmaniasis registrados y existen aproximadamente 350 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad.

La incidencia anual es de 1-1,5 millones de casos para LC y 500.000 para LV (Desjeux 2004). El 90% de los casos de LC ocurren en: Afganistán, Argelia, Brasil, Irán, Perú, Arabia Saudita y Siria (Figura 5a) y el 90% de los casos de LV se encuentra en: Bangladesh, India, Nepal, Sudan y Brasil. (Figura 5b) (Desjeux 2004).

Figura 5. Distribución geográfica de la leishmaniasis.



Fuente: OMS Año 2010

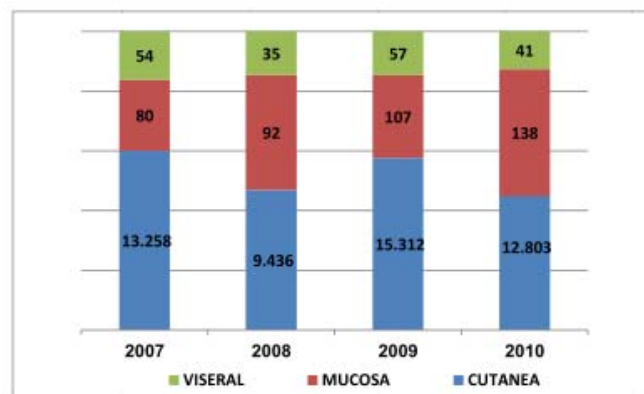
En Colombia la cifra de casos de leishmaniasis ha venido en aumento progresivo, se considera una patología endémica en casi todo el territorio, excepto, Atlántico, Bogotá D.C. y San Andrés islas. Su transmisión es principalmente rural (Instituto Nacional de Salud. 2009).

Según el informe de gestión institucional del Instituto Nacional de Salud (2007-2010), hasta al año 2010, se notificaron un total de 12.982 casos de leishmaniasis, de los cuales, 12.803 fueron LC que corresponde a un 98.6%, 138

casos de LM que corresponden a un 1.06% y 41 casos de LV que corresponde al 0,34%. (Instituto Nacional de Salud., 2011), (**Figura 6**).

En lo que va corrido del año 2011 según el boletín 35 del SIVIGILA hasta la semana epidemiológica 39, se han registrado 5.982, de los cuales 5.848 corresponden a LC, siendo el departamento de Antioquia el que mayor número de casos presentó con 1.232 casos. Santander ocupa el séptimo lugar con 296 casos notificados (Instituto Nacional de Salud. 2011).

Figura 6. Notificación de casos registrados en Colombia del 2007 al 2010.



Fuente: Instituto Nacional de Salud, AÑO 2011

1.2 Tratamiento de la leishmaniasis

Según el Ministerio de Protección Social en Colombia y la Organización Panamericana de la Salud los objetivos del tratamiento en Leishmaniasis son: prevenir mortalidad por LV, prevenir morbilidad, acelerar la curación clínica, reducción de cicatrices, curación parasitológica, prevenir diseminación y evitar resistencia, para intentar cumplir estos objetivos se ha utilizado en la últimas décadas como medicamentos de primera opción las sales de antimoniales pentavalentes (Sb^V), como el antimoniato de meglumina (Glucantime ®), y el

estibogluconato de sodio (Pentostam ®) (Ouellette, et al. 2004; Croft, Barrett et al. 2005).

Para Colombia, los medicamentos de primera elección igualmente son los Sb^V, en una dosis única diaria de: 20 mg/kg de peso/día durante 20 días, en casos de falla terapéutica se recomienda el uso del isotianato de pentamidina (Pentacarinat®), AmB (Fungizone®) (Ministerio de la Protección Social., 2010). Además, la Miltefosine (MIL), y paramomicina (PM), fluconazol, allopurinol, Imiquimod, entre otras, han sido utilizadas, sin embargo, su uso está limitado debido a sus costos, fácil inducción de resistencia *in vitro* a la MIL y la AmB, (Papadopoulou, et al. 1998; Seifert et al. 2003) y a su toxicidad (Ouellette, et al. 2004; Croft, et al. 2005).

Algunos de estos fármacos han sido utilizados como formulaciones tópicas para el tratamiento de LC, además de métodos físicos como la crioterapia, termoterapia, terapia laser de dióxido de carbono, terapia fotodinámica entre otras. Fácilmente se podría dividir los diferentes tratamientos en tres grandes grupos: tratamientos sistémicos, tratamientos tópicos y tratamientos físicos.

1.2.1 Tratamientos sistémicos:

Se entienden como tratamientos sistémicos los que afectan a todo el cuerpo, no se aplican directamente sobre la piel o el órgano afectado y su vía de administración puede ser a través de tabletas, capsulas, inyecciones, jarabes, etc. Dentro de estos medicamentos los más usados en leishmaniasis son:

1.2.1.1 Antimoniales pentavalentes.

Son la primera línea de elección para la diferentes formas clínicas de leishmaniasis, los dos antimoniales pentavalentes disponibles son: antimonio de

meglumbina (Glucantime ®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®), ambos con eficacia y estructura química similar, su diferencia radica en el contenido de antimonial, el primero contiene 81 mg/mL de antimonio y el segundo 100 mg/mL. Su aplicación puede ser intramuscular o intravenosa y las dosis han variado según cada país y a través de tiempo, lo más común es el uso de 20 mg/kg/día por 3 a 4 semanas (Mitropoulos 2010). Los Sb^V entran a la célula hospedera, atraviesan la membrana fagolisosomal y actúan contra el amastigote intracelular, es muy probable que la forma pentavalente se convierta en trivalente (Sb III), la cual se cree es la activa, por esta razón el Sb^V es considerado como una prodroga. (Ouellette et al., 2004).

Estos medicamentos producen fuertes efectos secundarios como: anorexia, vomito, nauseas, dolor abdominal, malestar general, mialgia, artralgia, dolor de cabeza, sabor metálico, letargo, alteraciones en funciones; toxicidad, del corazón, hígado, páncreas y disminución de las líneas hematológicas; también se han reportado fallas cardíacas y muerte asociada a fibrilación ventricular. (Oliveira et al. 2009, OMS 2010). Otro de los inconvenientes es la presencia de resistencia, como lo muestra el análisis de casos en India de pacientes con LV, donde el tratamiento con Sb^V fue obsoleto y los parásitos aislados de estos pacientes fueron resistentes al Sb^V *in vitro* (Sundar 2001).

1.2.1.2 Anfotericina B.

La anfotericina B (Amb), se conoce comercialmente con el nombre de Fungizone ®, es un antibiótico polieno aislado del hongo *Streptomyces nodosum*, usado principalmente en el tratamiento de las micosis. En la leishmaniasis se usa desde los años sesenta en casos de resistencia a los antimoniales pentavalentes en LV y LMC, se asocia con alta toxicidad, debe ser administrada lentamente, su aplicación se debe hacer diluyendo la dosis calculada en 500 cc de DAD 5%, y posteriormente hacer pasar la infusión de la mezcla en un lapso de 2 a 3 horas,

con el fin de evitar eventos adversos severos, se presentan reacciones como: fiebre alta, escalofríos y rigor; es nefrotóxica y esta razón casi siempre lleva al abandono del tratamiento (OMS 2010, Sundar et al. 2006, Mitropoulos et al. 2010). Se ha desarrollado una preparación liposomal (Ambisome), menos tóxica que mostro en pacientes con LV en India una tasa de curación del 90%, sin embargo, está preparación es significativamente más costosa. (Sundar et al. 2003).

1.2.1.3 Isotianato de pentamidina.

Es una diamidina aromática, primero usada en la prevención y el tratamiento de neumonía causada por *Pneumocystis jiroveci*, pero que ha mostrado tener una buena actividad clínica contra protozoarios como ciertas especies de *Trypanosoma*, *Babesia*, y *Leishmania* (Mitropoulos et al. 2010); en esta última ha sido usada como un tratamiento alternativo a los antimoniales. En Guyana Francesa, se considera la primera línea de tratamiento para infecciones por *L. guyanensis* en dosis de 300 mg una vez por semana durante 3-5 semanas (Blum y Hatz 2009), Sin embargo, la eficacia de la pentamidina rápidamente decayó en países como India, sugiriendo que el parásito adquiere resistencia fácilmente. (Ouellette et al. 2004).

Además, estudios *in vitro* han demostrado que amastigotes resistentes a la pentamidina hacen resistencia cruzada al diminazeno y la primaquina, lo que indica que continuas dosis del medicamento podrían producir posibles multiresistencias (Sereny y Lemestre 1997). Es un medicamento de aplicación intramuscular o preferiblemente por infusión intravenosa, presenta diferentes efectos adversos, como: la diabetes mellitus, hipoglicemia, miocarditis y toxicidad renal. Su uso es limitado. (OMS control de leishmaniasis),

1.2.1.4 Miltefosine.

La MIL (hexadecilfosfocolina), es un análogo de la fosfocolina inicialmente desarrollado como un agente anticancerígeno, que interfiere con las vías de traducción de señales e inhibe la biosíntesis de fosfolípidos y esterol, (Minodier y Parola 2006), es el primer tratamiento oral para la leishmaniasis.

En sus inicios mostro ser activo contra *L. donovani*, in vitro, y rápidamente fue mostrando en algunos estudios, tener un índice terapéutico para la Leishmaniasis visceral. Se ha utilizado la MIL como medicamento oral para el tratamiento de la LV, LC y LMC (Perez-Victoria, et al. 2006), Soto y colaboradores informaron el uso de MIL oral en el tratamiento de LC en Colombia en soldados que adquirieron la enfermedad en los municipios de Urabá y del Magdalena Medio, obteniendo un tasa de 64% al 100% de curación, variando la dosis del medicamento durante los 20 días de tratamiento. La evaluación de curación de las lesiones cutáneas se realizaron a los 6 meses post tratamiento (Soto, et al. 2001).

Otros estudios reportaron diferentes tasas de curación como las evaluadas por Berman en 2005, que reportó una tasa de curación del 33% en pacientes infectados con *L. braziliensis*. (Berman 2005). Este medicamento comúnmente induce: anorexia, nauseas, vómito y diarrea (Ouellette et al. 2004, Mitropoulos et al. 2010, OMS control leishmaniasis); en algunas ocasiones se observa alergias en la piel, elevación de las transaminasas hepáticas e insuficiencia renal.

Este medicamento es potencialmente teratogénico y no debe ser usado en mujeres embarazadas. (OMS control leishmaniasis). En procesos experimentales *in vitro* se ha obtenido resistencia; entre los posibles mecanismos de esta resistencia, se incluye: la reducción de la internalización de la droga (uptake), diferencias en la permeabilidad de la membrana plasmática, rápida metabolización y eflujo de la droga (Efflux) (Ouellette et al.,2004). También se cree que la

resistencia a la miltefosina se da por resistencia cruzada mediada por glicoproteínas-P (genes de multiresistencia 1 (MDR1)), estas son glicoproteínas transportadores de tipo ABC, involucradas en los fenómenos de multiresistencia en células cancerígenas. (Ouellette et al. 2004)

1.2.1.5 Triazoles, Imidazoles (*Fluconazol, itraconazol, Ketoconazol*).

Estos compuestos también agrupados dentro de los azoles, y usados como antifúngicos, han demostrado tener actividad anti-*Leishmania*, son administrados por vía oral, y tienen efectividad con un número limitado de especies de *Leishmania* (Pavli 2010); en dosis orales de 200 mg/día por 6 semanas han demostrado ser más efectivos para la curación de LC, que el placebo en un estudio realizado en Arabia Saudita, en casos de LC por *L. major*. (Alrajhi et al. 2002). Sin embargo, su uso es limitado por la larga duración del tratamiento y alto costo (Melby 2002).

1.2.2 Tratamientos Tópicos.

Los tratamientos tópicos son de uso externo y se aplican directamente sobre la piel, en leishmaniasis poseen ventajas sobre los tratamientos sistémicos, como: la baja toxicidad, no requerir constantes monitoreos, la mayoría tienen un bajo costo y una corta duración del tratamiento. (Sundan et al. 2008).

Los tratamientos tópicos se convierten en una alternativa en los casos de LC. El uso de estos tratamientos se debe hacer, evaluando la relación riesgo-beneficio de cada paciente. Se acepta el uso de medicamentos sistémicos en vez de tópicos, si el paciente sufre de numerosas lesiones, de lo contrario, se sugiere que la primera línea a evaluar sea la aplicación de terapia tópica, cuando se presentan lesiones tempranas, pequeñas y únicas o cuando los tratamientos sistémicos no pueden

ser administrados, como en el caso de mujeres embarazadas, pacientes con fallas cardiacas o renales entre otros (Blum et al., 2004, OMS 2010).

Dentro de los más usados tenemos:

1.2.2.1 Paramomicina.

El sulfato de paramomicina es un antibiótico aminoglucósido de amplio espectro, originalmente usado contra infecciones intestinales producidas por parásito (Giardiasis, amibiasis, y criptosporidiasis), ha sido usado para el tratamiento de la leishmaniasis desde los años 60, mostró eficacia en el tratamiento de LC en 1985 y como droga parenteral para la LV en 1990 (Croft et al. 2005), posee una baja biodisponibilidad oral, su administración tópica se considera una opción para el tratamiento de LC.

Existen dos formulaciones tópicas una con 15% de PM y 12% de clorhidrato de metil bencetonio (CMB), la segunda con una formulación de 15% de PM y 10% de urea. Ambas han sido probadas en estudios clínicos, mostrando que la primera formulación tiene una mayor respuesta clínica en comparación con la segunda; cuando son comparadas con el medicamento de referencia (Sb^V), no hay una diferencia significativa (Mitropoulos et al. 2010).

Su presentación farmacéutica es una crema tópica que se aplica con dosis de 14 mg/kg/día por períodos desde 10 a 30 días, su eficacia clínica varía según la especie de *Leishmania* y se reportan desde el 30 al 91% de eficacia (Reithinger et al. 2007).

1.2.2.2 Imiquimod.

Es un amina imidazoquinolina, usada inicialmente para el tratamiento de la queratosis actínica, carcinoma basocelular y verrugas genitales. Su presentación farmacéutica es en crema de uso tópico al 5%; es un modificador de la respuesta inmune. Su mecanismo de acción, es inducir una respuesta inmunitaria, modificando la producción de citoquinas locales con una posterior activación, tanto de la respuesta inmune específica como inespecífica.

El Imiquimod particularmente induce interferón α , pero también el factor de necrosis tumoral α , la interleucina (IL) 1 α , IL-6 e IL-8. En experimentos *in vitro* en ratones se demostró, que el Imiquimod posee una actividad anti-*Leishmania*, estimulando la actividad de los macrófagos, induciendo la expresión de óxido nítrico sintasa (iNOS) que mata los amastigotes de *Leishmania* (Arevalo et al. 2001).

Esta crema se aplica en terapia combinada a otros medicamentos antileishmaniasicos, para aumentar el poder leishmanicida, reportando tasas de curación que varían desde el 70 al 100% (Mitropoulos et al. 2010).

1.2.2.3 Dispersión coloidal de Amb (Amphocil®) y MIL tópicas.

La MIL tópica (Miltex), ha sido utilizada para el tratamiento de cáncer de seno con metástasis en piel (Terwogt et al. 1999); en *Leishmania*, se ha reportado su uso en modelos murinos con infecciones de *L. major* y *L. mexicana*, obteniendo cura de la lesiones causadas por el parásito pero con reactivación en los ratones infectados con *L. mexicana* (Schmidt-Ott et al., 1999); en ensayos clínicos no se han presentado resultados satisfactorios.

Amphocil, nombre comercial de la dispersión coloidal de Amb fue desarrollado por la corporación ALZA, para el tratamiento de la aspergilosis invasiva en pacientes con problemas renales, es un complejo coloidal de Amb y sulfato de colesterol sódico (Guo 2001), esta formulación fue estudiada por Vardy y colaboradores, quienes reportaron el uso tópico de esta dispersión en presencia de 5% de etanol y en ausencia de glucosa, obteniendo un efecto terapéutico significativo en el tratamiento de las lesiones de LC, mostrando que en los 17 casos tratados durante el periodo 1999-2000 todos, excepto uno, mostraron curación de las lesiones con este tratamiento (Vardy et al. 2001).

1.2.3 Tratamientos físicos.

Dentro de esta clasificación podemos encontrar: la crioterapia, termoterapia y la terapia fotodinámica (TFD), quienes se han constituido en una alternativa para el tratamiento de LC (en los casos en que no exista riesgo potencial de desarrollar LMC) por los reducidos efectos secundarios y bajo costo. (Bailey y Lockwood 2007).

1.2.3.1 Crioterapia.

Se trata de aplicar temperaturas muy bajas sobre las lesiones cutáneas presentes en casos de LC, con sustancias como el nitrógeno líquido, se ha reportado que el uso de este, en pacientes con lesiones producidas por *L. tropica*, obtuvo la curación de las lesiones en el 90% de los 461 pacientes. (Minodier y Parola 2006).

En otro estudio se probó la eficacia de un spray líquido de nitrógeno a 2 cm de distancia por 10 a 15 segundos, realizando el tratamiento una vez por semana por 1 a 7 sesiones; en 375 lesiones producidas por *L. major*, informando como

resultados el 84% de curación de las lesiones después de 1 a 4 sesiones. (Mosleh et al., 2008).

1.2.3.2 Termoterapia.

El uso del calor para tratar infecciones ha acompañado a la humanidad desde hace décadas. Enfermedades como: la sífilis, gonorrea, meningitis neumocócica, entre otras, han sido tratadas induciendo aumentos de temperatura.

En Leishmaniasis, ha sido usada para tratar las lesiones cutáneas, sin embargo, la sensibilidad a las temperaturas altas parece depender de la especie (Badgwell et al. 2009). Trabajos realizados en Kabul-Afganistan en 401 pacientes infectados con *L. tropica*, donde aplicaron termoterapia a través de un equipo de radiofrecuencia que inducía calor localizado de 50°C, por un periodo de 30 segundos, reportaron la cura definitiva en el 69,4% de los pacientes tratados con ella, comparado con la tasa de curación del 75,3% de pacientes control tratados con estibogluconato de sodio intralesional y el 44,8% de curación en pacientes que recibieron el mismo Sb^v intramuscular; estos resultados no mostraron una diferencia significativa entre los métodos aplicados, concluyendo que la termoterapia es efectiva, tolerable, y un tratamiento más rápido para la LC (Reithinger et al. 2004).

Similares estudios realizados en Colombia por Vega y colaboradores compararon la eficacia de la termoterapia vs antimonio de meglumine en casos de leishmaniasis cutánea, las condiciones de la termoterapia fueron, aplicar 50°C por 30 segundos y el Sb^v fue aplicado con el esquema tradicional 20 mg/kg/día por 21 días, obtuvieron una tasa de curación del 19% para la termoterapia comparada con un 23% con el medicamento de referencia. (Vega et al. 2009).

1.2.3.3 Terapia fotodinámica (TFD).

La TFD se basa en la capacidad que tienen algunas sustancias de excitarse con una longitud de onda específica; a estas sustancias se les conoce con el nombre de fotosensibilizadores (FS), estos interactúan con el oxígeno molecular para producir especies reactivas de oxígeno (ERO) (Ochsner 1997, Osiecka et al. 2003). Con este proceso se induce una respuesta celular que va a depender del tipo de FS, la cantidad de ERO generadas, tipo de célula implicada, internalización, localización intracelular, y condiciones de luz empleadas, pueden inducir muerte celular producida por apoptosis o necrosis (Moor 2000).

La terapia fotodinámica se reportó por primera vez con estudios en los que la iluminación de cultivos microbianos en presencia de acridina resultaba en la muerte celular (O'Riordan y Hassan, 20005), desde ese momento son múltiples las patologías tratadas, dentro de las más comunes se encuentran: el cáncer de pulmón, vejiga, próstata y esófago; enfermedades dermatológicas como el acné, verrugas, molusco contagioso, y otras como la infección por *Staphylococcus aureus* resistente (Shakley et al. 1999).

En leishmaniasis el uso de TFD ha aumentado en los últimos años, dentro de los FS que se han probado se encuentra el ALA probado en pacientes infectados con *L. major* y *L. donovani*, la protoporfirina IX (PpIX) por su parte ha sido usada en el tratamiento de pacientes con múltiples lesiones cutáneas producidas por *L. donovani* (Gardo et al., 2003), en cuanto a las tasas de curación Asilian y Davami informaron que el 93,5% de los pacientes con LC causadas con *L. major* y tratados con TFD mediada por ALA presentaron mejoría clínica. (Asillian & Davami., 2006).

Otros FS como las fenotiazinas y las Ftalocianinas también han mostrado tener actividad fototóxica contra algunas especies de *Leishmania* *invivo* y/o *in vitro*

(Akilov et al. 2006). Por ejemplo, la TFD por ftalocianinas en *Leishmania* fue evaluada en modelos *in vitro*, demostrando la inducción de muerte en promastigotes, amastigotes intracelulares y amastigotes (Escobar et al. 2006).

Como se resumió anteriormente la búsqueda de tratamientos efectivos para las diferentes formas clínicas de leishmaniasis, en especial para la LC, que mejoren la efectividad, minimice los costos, disminuya los efectos adversos, elimine el monitoreo y acorte el tiempo de tratamiento, es un proceso en movimiento, en el que se desarrollan, redescubren, modifican y se crean nuevas alternativas.

En esta realidad se ha dado paso al uso de un área nueva conocida como nanotecnología que se convierte en una alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis, al diseñar vectores nanométricos biocompatibles, capaces de transportar y entregar sustancias terapéuticas en forma específica, reduciendo las dosis del medicamento y los posibles efectos colaterales como: la hepatotoxicidad, la toxicidad renal; y molestias generales como: náuseas, mareo, irritación gástrica etc, al igual que utilizar estas partículas para producir un efecto localizado que permita la erradicación del microorganismo invasor a través de una activación que puede ser manipulada en beneficio del hospedero.

1.3 Uso de nanotecnología en medicina

Las bases conceptuales de la nanotecnología, fueron planteadas por primera vez en 1959 por el físico Richard Feynman, quien exploró la posibilidad de manipular material a la escala de átomos individuales o moléculas, sin embargo, fue Norio Taniguchi un investigador de la universidad de Tokio, quien primero uso el término de Nanotecnología; desde ese momento, su uso empieza a hacerse popular a través de la industria electrónica, quienes son los que más impulsaron el desarrollo de herramientas que permitieran miniaturizar dispositivos y fue IBM en

la década de los 70 quien desarrollo una técnica llamada litografía por haz de electrones para crear nanoestructuras y dispositivos tan pequeños como 40 a 70 nm. (Sahoo et al., 2006).

Desde ese momento se entiende por nanotecnología a la ciencia e ingeniería que tiene la habilidad de trabajar a nivel atómico, molecular y supramolecular (Roco, 2003), utilizando partículas de tamaños entre 1 hasta 100 nm con aplicación en la industria, la química, la física, la tecnología de la información y de las comunicaciones, la biología molecular y en biomédica (Lacerda, Bianco et al. 2006; Borm yMüller-Schulte D. 2006).

La nanotecnología se desarrolla rápidamente convirtiéndose en un campo científico multidisciplinario que puede llegar a ser de gran ayuda para el cuidado de la salud humana al generar beneficios en áreas como el desarrollo de medicamentos, la descontaminación de aguas, la producción de materiales livianos pero fuertes, entre otros (Sahoo et al. 2006).

Unas de los principales prioridades de la humanidad es la salud, y desde hace siglos se viene tratando enfermedades a través de medicamentos, y cuidando el organismo a través de suplementos, dietas, y compuestos que aportan bienestar; si se evalúa todas los medicamentos o elementos importantes en la salud humana son en esencia moléculas, productos de origen natural o sintéticos a niveles nano.

La aspirina, por ejemplo mide alrededor de 0.6 nm, mientras otro elementos como los anticuerpos monoclonales tienen una longitud de aproximadamente 30 nm, la hemoglobina tiene un diámetro de 5 nm, y existen otra proteínas de similar tamaño usados en terapéutica, muchos de estas estructuras han sido creadas o manipuladas en tamaños nanométricos, durante décadas la diferencia es que ahora se han involucrado una amplia variedad de científicos y áreas que normalmente no participaban en la investigación de medicamentos (Kawasaki and

Player 2005). Desarrollando lo que hoy se conoce con el nombre de Nanomedicina, creando nanoestructuras para diferentes usos, por ejemplo nanopartículas magnéticas que se han usado como herramientas de imagen diagnóstica. Como herramientas de liberación de medicamentos se han usado algunos tipos de liposomas, los magnetoliposomas, los fulerenos, los polímeros transportadores y los nanotrasportadores magnéticos entre otros (Borm yMüller-Schulte 2006)

El uso en medicina de estos nanomateriales es posible gracias a sus características fisicoquímicas, como su superficie por radio de masa, que es muy amplio, permitiéndole unir, absorber o transportar otros compuestos como medicamentos, sondas o proteínas en su superficie; sus propiedades cuánticas, la capacidad de acoplarse y llevar compuestos; su pequeño tamaño, su fácil distribución en sistemas biológicos, lo cual se debe tanto a su composición (i.e. lipídica, proteica o de carbono) como a su forma (i.e. esferas, filtros o tubos entre otras) (Suh et al. 2009; Borm yMüller-Schulte 2006).

La nanomedicina está en aumento en los últimos años, para intentar suplir las necesidades de medicamentos más efectivos, de bajo costo, baja toxicidad, mejor biodistribución; que mejoren el pronóstico de muchas enfermedades o ayuden a un mejor diagnóstico, en este camino se han desarrollado múltiples herramientas nanotecnológicas, como lo revisado por ejemplo por Romero y Morilla en la enfermedad de Chagas, donde los efectos tóxicos de los medicamentos de referencia han llevado a investigar el uso de sistemas nano de liberación de medicamentos, para direccionar y usar menores concentraciones de los medicamentos de referencia, como liposomas de estearalamina, nanoesferas de polyacilcianoacrilato, nanoesferas de alopurinol, nanopartículasde poli-etilglicol, liposomas sensibles al pH cargados con nitroimidazoles entre otros. (Romero y Morilla 2010).

De igual manera son varias las nanopartículas desarrolladas para tratar otra enfermedad parasitaria, la malaria, en esta se han reportado el uso de liposomas como nanotransportadores de medicamentos antimaláricos, sin embargo, aunque se disminuye los efectos de toxicidad en muchos casos no se aumenta el efecto antimalárico, aunque aumenta la vida media de los medicamentos, también se han probado nanopartículas de lípidos sólidas, nano y micro emulsiones, nanopartículas poliméricas, dendrímeros, nanocápsulas, todos usados como transportadores de antimaláricos (Santos-Magalhaes y Furtado 2010).

La administración de medicamentos a través de nanovectores permite una mejor distribución del medicamento en el organismo y que este no sufra por el ambiente hostil del mismo (Lacerda, Bianco et al. 2006). Otro ejemplo de la disminución de la toxicidad de medicamentos es el caso de la AmB, Fukui y colaboradores probaron la eficacia y toxicidad de Amb cargada en nano esferas lípidas (LNS-AmB por sus siglas en inglés) en comparación con el medicamento de referencia (Fungizon) para el tratamiento de micosis en perros y ratones de laboratorio, encontrando igual eficacia entre las formas terapéuticas probadas, sin embargo, las LNS-AmB mostraron menor toxicidad renal a pesar de obtener mayores concentraciones plasmáticas que la alcanzada por Fungizone (Fukui et al. 2003).

Algunas nanopartículas tienen la capacidad de dirigirse específicamente a células blanco, ser reconocidos por receptores e internalizarse. Se ha reportado que NTC acoplados a moléculas de biotina y a medicamentos anticancerígenos fueron endocitados mediante receptor en células cancerígenas.(Chen, et al. 2008). Medicamentos como el metotrexato (MTX), un anticancerígeno con estructura química similar a la estructura del ácido fólico (Jackman, Theti et al. 2004), fueron internalizados por linfocitos T humanos Jurkat mejor cuando estaban acoplados a nanopartículas de NTC que cuando estaba en su forma libre (Pastorin, et al. 2006). Este efecto generaría una posible disminución de la toxicidad del

compuesto al mejorar la internalización en las células blanco y aumentaría su actividad sobre las mismas (Cai y Koung 2009).

De la misma manera han sido usados dendrímeros modificados con fluoresceína y AF cargados con un potencial medicamento para el cáncer, el 2-metoxiestradiol, para dirigir el complejo a células cancerígenas, reportando una alta solubilidad y estabilidad del sistema y una baja citotoxicidad, proponiendo su uso como vector de distintos medicamentos para diferentes tipos de cáncer (Wang et al. 2011).

Otros estudios han reportado el uso de la nanotecnología para el bienestar humano sin ser aplicado en el organismo, como es el uso de nanopartículas de plata en catéteres para prevenir las infecciones nosocomiales, la plata es un ion con capacidad microbicida, que al ser unido a la superficie de los catéteres previene la adherencia de microorganismos evitando la proliferación bacteriana (Samuel y Guggenbichler 2004). Como podemos deducir de lo anteriormente descrito, la nanotecnología ha sido ampliamente estudiada en algunas patologías, igualmente existen estudios de este tipo en leishmaniasis que a continuación se resumirán.

1.3.1 Uso de la nanotecnología en leishmaniasis

Entre las nanopartículas utilizadas en el tratamiento de la leishmaniasis se encuentra las nanopartículas poliméricas, que son partículas coloidales sólidas, de varias matrices poliméricas biocompatibles, donde se puede absorber, unir o atrapar un compuesto terapéutico. Se han usado nanopartículas de poliácil-cianoacrilato (PACA) cargadas con primaquina en macrófagos infectados con *L. donovani*, mostrando ser 21 veces más efectivo en erradicar el parásito que la forma libre de primaquina (Date, Joshi et al. 2007).

También se han usado nanopartículas recubiertas de ácido poliláctico (PLA) para encapsular agentes de origen natural como el 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalona (DMC), obtenido de la planta *Piper aduncum*. Al evaluar su actividad anti-*Leishmania* en estudios *in vivo* e *in vitro* se demostró que el DMC encapsulado en PLA fue dos veces más efectivo que el DMC libre, en estudios *in vitro* (Date et al. 2007).

Se ha probado el uso de nanopartículas de polimetacrilato cargadas con pentamidina contra ratones infectados con *L. infantum*, comparada con la pentamidina sola, encontrando una dosis efectiva 50 (DE₅₀) seis veces menor para el complejo nanopartícula-pentamidina que la pentamidina libre, también se observó disminución de las megalias en los ratones tratados con el complejo, mostrando que este fue más potente contra *L. infantum* en ratones BALB/c que la droga libre. (Durand et al., 1997). Por su parte Doroud y colaboradores desarrollaron una nanopartícula catiónica de lípido sólida como transportador de tres pDNAs de *L. major*, para inducir una respuesta inmune protectora e iniciar así las bases de una posible vacuna. (Doroud et al. 2011).

El uso de la nanotecnología en la leishmaniasis ha permitido el uso de sustancias con características físicas que limitaban su uso como es el caso de la Oryzalin, un medicamento dinitroanílico que ha cobrado reciente interés en el tratamiento de la leishmaniasis pero que posee limitaciones como la baja solubilidad; además los solventes que se usan para aumentar su solubilidad pueden inducir efectos indeseables. Una solución ha sido la creación de una nanopartícula lipídica cargada con el Oryzalin, dentro de los resultados encontrados reportan una eficiencia del 75% en la encapsulación, un tamaño de 140 nm y una disminución en la citotoxicidad de la oryzalin cuando estaba encapsulada comparada con la forma libre del medicamento (Lopes et al. 2011).

Dentro de los medicamentos usados contra la leishmaniasis la toxicidad de la AmB se ha disminuido a través del uso de formulaciones lipídicas, dentro de estas encontramos las de liposomas unilamelares que se comercializan con el nombre de AmBisome®, esta formulación ha sido evaluada con buenos resultados disminuyendo el número de días de tratamiento y los efectos adversos incluido la ausencia de nefrotoxicidad. (Dietza et al., 1993, Salomon et al. 2007). Montanari y colaboradores de igual manera han desarrollado un liposoma ultradeformable para la administración de terapia fotodinámica en el tratamiento de la *L. braziliensis*, reportando disminución de la toxicidad en células hospedero y aumento del efecto fotodinámico (Montanari et al. 2010).

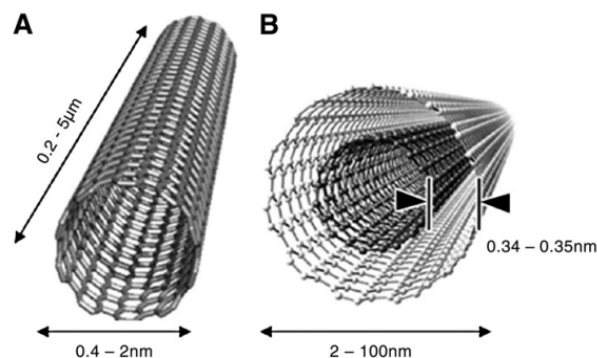
Otras nanopartículas como los niasomas, nanodisco, partículas micro/nano poliméricas han sido utilizadas (Romero y Morilla 2008). Los niasomas que son vesículas similares a los liposomas formadas por una mezcla de colesterol y un surfactante no aniónico han sido usadas unidas a Sb^V en el tratamiento de LV. Los micro/nano polímeros unidos a la primaquina mostraron ser más efectivos contra las formas intracelulares que las formas libres de *Leishmania* (Romero y Morilla 2008).

1.4 Nanotubos de carbono (NTC)

Los NTC hacen parte de la familia de fulerenos, moléculas compuestas de carbono en su totalidad y que pueden tener estructuras elipsoides, esféricas o en tubos con interiores huecos (Foldvari y Bagonluri 2008). Los NTC son moléculas cilíndricas formadas por carbono en estructuras hexagonales y heptagonales y poseen dos estructuras: nanotubos de pared simple (NTCS) y los nanotubos de multipared (NTCM).

Los NTCS consisten en una sola pared formando el cilindro que contienen hojas concéntricas de carbono con un diámetro entre 0,4 a 2,0 nm y una longitud en el rango de 20 a 1000 nm, se utilizan principalmente en medicina y en aplicaciones electrónicas. Los NTCM son más grandes con diámetros en el rango de 1,4 a 100 nm y longitud de uno a varios μm . (Figura 7), su fabricación es más barata y son más utilizados en la generación de nuevos materiales como nanocircuitos, transistores, iodos, pantallas planas, lámparas luminiscentes entre otros; y para desarrollo mecánico (Lacerda et al. 2006; Foldvari y Bagonluri 2008).

Figura 7. Nanotubos de carbono



Fuente: Tomado de Cheung et al. 2010. Nanotubos de carbono de pared simple (A), Nanotubos de carbono de pared múltiple (B).

Existen varios métodos para la fabricación de NTC, entre los más usados encontramos la sublimación de grafito y la descomposición de compuestos que contienen carbono. El primero, asociado a altas temperaturas, produciendo pequeñas cantidades de NTC, el segundo, es un conjunto de métodos que tienen un mayor rendimiento, lo que ha facilitado la fabricación masiva de NTC y mejorado su comercialización (Rakov 2006).

Aunque sus aplicaciones parecieran estar bien diferenciadas las dos formas de NTC poseen características fisicoquímicas que los convierten en buenos

candidatos para aplicaciones biomédicas, entre estas están sus propiedades electrónicas donde tienen un amplio margen de comportamiento, pueden ser semiconductores o superconductores, además poseen una estructura ordenada, una relación longitud/diámetro muy elevada, peso ultraligero, alta fuerza mecánica, alta conductividad térmica, una amplia área de superficie y una estructura cilíndrica hueca que les permite tener una gran dureza y resistencia, pero a la vez una alta capacidad de deformarse elásticamente (Lacerda, Bianco et al. 2006; Foldvari and Bagonluri 2008).

Son múltiples las aplicaciones de los NTC, entre ellas encontramos su uso como inmunosensores, que son instrumentos analíticos que transforman procesos biológicos en señales eléctricas u ópticas y permiten su cuantificación (Kaushik et al 2010); sistema de liberación de medicamentos (Chen, et al. 2008), imagen diagnóstica (Cai y Kang 2009), como agente de contraste en tomografía termo acústica y foto acústica (Pramanik, et al. 2009); además, en la industria electrónica tiene especial interés por su propiedades como supercondensadores (Hughes et al. 2009).

1.4.1 NTC como nanovectores

Para que los NTC puedan ser usados como nanovectores deben tener ciertas características como no ser citotóxicos, ser solubles en sistemas acuosos, tener un sistema de internalización que se puede lograr por tamaño de partícula o la funcionalización o anclamientos a moléculas que permita la internalización a través de procesos de endocitosis. Por ejemplo, los NTCS han sido utilizados como nanovectores de medicamentos especialmente en cáncer acoplados a moléculas como la biotina o el AF permitiendo en estudios in vitro la internalización selectiva en la línea celular leucémica L1210FR o en células Hela respectivamente (Chen et al. 2008; Kam et al. 2005).

1.4.2 Funcionalización de NTC

La funcionalización de un compuesto hace referencia a la unión de grupos funcionales sobre la superficie del mismo, dándole propiedades especiales a la superficie que dependen del grupo funcional usado. En la naturaleza, los NTC se comportan de forma hidrofóbica debido a su estructura de grafeno. (Shieh et al. 2009). Ellos sólo pueden dispersarse en condiciones especiales como cuando son tratados por ejemplo, con ácidos fuertes que les confieren grupos carboxilo a su superficie (Shieh et al. 2009). También uniéndose a polímeros como el polivinil pirrolidón (PVP) y al poliestireno sulfonato (PSS) (Vaisman, Wagner et al. 2006). De esta manera los NTC pueden unirse a un tipo deseado de moléculas de cadenas livianas o pesadas y adaptar así su solubilidad en solventes orgánicos y al agua (Shieh et al. 2009, Vaisman et al. 2006).

La funcionalización de NTC con ácidos fuertes como el ácido nítrico, le confiere los grupos ácido carboxilos por oxidación pero puede incorporar defectos en la estructura original del NTC, comprometiendo sus propiedades mecánicas y electrónicas (Liu et al. 2005).

Una de estas moléculas que le confieren al NTC características hidrosolubles y le permite el acoplamiento a otras moléculas es el Chitosan (Ch) (Shieh et al. 2009). Este es un polisacárido lineal compuesto de cadenas distribuidas aleatoriamente de β -(1-4) D-glucosamina (unidades deacetiladas) y N-acetil-D-glucosamina (unidad acetilada). (Thassu et al., 2007). Es un derivado de la desacetilación de la quitina, que es un polisacárido natural y se encuentra en una amplia gama de fuentes naturales tales como crustáceos, hongos, e insectos, con una gran aplicación en áreas como la agricultura, medicina, tratamiento de aguas

residuales, porque es biocompatible, biodegradable y no es tóxico (Yeong-Tarnng et al. 2009).

Liu y colaboradores referencian un método donde logran la funcionalización de NTC con Ch obteniendo un biomaterial con propiedades combinadas, donde el NTC no pierde sus características mecánicas, ni electrónicas y el Ch le confiere la versatilidad y biocompatibilidad al sistema (Liu et al. 2005).

Los NTC en su forma nativa tienen una estructura que les confiere estabilidad térmica. Estudios realizados por Carson y colaboradores reportan la pérdida de esta estabilidad cuando los NTC son funcionalizados con mezclas de ácido sulfúrico y ácido nítrico debido a que se producen cortes en el NTC y defectos de sitio, al funcionalizarlos con Ch no se altera la estructura del NTC ni sus propiedades electrónicas y se mejora la estabilidad térmica del Ch (Carson et al., 2009).

El acoplamiento de los NTC a moléculas que ayuden a su internalización en células blancas se aplicó con éxito en el uso de NTC como vectores de medicamentos (Kam et al. 2005; Chen, et al. 2008). Las moléculas más usadas para el reconocimiento de tumores son anticuerpos monoclonales, ácidos grasos poli-insaturados, polisacáridos, péptidos y vitaminas (Chen et al. 2008).

Chen y colaboradores lograron la internalización de NTC en una línea celular de leucemia (L1210FR) que sobre expresaba receptores de biotina en su superficie, a través del acoplamiento de la biotina a la superficie del NTC. (Chen et al. 2008). Esto permitió la endocitosis mediada por receptores y el desarrollo de un potencial sistema de liberación de fármacos. Cuando se funcionalizó al NTC con un taxoide (Fármaco derivado del árbol *Taxus brevifolia*) anticancerígeno, la molécula de biotina y un marcador fluorescente (NTC-biotina-vinculador-taxoide-

fluoresceína) se registró un aumento en la concentración citoplasmática del compuesto en comparación a la aplicación sin el nanovector (Chen et al. 2008).

El ácido fólico (AF) es una de las vitaminas utilizadas como ligando para la entrada por endocitosis mediada por receptores (Kam, et al. 2005). Es una vitamina esencial para la síntesis de ADN y el metabolismo del carbono en todas las células eucariotas, a diferencia de las células procariotas, las células eucarióticas carecen de un vía de biosíntesis de folato por tanto necesita la entrega del ácido fólico desde el espacio extracelular (Ke et al. 2003).

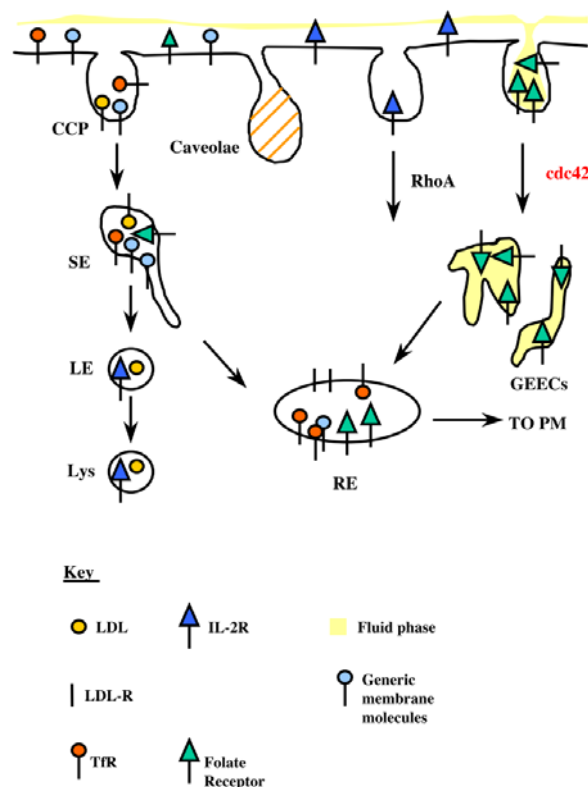
La absorción de AF por las células involucra varios tipos de transportadores, unos son los transportadores aniónicos que tienen una baja afinidad por el folato, mientras que un mejor transporte de folato por la membrana plasmática se basa en proteínas de membrana que son los receptores de folato anclados a la membrana de la familia (Sabharanjak y Mayor. 2004), que se han llamado proteínas fijadoras de folato (PFF) y/o receptor de folato (FR), los cuales se han detectado en células humanas en al menos 3 isoformas. Las FR- α , FR- β que son anclas de glicofosfatilinositol (GPI-anclas) y la FR- γ que es la forma soluble de la proteína (Elnakat y Ratnam 2004). Las isoformas α y β , ligan con alta afinidad la forma oxidada del AF, ingresando a la células vía endocitosis y/o potocitosis (Ke et al. 2003). **(Figura 8)**

Se ha observado que NTC-AF puede entrar selectivamente en células de carcinoma hepatocelular humano (Hep G2) después de la incubación por 1 hora con el conjugado (Kang, Yu et al. 2009) o en células de carcinoma cervical (HeLa) (Kamet et al. 2005). Esto puede deberse a la sobreexpresión de receptores de folato en la superficie de la membrana celular que permite la fácil internalización por esta vía de este conjugado (Kang et al. 2009).

Se ha reportado el uso de NTC como vectores de medicamentos, como es el caso evaluado por Wu y colaboradores, quienes lograron funcionalizar NTC con AmB, encontrando en células mamíferas una rápida internalización y reducción de la toxicidad en relación a la administración del medicamento solo, de igual forma aumenta el efecto tóxico sobre microorganismos cuando la Amb esta unida a los NTC (Wu et al. 2005).

Además de medicamentos los NTC son usados como vectores para el transporte intracelular de ácidos nucleicos, como es el caso de RNA interferentes (siRNA).

Figura 8. Representación esquemática de la vía endocítica de GPI-anclas.



Fuente: Tomado de Sabharanjak y Mayor. 2004. El grafico representa las posibles vías de endocitosis de las anclas-GPI, que están constituidas por glicolípidos anclados al lado extracelular de la membrana celular, por este motivo pueden ser internalizadas por todos los medios conocidos. Vías dependientes de Clatrina (CCP), vías independientes de clatrina como la RhoA, endocitosis mediada por receptor como el FR, caveolas.

1.4.3 NTC y la activación por IRC.

Los NTC tienen la capacidad de absorber energía en la región del infrarrojo cercano (700-1100 nm). Esta se debe a la estructura de bandas electrónicas del NTC que permite activar térmicamente los NTC generando un aumento en la temperatura que puede ser letal. El calentamiento se da debido a transiciones electrónicas desde la primera a la segunda singularidad de Van Hove (Kang et al. 2009). Una singularidad de Van Hove es una discontinuidad en la densidad de estados (DOS) que resulta en el incremento en la interacción electrón-fotón (onda elástica) aumentando así la temperatura que se incrementa en relación a la potencia aplicada y el tiempo de irradiación. (Kang et al. 2009; Akasaka et al. 2009).

1.5 Fuentes de Irradiación

La radiación infrarroja (IR) se produce por los cuerpos calientes, todos los objetos a temperatura superior al cero absoluto emiten radiación IR, sin embargo, la cantidad y la longitud de onda de la radiación emitida dependen de la temperatura y la composición del objeto, para obtener emisiones de longitudes de onda en el rango de IRC, se pueden emplear lámpara IFR distribuidas comercialmente, este tipo de lámpara incandescente generalmente puede utilizar filamentos de tungsteno, nicromio o carbono dentro de una ampolla de cristal que contiene un gas inerte a baja presión.

Pueden abarcar todas las longitudes de onda del IR; en su construcción se puede limitar el rango de longitud de onda de emisión, por ejemplo colocando filtros como es la capa de color rojo sobre las lámparas que limitan las longitudes de onda emitidas, la potencias de estas lámparas varían según su uso, pudiendo ir desde los 20 mW hasta los 4000 W, otra forma de obtener una determinada

longitud de onda con desviación de +/- 5 nm es usando rayos láser, a través de diodos, que son dispositivos semiconductores que emiten luz laser caracterizada por ser emitida en forma unidireccional, con fotones que poseen longitudes de onda muy cercanas entre sí, su tamaño es mucho menor comparado con una lámpara infrarroja, para la activación de los NTC la longitud de onda mas reportada son los 808 nm con potencias 6.3 mW/cm² (Gonzalez et al. 2008), hasta los 2 W/cm² por periodos de exposición de 30 segundo a 5 minutos (Wang et al. 2011, Markovic et al. 2011).

1.5.1 Efecto de NTC activados con IRC en cáncer

Se ha demostrado que tratamiento con NTC-AF en células Hep-G2 destruye el 85% de células luego de la irradiación por 20 segundos a 1064 nm por un pulso laser a una potencia máxima de 800 mW/cm² debido al sobrecalentamiento de la estructura NTC (Kang et al. 2009). Este efecto no se observó en el 90% de células normales ya que al no internalizar los NTC-AF permanecieron viables aun después de una irradiación por 2 minutos en las mismas condiciones (Kang, et al. 2009). En este estudio se propone que el daño en las células Hep-G2 es producido por la fuerte onda generada durante la explosión foto acústica más que por el daño térmico causado (Kang et al. 2009).

En contraste los estudios realizados por Kam y colaboradores demostraron que la irradiación con infrarrojo cercano de una solución acuosa de NTCS a 25 mg/l con 1.4 W/cm² a una longitud de onda de 808 nm por 2 minutos produjo un incremento en la temperatura de la solución que alcanzó los 70°C, mientras que cuando una solución acuosa pero sin la presencia de NTCS fue irradiada en las mismas condiciones no se registró el cambio de temperatura, basados en estos resultados proponen que el efecto toxico de los NTCS internalizados en células HeLa

después de irradiadas con Infrarrojo cercano se debe a un efecto térmico. (Kam et al. 2005).

Estos estudios demuestran que la activación de los NTC internalizados en células con sistemas de irradiación de infrarrojo cercano, puede producir diferentes efectos como el calor local excesivo, o una explosión fotoacústica que en ambos casos produce la muerte celular, esta destrucción puede ser selectiva si se funcionalizan los NTC con moléculas que permitan utilizar vías de entrada específicos según la células de interés.(Kam, O'Connell et al. 2005).

1.5.2 Efecto de NTC activados con IRC en microorganismos.

Recientes estudios reportados por Akasaka y colaboradores (2010) reportaron el efecto de NTC irradiados con RIC sobre la proliferación en agar de *Streptococcus mutans*. El proceso lo realizan uniendo los NTC a un agar de infusión cerebro corazón, donde siembran la cepa de *S. mutans*, para posteriormente ser irradiada con IRC a $1,3 \times 10^4$ o 5.6×10^3 W/m² a una longitud entre 800-1300nm, por 30 y 60 segundos, después miden la inhibición de la proliferación por conteo de colonias luego de 48 h de incubación, los resultados que obtuvieron fue una reducción de entre el 60 a casi el 100% en el crecimiento de colonias, con esto concluyen que el sistema NTC-IRC es un potencial bactericida (Akasaka et al. 2010).

1.5.3 Efecto de NTC activados con IRC en *Leishmania*.

Hasta el momento en las mayores bases de datos médicas y multidisciplinarias no se han encontrados reportes bibliográficos sobre el efecto de NTC activados con IRC sobre *Leishmania*.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad anti-*Leishmania* de nanotubos de carbono acoplados con ácido fólico, después de la irradiación con infrarrojo cercano (IRC)

2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Evaluar la internalización y la localización intracelular de NTC-Ch y NTC-AF en células de mamífero

Evaluar el efecto de la irradiación con IRC en células de mamífero y en parásitos

Evaluar la toxicidad de NTC-Ch y NTC-AF en células de mamíferos HOS y THP-1

Evaluar la toxicidad de NTC-AF en células infectadas y no infectadas con *L. panamensis*

Evaluar la toxicidad de NTC-AF en células infectadas y no infectadas con *L. panamensis* después de irradiación con IRC.

3 PREGUNTA DE INVESTIGACION

¿Pueden los NTC-AF internalizarse selectivamente en células infectadas con *L. panamensis* y producir la muerte del parásito y/o de la célula infecta al ser activados por IRC?

4 HIPOTESIS

El complejo de NTC-AF se internaliza selectivamente en células infectadas con *L. panamensis* por endocitosis mediada por receptor a través de la PFF y puede eliminar los amastigotes intracelulares luego de ser activados con IRC.

5 MATERIALES Y METODOS

5.1 ASPECTOS METODOLOGICOS

Este es un trabajo de tipo experimental donde se evaluó la actividad de NTCS funcionalizados con quitosán y ácido fólico en modelos *in vitro* en células THP-1, HOS y en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis*. El estudio se dividió en tres fases (Figura 9), en la primera fase los métodos se dirigieron a estandarizar la preparación de NTCS y a determinar la expresión de receptores de ácido fólico en el sistema *Leishmania*; en la segunda fase se evaluó la citotoxicidad de estos compuestos y se determinó su internalización en células de mamífero. Por último en la tercera fase se evaluó la actividad de los compuestos en células y parásitos al ser expuestos a IRC

5.2 COMPUESTOS Y REACTIVOS

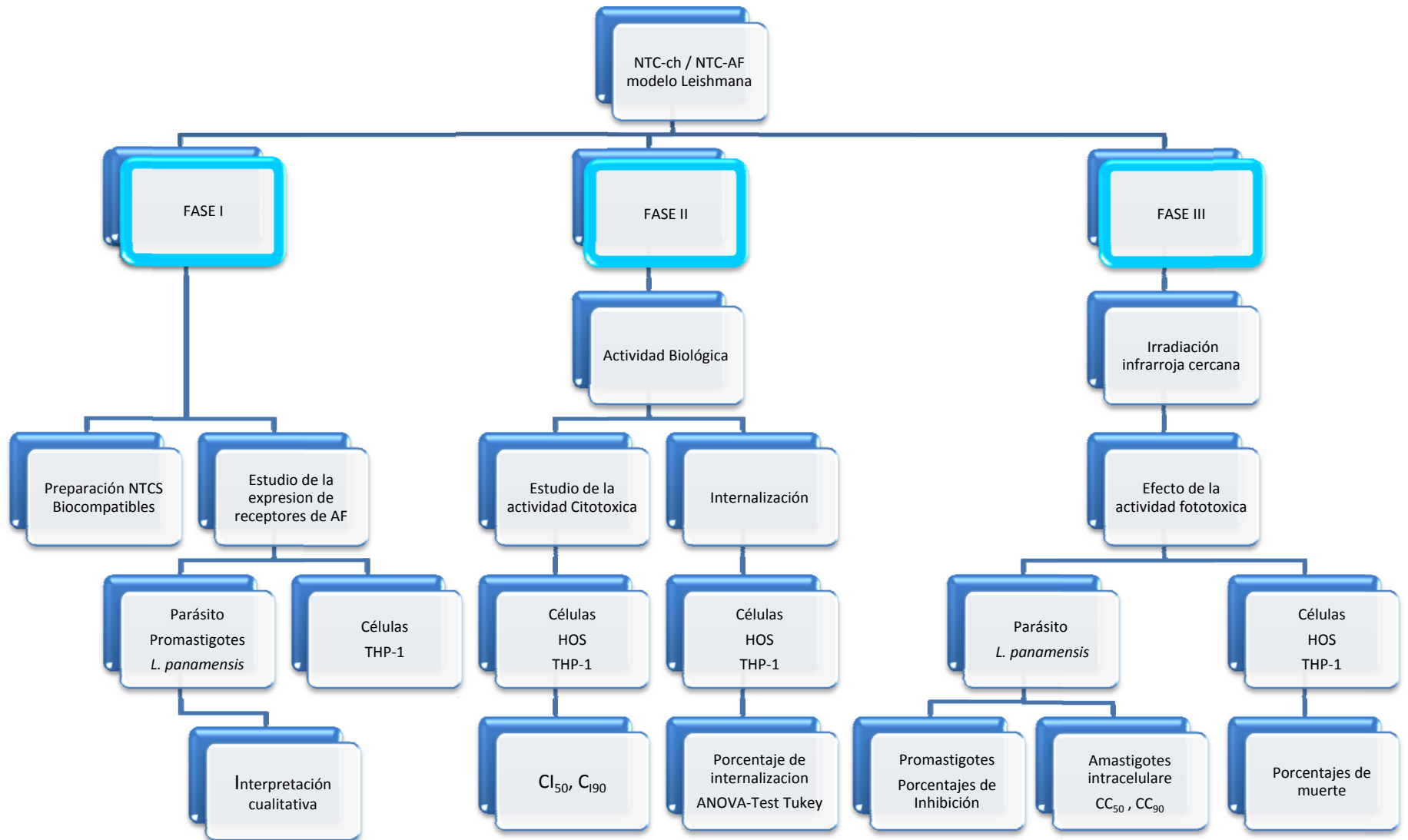
Se utilizaron NTCS (Unydim) donados por la Universidad Técnica de Dinamarca y NTCS comerciales (Sigma-Aldrich) diámetro 1,0-2,0 nm x longitud 0,5-2,0 μm . El ácido fólico (AF) y el quitosán (Ch) fueron adquiridos de Sigma-Aldrich, la mitelfosine (Sigma-Aldrich) fue utilizada como medicamento de referencia. Ver estructuras en **Tabla 2**

En el estudio de la expresión de receptores de AF se utilizó un anticuerpo policlonal IgG (FR C-17), para la detección de la PFF o FR de tipo α , β y menor proporción γ . Para la detección de este anticuerpo se utilizó un segundo anticuerpo, anti-goat-IgG, conjugado con el fluoróforo, Isocianato de fluoresceína (FITC). Los dos anticuerpos fueron adquiridos de Santa Cruz Biotechnology). Como contraste para las células expuestas a los anticuerpos se usó el azul de

Evans al $8,3 \times 10^{-5} \%$ y para marcar los ácidos nucleicos se utilizó la sonda, Hoechst 33342 ($0,5 \mu\text{m}/\text{mL}$) adquirido de Sigma-Aldrich.

Para las pruebas de citotoxicidad se utilizaron las sales de tetratrazolio MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazon-2-il)-2-difeniltetrazolio adquiridos de Sigma-Aldrich y el compuesto azul de alamar (AlamarBlue) adquirido de BioSource.

Figura 9. Diseño experimental



5.3 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES CON NTCS

Los NTCS se prepararon en dos soluciones.

En la primera, se acoplo chitosan a NTCS, 5 mg de NTCS fueron preparados en una solución de 30% de Ch en agua y sonicados en el equipo E-15H Elmasonic. Luego de la sonicación los NTC-Ch fueron centrifugados a 3800 rpm durante 20 minutos, la capa superior fue separada y el precipitado donde se encuentran madejas de NTC e impurezas de los catalizadores fue descartado.

La segunda, se busco acoplar AF al NTC directamente o a travez del chitosan previamente funcionalizado. Para el acoplamiento se desarrollaron dos métodos. En el primero se preparó una solución de 2,5 mM de AF en 0,02 M de carbonato de sodio (Na_2CO_3). Se dejó en agitación y se agregó la carbodimida (EDC) que actuaría como agente de acoplamiento entre el NTC y el AF. Esta mezcla se unió con los NTC-Ch disueltos en Buffer fosfato salino (PBS) estéril pH 7,2, dejándolos reaccionar en oscuridad y en agitación por 24 horas. Luego los compuestos se dializaron por otras 24 h para retirar los residuos no conjugados.

En el segundo método, se preparó una solución de 6,5 mM de AF con 20 μl de NaOH. Aparte en un recipiente estéril se pesaron 5 mg de NTCS y se le adicionó 5 mL de la solución de AF, posteriormente se agitó y se ultrasonicó (Ultrasonic processor de Cole-Parmer Instruments, modelo: cpx130PB) por 15 minutos en cabina de bioseguridad. Para retirar los NTCS insolubles la solución se centrifugó a 3800 rpm por 20 minutos y se midió la concentración por método de diferencia de pesos y por UV-Vis.

Estos procesos fueron realizados en las instalaciones del Centro de Investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP) en colaboración con el estudiante de

Doctorado en Química de la UIS John Jairo Castillo León del Centro de Investigación en Catálisis (CICAT) ubicado en la sede UIS-Guatiguará.

Se prepararon soluciones de trabajo con medio RPMI 1640 (Gibco Invitrogen Corporation) o Schneider (Sigma-Aldrich) sin SBFi inmediatamente antes de cada ensayo, realizando diluciones seriadas según el experimento.

5.4 PARÁSITOS Y LINEAS CELULARES

Se utilizaron promastigotes de *L. panamensis* MHOM/PA/71/LS94 (LS94), los cuales fueron cultivados en medio Scheneider, suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (SBFi) pH 7,2, a 28°C en oscuridad. Los amastigotes intracelulares de *L. panamensis* se obtuvieron, infectando las células THP-1 diferenciadas con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento, utilizando una relación de infección célula: parásito de 1:5 durante 48 horas a 32°C, 5% de 5% CO₂ y 95% de mezcla de aire. Las láminas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa y el porcentaje de infección fue determinado por conteo a 300 células en microscopio de luz transmitida.

Se utilizó la línea celular humana de leucemia monocítica aguda (THP-1, ATCC TIB 202), la cual fue cultivada en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBFi, 0,1% de penicilina-estreptomicina a 37°C, 5% CO₂ y 95% de mezcla de aire. La diferenciación de los monocitos THP-1 a su fenotipo adherente se realizó utilizando 80 ng/mL de acetato de forbol miristato (PMA por sus siglas en inglés) por 72 horas a 37°C, 5% de CO₂, 95% mezcla de aire. Se utilizó también la línea celular humana de osteosarcoma (HOS, ATCC CRL-1543), la cual fue cultivada en RPMI 1640 con 5% de SBFi, 0,1% de penicilina-estreptomicina a 37°C 5% de CO₂, 95% mezcla de aire.

5.5 DETERMINACION DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS FIJADORAS DE FOLATO (PFF).

La expresión de las PFF se determinó en células THP-1 infectadas y no infectadas con *L. panamensis* y en promastigotes de *L. panamensis*.

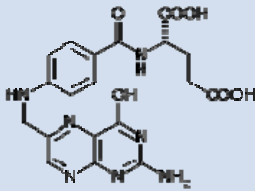
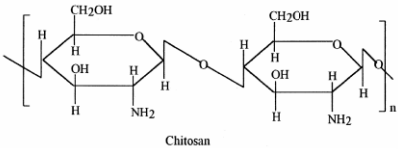
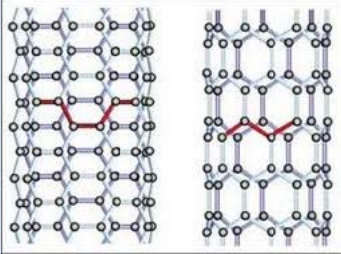
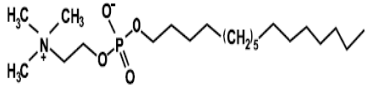
Las células THP-1 fueron diferenciadas a su fenotipo adherente en láminas de inmunofluorescencia a una concentración de 8×10^5 células/mL, fijadas con formalina al 3% y tratadas con suero humano al 10% y albúmina bovina sérica al 1% (BSA por sus siglas en inglés). Posteriormente fueron expuestas al anticuerpo FR C17 (10 µg/mL) por toda la noche a 4°C.

Terminado este periodo se realizó un lavado con PBS por 10 minutos en agitación, y se agregó el segundo anticuerpo (anti-goat IgG-FITC) diluido 1:20 en PBS con azul de Evans al $8,3 \times 10^{-5}$ % por 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente (22-24°C) en oscuridad. Luego las láminas fueron lavadas por 10 minutos con PBS en agitación y observadas en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400) utilizando el filtro B2A (Excitación= 450-490, Filtro dicroico= 500, Emisión=515).

Las células THP-1 diferenciadas en láminas de inmunofluorescencia fueron infectadas con promastigotes en fase estacionaria de crecimiento utilizando una relación de infección, célula: parásito, de 1:5 durante 48 horas a 32°C, 5% de CO₂ y 95% de mezcla de aire, luego fueron tratadas con los anticuerpos como anteriormente se describió.

Para evidenciar la infección por el parásito se marcó el ADN con la sonda Hoechst 33342 (0,5 µm/mL) por 10 minutos, luego del lavado con PBS, las láminas fueron observadas en el microscopio de fluorescencia utilizando el filtro B2A y el UV-2A (Excitación= 330-380, filtro dicroico= 400, Emisión = 420).

Tabla 2. Estructuras químicas de compuestos utilizados.

Compuesto	Formula Química	Peso Molecular	Estructura Química
Acido Fólico	$C_{19}H_{19}N_7O_6$	441,40	
Chitosan	$C_6H_{13}NO_5$	500	
NTCS			
Mitelfosine	$C_{21}H_{46}NO_4P$	407,57	

Los promastigotes de *L. panamensis* en fase exponencial de crecimiento se colocaron sobre las láminas de inmunofluorescencia y se dejaron secar para ser fijadas con formalina al 3%. Posteriormente se realizó el marcaje con los anticuerpos de la misma forma ya descrita, pero variando las concentraciones a 5 $\mu\text{g/mL}$ de FR C17 y dilución 1:40 en PBS con azul de Evans al $8,3 \times 10^{-5} \%$ del segundo anticuerpo.

La interpretación cualitativa se midió, por comparación de la intensidad de fluorescencia de color verde presente en las células infectadas y no infectadas y los promastigotes de *L. panamensis*.

5.6 ENSAYOS DE INTERNALIZACIÓN

Los ensayos se realizaron en células THP-1 y células HOS no infectadas. Las células THP-1 (8×10^5 células/mL) y las células HOS (6×10^4 células/mL) fueron cultivadas en placas de 24 pozos con laminillas circulares y tratadas con diferentes concentraciones de NTC-AF y NTC-Ch (0,125-0,03 mg/mL) de 2 a 72 horas a 37°C, 5% de CO₂, 95% de mezcla aire. Terminado el respectivo periodo de incubación, las laminillas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. El porcentaje de células con internalización positiva de los compuestos fue determinado microscópicamente por conteo directo de 300 células. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células con NTC internalizados. Cada concentración fue evaluada en dos experimentos independientes y se realizó el registro fotográfico en cada uno de los tiempos y concentraciones usadas.

5.7 REGISTRO FOTOGRÁFICO

El registro fotográfico fue realizado utilizando la cámara Nikon Coolpix 5000, se tomaron por lo menos 3 fotos de campos microscópicos independientes para los experimentos de expresión de receptores de AF e internalización de NTCS por coloración de Giemsa. Las fotos posteriormente fueron procesadas con el software ADOBE photoshop CS4 y el programa Picassa.

5.8 SISTEMA DE IRRADIACIÓN

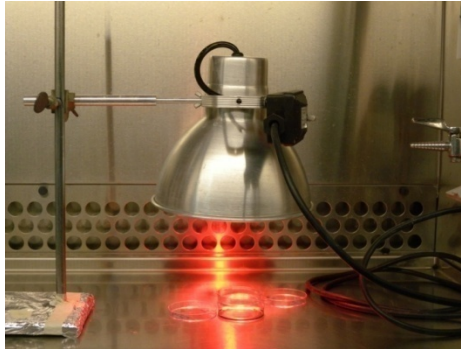
La irradiación IRC se realizó utilizando una lámpara comercial que emite luz de longitud de onda entre 800-1000 nm, a una distancia estándar de 12 cm en cada uno de los experimentos con una potencia 45 mW. La estandarización de las condiciones de la lámpara se estableció, midiendo el espectro de emisión de luz, además para orientar los periodos de tiempos de irradiación.

Se realizó una curva de calentamiento como lo describe Burlakla y colaboradores (Burlaka, Lukin et al. 2010), midiendo la temperatura en intervalos de 30 segundos, a soluciones de RPMI 1640 con y sin NTC-AF (2 ug/mL) irradiadas con lámpara de IRC, a una distancia de 12 cm. Se evaluó el efecto del IRC por 2, 4 y 8 min de exposición sobre las células HOS; THP-1 infectadas y no infectadas; y promastigotes de *L. panamensis*; todos tratados y no tratados con una concentración de 0,1 mg/mL de NTCS-AF por 24 horas. Los experimentos se realizaron conservando la esterilidad, irradiando dentro de cabina de bioseguridad. (Figura 10)

5.9 EFECTO DEL IRC EN LAS CELULAS

Para determinar que la lámpara no inducía la muerte en las células no tratadas con las soluciones de NTC-AF, se evaluó el efecto del IRC por 2, 4 y 8 min de exposición sobre las células HOS, THP-1, sin tratar con NTC; a las 24h después de la irradiación se evaluó la fototoxicidad por conteo en hemocitómetro utilizando el colorante de exclusión, la eosina amarilla.

Figura 10. Sistema de Irradiación.



Lampara infraroja comercial, dentro de cabina de bioseguridad, irradiando células de mamíferos expuestas a la solución de NTC-AF

5.10 PRUEBA DE TOXICIDAD EN CÉLULAS DE MAMÍFERO

Las células HOS y las células THP-1 transformadas fueron tratadas con diluciones seriadas 1:2 por triplicado con NTC-Ch y NTC-AF por 24 horas. Células controles fueron mantenidas sin tratamiento. La toxicidad celular fue determinada por el método fluorométrico de AlamarBlue y por el método colorimétrico de MTT.

El método de AlamarBlue consistió en adicionar 20 μ L de AlamarBlue (10%) a cada pozo e incubar por 4 horas en oscuridad a 37° C, 5%CO₂, 95% mezcla-aire. Luego se realizó la lectura en el fluorometro LS55 (Perkin Elmer) con una excitación de 560 nm y una emisión de 590 nm.

Por su parte el método MTT se realizó adicionando 20 μ l de MTT (5 mg/mL) a cada pozo e incubando por 4 horas. Luego 100 μ l de DMSO/pozo fueron agregados para diluir los cristales de formazan. Las absorbancias fueron determinadas espectrofotométricamente a una densidad óptica de 580 nm utilizando el lector de microplacas Anthos 2020. El porcentaje de toxicidad se calculó a través de la formula: toxicidad (%)= 100 x (OD/IF grupo control-OD/IF

grupo tratado) /OD grupo control. (OD= densidad óptica, IF: intensidad de fluorescencia).

Con estos datos se calculó la concentración inhibitoria 50 y 90 (CI_{50} y CI_{90}), calculadas por análisis de regresión sigmoideal utilizando el software MS xlfít (ID Business Solution, Guildford, UK).

5.11 ACTIVIDAD FOTOTÓXICA

Los ensayos de actividad fototóxica estuvieron orientados a determinar el efecto de diferentes concentraciones de NTC en las células y parásitos después de tratamiento e irradiación con IRC. Se analizaron en células HOS, THP-1 y en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis*. En todos los experimentos se realizó un control de células tratadas sin irradiar.

5.12 Prueba de fototoxicidad en células de mamíferos

Las células HOS y las células THP-1 transformadas a su fenotipo adherente fueron tratadas con una concentración de 0,125 mg/mL de NTC-AF e incubados por 24 horas a 37°C, 5%CO₂, 95% mezcla-aire. Células controles fueron mantenidas sin tratamiento. Posteriormente, el medio fue reemplazado por medio RPMI 1640 10% de SBFi y las células fueron irradiadas con IRC por 2, 4 y 8 minutos. En una placa diferente, las células tratadas con NTC-AF y las células controles fueron mantenidas sin irradiación. La toxicidad se evaluó por conteo en hemocitómetro utilizando como colorante vital la eosina amarilla. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de muerte celular. Cada experimento fue repetido tres veces.

5.13 Ensayos en promastigotes de *L. panamensis*.

Los promastigotes de *L. panamensis* (5×10^5 promastigotes/mL) fueron tratados con una concentración de 0,125 mg/mL de NTC-AF e incubados por 24 horas en oscuridad a temperatura ambiente. Posteriormente se irradiaron con IRC (800-1000 nm) por 2, 4 y 8 minutos. Los parásitos tratados y no tratados con NTC-AF fueron mantenidos sin irradiación, de la misma forma parásitos sin tratar con NTC-AF fueron irradiados en las mismas condiciones. La inhibición del crecimiento de los parásitos fue determinada realizando recuento microscópico en hemocitometro por el método de exclusión de eosina amarilla. Los resultados obtenidos se expresaron como porcentaje de inhibición.

5.14 Ensayos de toxicidad en amastigotes intracelulares de *L. panamensis*.

Células THP-1 fueron transformadas con PMA en cámaras de vidrio con sistema deslizante (labteck de NUNC) fueron infectadas con promastigotes de *L. panamensis* (fase estacionaria de crecimiento) utilizando una relación de infección de 1:5 célula: parásito por 48 horas a 32°C, 5% CO₂, 95% mezcla de aire. Después fueron tratadas con diluciones seriadas 1:2 de NTC-AF (0,25 a 0,016 mg/mL) por 24 horas. Posteriormente, se irradiaron con IRC (800-1000 nm) por 2, 4 y 8 minutos. Células infectadas controles tratadas y no tratadas con NTC-AF fueron mantenidas sin irradiación. De igual forma células infectadas no tratadas fueron irradiadas en las mismas condiciones. Luego, las células fueron fijadas con metanol por 10 minutos y coloreadas utilizando la tinción de Giemsa.

El porcentaje de infección fue determinado microscópicamente por conteo directo contando el número de células infectadas en 300 células. Se considero célula infectada aquella que contenía al menos un amastigote intracelular, cada concentración fue evaluada por duplicado en cada uno de los dos experimentos

independientes. El efecto del compuesto con relación a los tiempos de exposición al IRC fue expresada como la concentración citotóxica para el 90% de las células (CC₉₀) calculadas por análisis de regresión sigmoideal utilizando el software MSXIfit™, ID Bussines solutions, Guildford UK, para cada uno de los tiempos probados.

Los ensayos en parásitos y células se realizaron en el laboratorio de Quimioterapia del Centro de investigación de Enfermedades Tropicales (CINTROP) ubicado en la sede UIS-Guatemala.

5.15 ANALISIS DE RESULTADOS

Las diferencias en la expresión de PFF fueron analizadas cualitativamente, por observación en microscopio de epifluorescencia y registro fotográfico, de similar forma, se evaluó cualitativamente la internalización de los conjugados de NTC en los dos tipos celulares por evaluación microscópica de láminas coloreadas con Giemsa, se tomo como célula positiva para NTC, toda célula que presentara una acumulación visible y definida de NTC. Los porcentajes de internalización se graficaron y analizaron a través del programa GraphPad Prism versión 5.03.

Las variaciones en la internalización de los conjugados se analizó en cada tipo celular, usando el test de análisis de varianza de una vía (ANOVA por sus siglas en inglés) y utilizando el análisis de comparación de múltiples medias –Tukey, con este test también se analizó la influencia de los tiempos de incubación sobre el porcentaje de internalización.

El efecto del IRC sobre el sistema biológico probado se graficó y analizó con el programa GraphPad Prism versión 5.03. La actividad citotóxica de los conjugados irradiados y no irradiados con IRC fue expresada como CC₅₀, CC₉₀ determinado

por análisis de regresión sigmoïdal utilizando el programa *XLfit4*TM. (ID Business Solution, Guildford, UK)

La actividad tóxica del IRC sobre promastigotes de *L. panamensis* tratados con una sola concentración de NTC-AF fue evaluado con el parámetro de TI₅₀ y TI₉₀, que es el tiempo necesario para inhibir la mitad o el 90% de la población de promastigotes, y se determinó por análisis de regresión sigmoïdal a partir de porcentajes de inhibición en cada tiempo en comparación con el control, utilizando el programa *XLfit4*TM. (ID Business Solution, Guildford, UK)

6 RESULTADOS

6.1 ESTABILIDAD DE LAS SOLUCIONES DE NTC

6.1.1 Los NTC-Ch fueron solubles en soluciones acuosas.

Los NTC funcionalizados con Chitosan fueron solubles en agua, PBS pH 7,4 y medios de cultivo celular después del proceso de preparación como se describió en materiales y métodos. Se presentó precipitación de los NTC al tercer día de almacenamiento a 4°C. Se demostró la insolubilidad de los NTC cuando fueron mezclados directamente con solventes acuosos (Figura 11). Después del proceso de centrifugación siempre se obtuvieron soluciones de NTC de hasta 3,5 mg/mL.

Figura 11. Solubilidad de NTC en chitosan y agua.



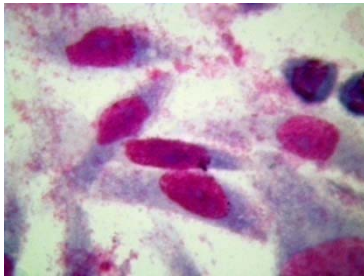
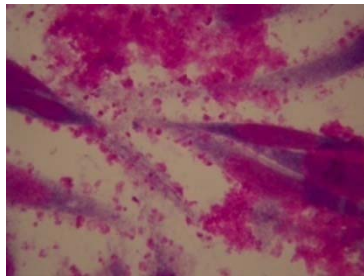
En la Figura se observa (a) mezcla soluble de NTC-Ch. (b) NTC insoluble en agua.

6.1.2 Los NTC-Ch-AF fueron solubles y estables en soluciones acuosas pero presentaron una alta toxicidad en células.

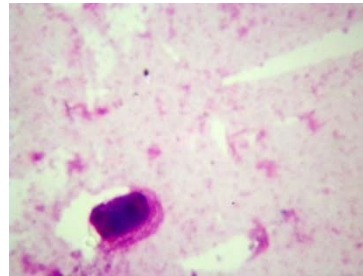
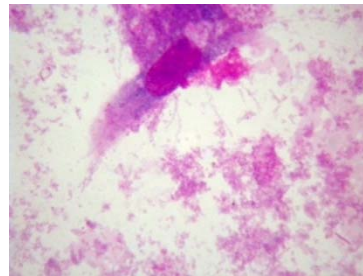
Los NTC funcionalizados con quitosan fueron acoplados a ácido fólico a través de EDC, el ácido fólico fue disuelto en carbonato de sodio (Na_2CO_3), la solución resultante fue homogénea, los NTC se solubilizaron y solo presentaron precipitación al tercer día después de la preparación, sin embargo, al poner en contacto esta solución con las células THP-1 y HOS presentaron una fuerte citotoxicidad, que produjo cambios morfológicos sobre la células, (Figura 12), Según las pruebas realizadas los efectos citotóxicos eran producidos por el Na_2CO_3 conjugado y libre, la dialización para retirar estos y otros residuos no conjugados resulto en la precipitación completa de los NTC.

Figura 12. Efecto del carbonato de sodio sobre células HOS

HOS con Acido fólico- Na_2CO_3



HOS con Na_2CO_3



En la figura se observa el daño celular posiblemente ocasionado por el Na_2CO_3 , en células HOS, las flechas negras indican los detritos celulares. La primera columna corresponde a células HOS tratadas con AF disuelto en Na_2CO_3 , la segunda columna corresponde a células HOS tratadas solo con la misma concentración de Na_2CO_3 .

6.1.3 La solución de NTC-AF tuvo una alta concentración de NTC, fue soluble en soluciones acuosas y estables en el tiempo.

La funcionalización de NTC-AF por ultrasonificación por sonda resultó en una solución con concentraciones más elevadas de NTC tan altas como 930 µg/mL de NTC, la mezcla fue homogénea, y no presentó precipitación de los NTC hasta por 6 días almacenada 4°C. (Figura 13)

Figura 13. Fotografía de soluciones de NTC



En las fotografías se muestra, (a) solución de NTC funcionalizada y solubilizada en AF obtenida por ultrasonificación por sonda, (b) solución de NTC-AF después de retirar las NTC insolubles por centrifugación, (c) solución de NTC-Ch obtenida por sonicación sin sonda después de retirar NTC insolubles por centrifugación. .

6.2 EXPRESIÓN DE PROTEINAS LIGADORAS DE FOLATO.

La expresión de PRL se evaluó incubando las células o parásitos con los anticuerpos FR C17 y el segundo anticuerpo marcado con FITC, permitiendo observar por microscopia de epifluorescencia de color verde, la presencia de la proteína, el citoplasma fue teñido con azul de Evans que se observa con fluorescencia roja. La infección de las células THP-1 infectadas con *L. panamensis* se observó con la sonda Hoechst 33342 que tiñó de azul los ácidos nucleicos.

6.2.1 Los promastigotes de *L. panamensis* presentaron una alta expresión de PFF.

En la **Tabla 3** se muestra el registro fotográfico de los promastigotes de *L. panamensis* expuestos a los anticuerpos FR C17 y al anti-goat IgG-FITC, se observó un color verde en la mayoría del cuerpo de los cuerpos de los promastigotes, con una particular y marcada distribución en la parte anterior y posterior del parásito, área de bolsillo flagelar y zona apical, respectivamente. Según las observaciones se puede inferir que los promastigotes en fase exponencial de crecimiento presentan una expresión alta y constante de proteínas ligadoras de folato, lo cual se registró en todas las fotografías tomadas en tres experimentos independientes, cada condición por duplicado.

6.2.2 Las células THP-1 mostraron una baja expresión de PFF.

La expresión de PRL en células THP-1 se observó en una baja proporción, el color verde que denota la presencia de la proteína, se localizó en la periferia de las células. En la **Tabla 4**, se muestra el registro fotográfico de las imágenes más representativas de tres experimentos independientes.

6.2.3 Las células THP-1 infectadas con *L. panamensis* muestran una moderada expresión de PFF

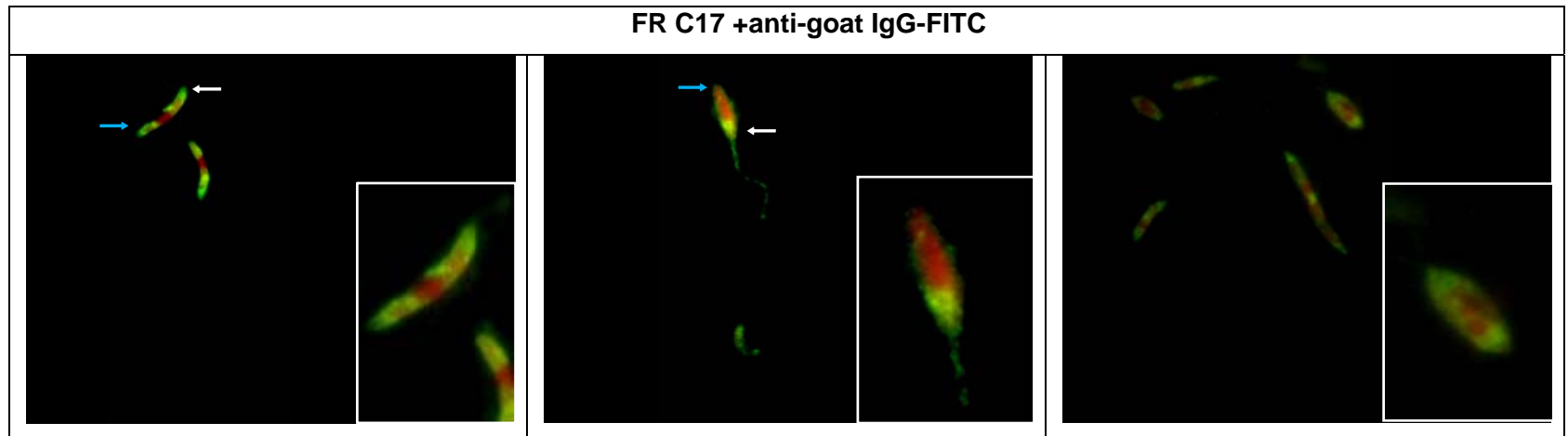
En las células THP-1 infectadas con *L. panamensis* como se muestra en la **Tabla 5**, se observa una moderada expresión de PFF, el color verde que se registra por microscopia de fluorescencia, se ubica en la periferia de la célula con una intensidad mayor que en células THP-1 no infectadas, el citoplasma de estas células fue teñido con azul de Evans en el que está disuelto el anti-anticuerpo, observándose fluorescencia roja en el citoplasma de la célula y de los amastigotes

de *L. panamensis*, la infección se registró con la sonda Hoesch 33342, que marca de color azul los ácidos nucleídos de parásitos y células .

6.2.4 Las células THP-1 con limitación de AF, sobreexpresaron PFF.

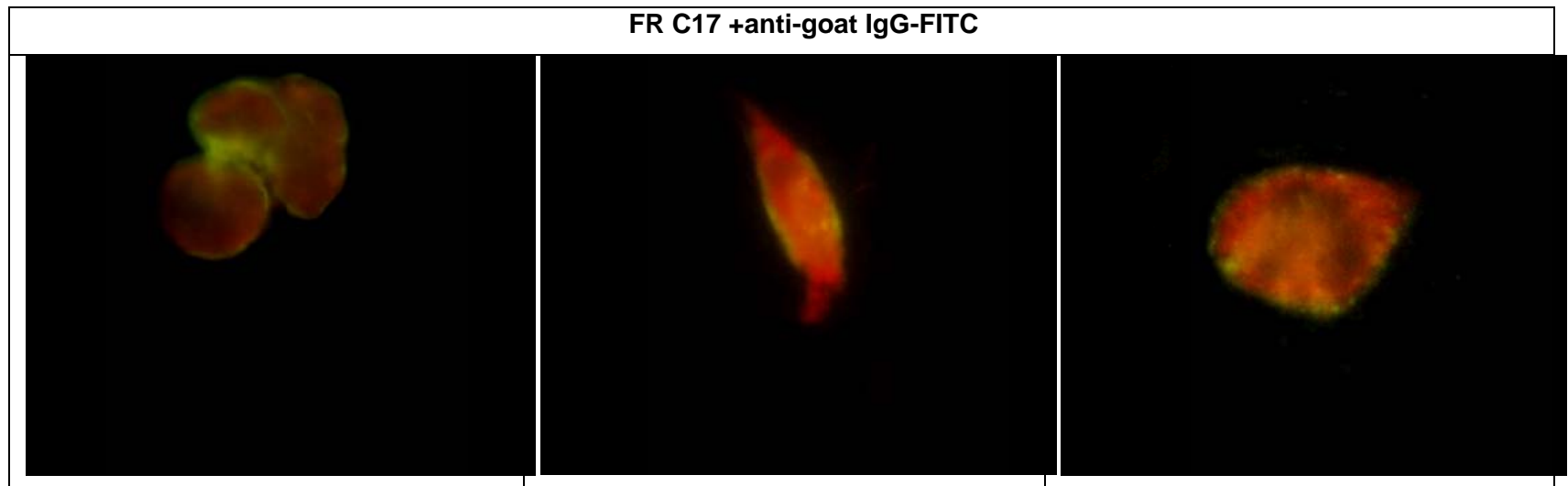
Las células THP-1 que fueron estimuladas para aumentar la expresión de PFF, después fueron tratadas con los anticuerpos para reconocimiento de las PFF, mostraron una alta fluorescencia verde en comparación con las células THP-1 infectadas y no infectadas, la fluorescencia se distribuyó por la mayoría de la célula, el citoplasma mostro la fluorescencia roja característica del azul de Evans. El registro fotográfico de estos hallazgos se muestra en la **Tabla 6**.

Tabla 3. Expresión de PRL en promastigotes de *L. panamanensis*



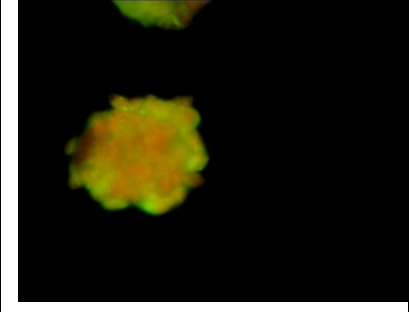
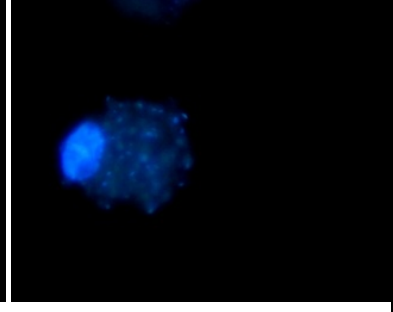
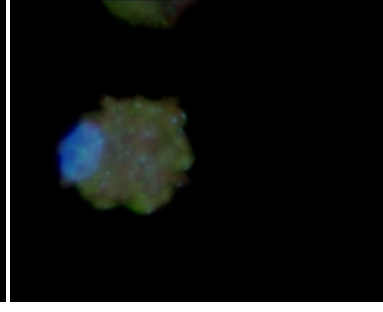
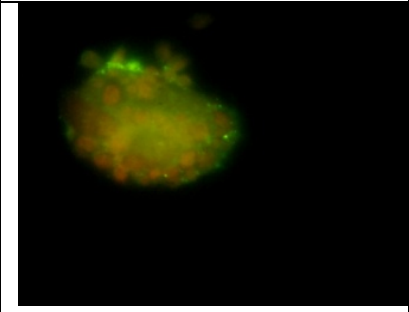
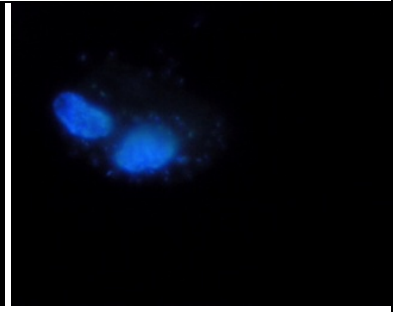
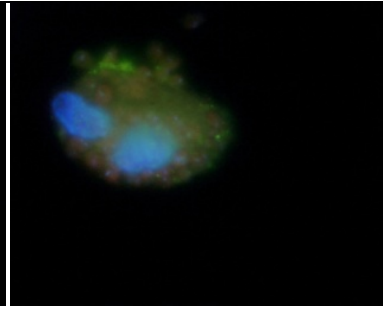
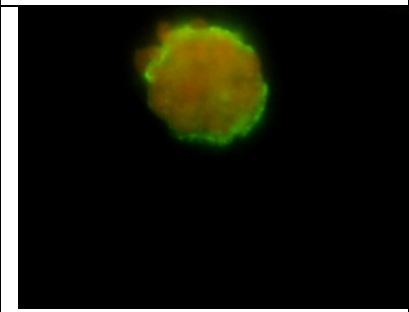
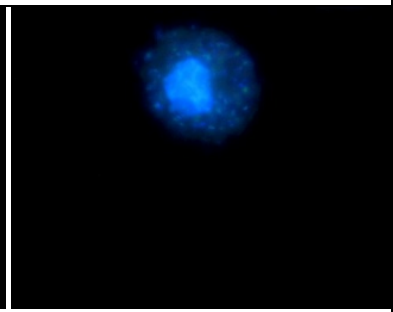
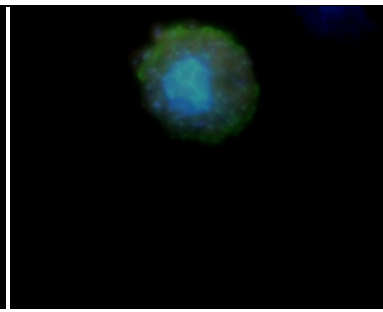
En la tabla se muestra el registro fotográfico, obtenido en microscopio de epifluorescencia de promastigotes de *L. panamensis* en los que se observa, la expresión de PFF (verde), el cuerpo del parásito está teñido con azul de evans (rojo), las flechas blancas indican la parte anterior (bolsillo flagelar), las flechas azules indican la parte posterior del cuerpo del promastigote, en la esquina inferior derecha se muestra la ampliación digital para un promastigote.

Tabla 4. Expresión de PFF en células THP-1.



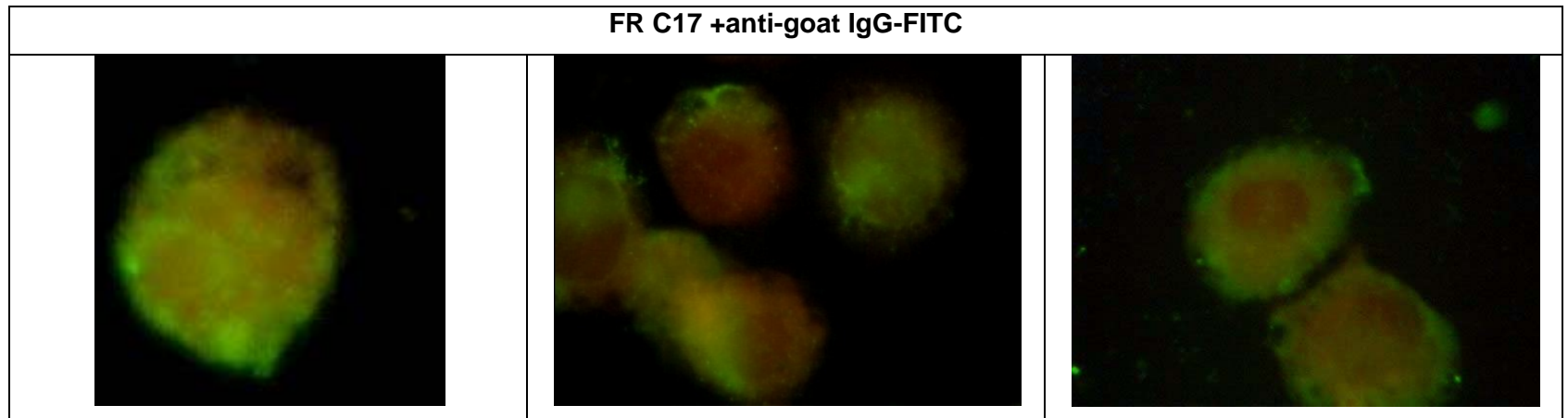
En la tabla se muestra el registro fotográfico, obtenido en microscopio de epifluorescencia de células THP-1 en las que se observa la expresión de PFF (verde), el citoplasma de la célula está teñido con azul de Evans (rojo) como contraste. La fluorescencia de las PFF, se presenta en el borde de las células con un color verde de intensidad media.

Tabla 5. Expresión de PFF en células THP-1. Infectadas con *L. panamensis*

a. FR C17 + anti-goat IgG-FITC	b. Hoesch 33342 Control Infección	c. Superposición
		
		
		

En la tabla se muestra el registro fotográfico de la expresión de PFF de color verde, obtenido en microscopio de epifluorescencia, en células THP-1 infectadas con *L. panamensis*, el citoplasma de la célula al igual que de los amastigotes intracelulares están teñidos con Azul de Evans (rojo), como contraste. El ADN de los amastigotes intracelulares de *L. panamensis* y de las células THP-1, fue visualizado con la sonda Fluorescente Hoechst 3342 (azul) (columna b). La columna c muestra la superposición de células lograda digitalmente.

Tabla 6. Expresión de PFF en células THP-1 con limitación de ácido fólico.

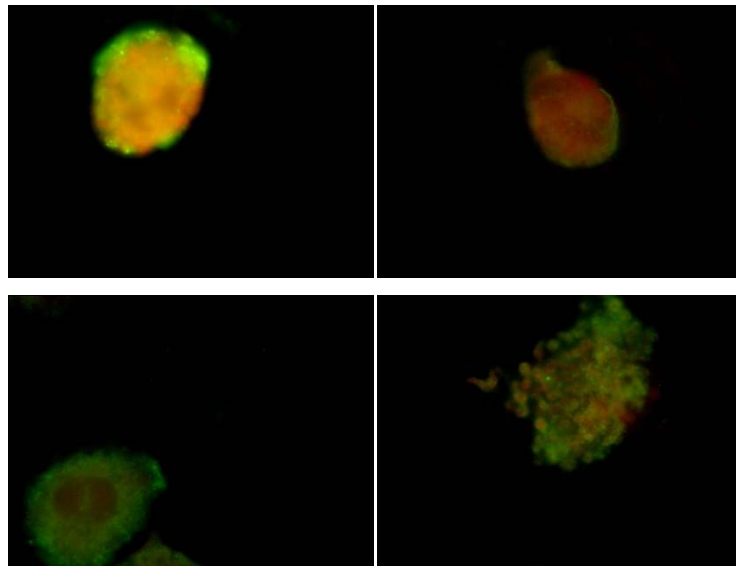


En la tabla se muestra el registro fotográfico, obtenido en microscopio de epifluorescencia de las células THP-1 estimuladas para sobreexpresar PFF, se observa la alta expresión de PFF de fluorescencia verde, y el contraste rojo dado por el azul de Evans, que se difunde en el citoplasma celular.

6.2.5 La infección con amastigotes de *L. panamensis* aumenta moderadamente la expresión de PFF en las células hospedero.

La infección de las células THP-1 con promastigotes de *Leishmania* evidenció un aumento en la expresión de PFF en la célula hospedero, como se observa en la **Figura 14**, la comparación de células THP-1 infectadas (a) y no infectadas (b), muestra mayor cantidad de fluorescencia verde en las primeras, sin embargo, esta expresión no fue tan alta como la presentada por células THP-1 previamente estimuladas para sobreexpresar PFF (c), además según la evaluación de los tres experimentos realizados la expresión de PFF no parece estar afectada por el número de amastigotes intracelulares, sin embargo se pudo observar en los amastigotes que se encontraban libres una marcada fluorescencia verde. (d).

Figura 14. Comparación de la expresión de PFF.



En la figura se muestra la expresión de PFF, (a) células THP-1 infectada con *L. panamensis*, se observa fluorescencia verde moderada en la periferia celular, además se logran apreciar los amastigotes intracelulares teñidos con azul de Evans, (b) Célula THP-1, con menor fluorescencia, (c) Célula THP-1 estimulada para la expresión de PFF, donde se observa la mayor fluorescencia obtenida (d) amastigotes libres de *L. panamensis*, en los que se puede observar PFF en la periferia de su cuerpo y azul de Evans distribuido en su citoplasma

6.3 INTERINTERNALIZACIÓN DE SOLUCIONES DE NTC EN CELULAS DE MAMIFERO

Se evaluó la internalización de las soluciones de NTC-Ch y NTC-AF en las células HOS y THP-1, a diferentes concentraciones y por tres períodos de tiempo 24, 48 y 72 horas, reportando el porcentaje de células positivas para NTC en diferentes concentraciones a través del tiempo. Previamente se evidenció la capacidad de internalización de la solución NTC-Ch en las células HOS y THP-1 en periodos de tiempo de 1 a 48 horas, mostrando en las dos tipos de células utilizadas, una evidente internalización evaluable por el método de Giemsa a partir de las 24 horas. (**Figura 15**).

6.3.1 El porcentaje de internalización de NTC-Ch en células HOS y THP-1 aumenta a través del tiempo.

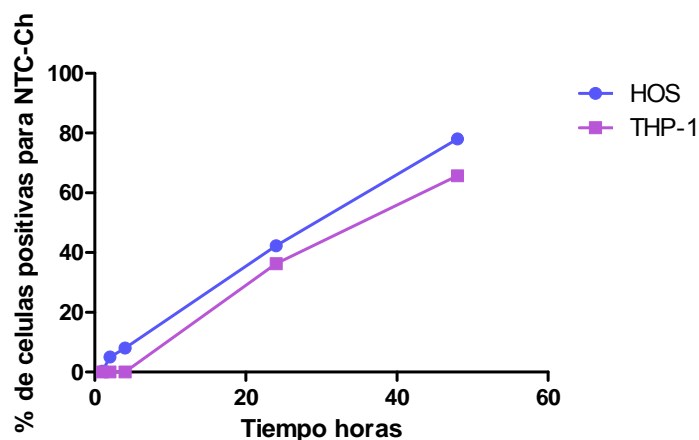
Cuando las células HOS y THP-1 fueron expuestas a una concentración de 165 µg/mL de NTC-Ch se pudo observar en las láminas coloreadas con Giemsa la internalización de esta solución. En los periodos más cortos de tiempo, 1 a 4 horas, el porcentaje de células HOS positivas para NTC-Ch no superó el 8%; después de las 24 horas se incrementó el porcentaje obteniendo hasta más del 65% a las 48 horas para ambas células. El porcentaje más alto de internalización se obtuvo con las células HOS alcanzando un 78%. (**Figura 15**).

6.3.2 El porcentaje de internalización de NTC-Ch y NTCAF en células HOS es dependiente de la concentración de NTC.

Las soluciones de NTC fueron internalizadas en células HOS. A menor concentración utilizada menor porcentaje de células fueron positivas para NTC, independiente de la molécula con la que fueron funcionalizadas (AF o Ch).

En promedio las soluciones de NTC-Ch obtuvieron mayores porcentajes de internalización a través del tiempo, llegando a alcanzar porcentajes superiores al 60% en la mayor concentración probada de 125 µg/mL. La solución de NTC-AF solo alcanzó porcentajes de internalización superiores al 50% en la concentración más alta probada (125 µg/mL). En las concentraciones inferiores se obtuvieron porcentajes menores al 30% durante las 72 horas de los experimentos. En la mayoría de los casos, la internalización aumentó hasta las 48 horas excepto para la concentración de 125 µg/mL de NTC-Ch, que presentó una disminución desde las 48 horas (**Figura 16**). Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de internalización entre las dos conjugados probados en células HOS ($P>0,05$)

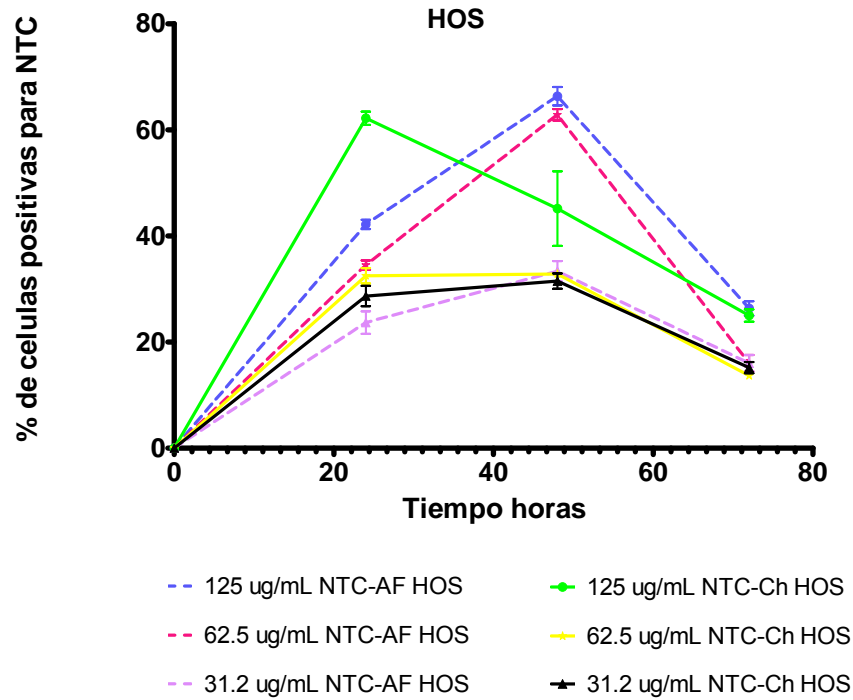
Figura 15. Porcentaje de células con internalización de NTC-Ch.



Porcentaje de internalización de NTC-Ch					
165 µg/mL					
HOS					
Tiempo horas	1	2	4	8	48
%	0,33	5,0	8,0	42,33	78
THP-1					
%	NC	NC	NC	36,33	65,67

Los porcentajes se obtuvieron por conteo a 300 células en láminas coloreadas con Giemsa observadas en microscopio de luz transmitida. NC: no calculado.

Figura 16. Porcentajes de internalización de NTC-Ch y NTC-AF en células HOS



La grafica muestra los porcentajes de internalización en celuas HOS, de tres concentraciones de NTC-Ch (líneas continuas) y NTC-AF (líneas punteadas), a travez del tiempo, se observa como los porcentajes mas altos de internalizaciones, en la mayoría de los casos, se registran hasta las 48 horas, disminuyendo en todos los casos a las 72 horas.

6.3.3 Los NTC fueron internalizados en células THP-1 con variación en los conjugados y concentraciones probadas a través del tiempo.

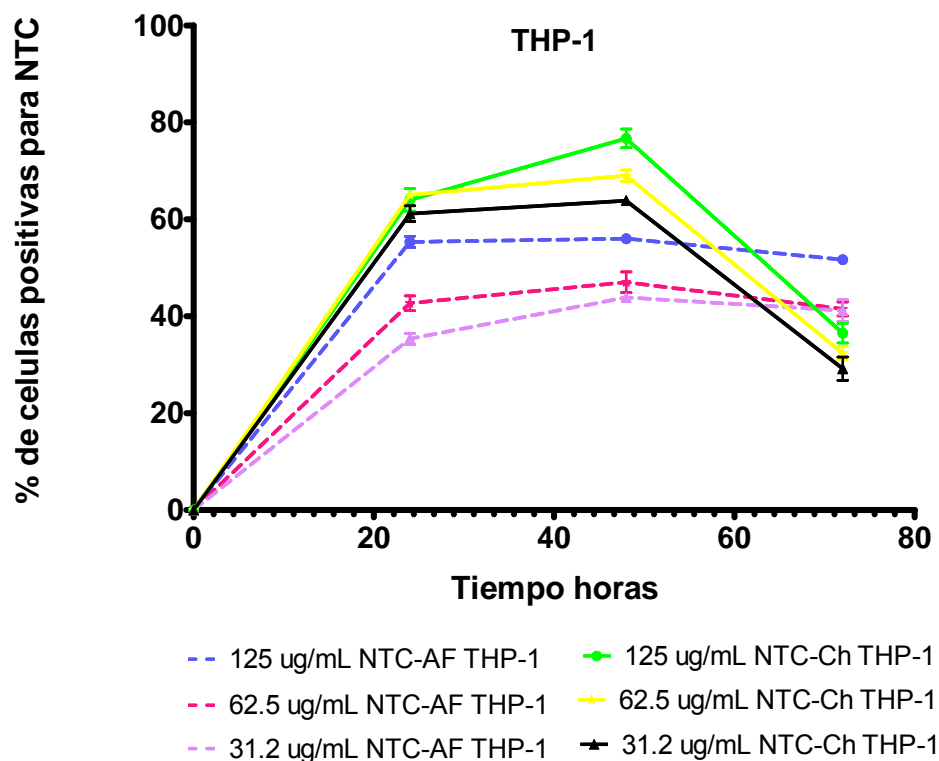
Como se observa en la **Figura 17**, la mayor internalización, de más del 60%, se obtuvo con el conjugado de NTC-Ch a una concentración de 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sin embargo, el conjugado NTC-AF fue el que mantuvo un porcentaje de internalización similar durante las 72 horas de los experimentos.

El conjugado NTC-Ch mostró disminución en el porcentaje de internalización a las 72 horas. Sin embargo, en todos los tiempos y concentraciones a mayor

concentración mayor porcentaje de internalización. Se observaron diferencias significativas en el porcentaje de internalización entre las dos conjugados probados en células THP-1.

Además al comparar todas las poblaciones celulares y las condiciones probadas el test T indica, que existe diferencia significativa entre los dos tipos celulares probados.

Figura 17. Porcentajes de internalización de NTC-Ch y NTC-AF en células THP-1



La grafica muestra los porcentajes de internalización en células THP-1 de tres concentraciones de NTC-Ch (líneas continuas) y NTC-AF (líneas punteadas), a travez del tiempo, se observa como los porcentajes mas altos de internalizaciones, en todos los casos, se registran hasta las 48 horas, el porcentaje de células positivas para NTC disminuye en las células tratadas con NTC-Ch, mientras que las células tratadas con NTC-AF, el porcentaje se mantiene estable.

6.4 ANALISIS CUALITATIVO DEL REGISTRO FOTOGRAFICO

6.4.1 Los conjugados NTC-Ch se localizaron en agrupaciones en el citoplasma celular.

Al evaluar la internalización del conjugado NTC-Ch a una concentración fija de 165 µg/mL en las células HOS y THP-1 se evidenció la formación de agrupaciones en el citoplasma en posibles vacuolas, que se observan como manchas negras dentro de un espacio redondeado de fondo blanco. Las aglomeraciones de los NTC casi siempre fueron únicas en el citoplasma y el tamaño de esta agrupación dependió del tiempo de incubación y el tipo celular. Tabla 7.

6.4.2 La internalización de los conjugados de NTC en células HOS mostraron formación de una vacuola única y definida.




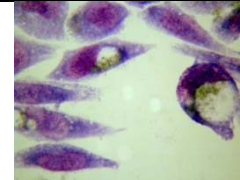
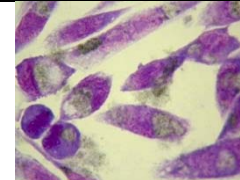
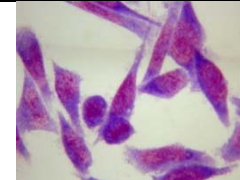
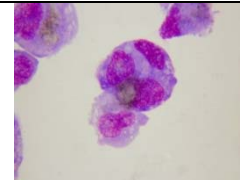
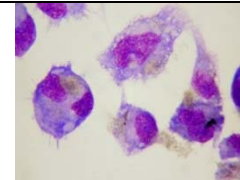
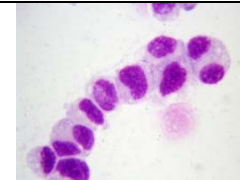
Independiente del conjugado NTC.Ch o NTC AF, se evidenció la formación de una posible vacuola que contenía los NTC. En las concentraciones más altas las aglomeraciones presentaron un mayor tamaño. A las 72 horas no todas las células presentaron la internalización pero las que lo tenían siguieron manteniendo el mismo tamaño registrado en periodos inferiores de tiempo. Se observaron células con la formación del aglomerado y en replicación celular. Las aglomeraciones nunca estuvieron ubicadas en la zona del núcleo celular (**Tabla 8 y 9**).

6.4.3 El conjugado NTC-AF mostró una ubicación intracelular más definida en células THP-1 que el NTC-Ch.

En las células THP-1 tratadas con NTC-Ch no se observaron aglomeraciones bien definidas. En concentraciones altas muchas de las células pierden sus características morfológicas y no se puede definir con exactitud el citoplasma celular; mientras en concentraciones menores o a mayores tiempos de incubación se logran observar una única acumulación en el citoplasma que en muchos casos ocupa más del 50% del tamaño del citoplasma.

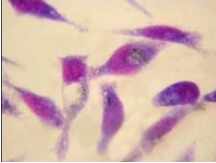
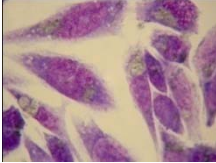
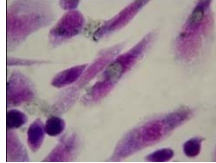
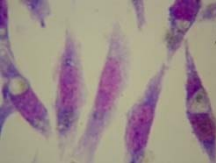
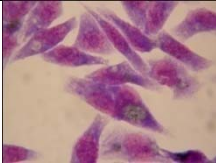
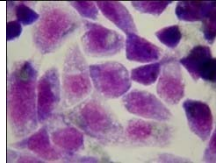
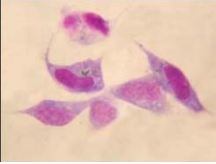
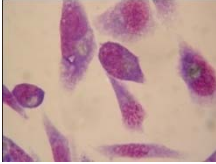
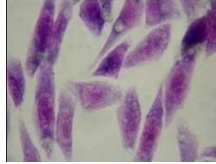
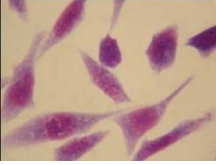
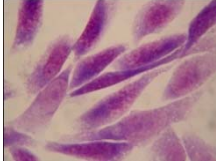
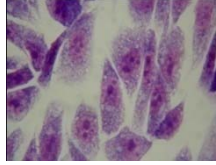
Por su parte en el conjugado NTC-AF se observa algunas veces la formación de varias aglomeraciones en el citoplasma ubicadas en posibles vacuolas, el tamaño de estas depende de la concentración con la que las células fueron tratadas; a mayores concentraciones, la aglomeración es de mayor tamaño ocupando gran parte del citoplasma; sin embargo, en la misma concentración pero en periodos de incubación mayores las aglomeraciones fueron más pequeñas. Los detalles gráficos de estas apreciaciones se pueden observar en las **Tablas 10 y 11**.

Tabla 7. Internalización de NTC-Ch en células HOS y THP-1 a través del tiempo.

Células HOS con NTC-Chitosan Concentración: 165 µg/mL					
1 Hora	2 Horas	4 horas	24 horas	48 horas	Control
					
Células THP-1 con NTC-Chitosan Concentración: 165 µg/mL					
1 hora	2 horas	4 horas	24 horas	48 horas	Control
NR	NR	NR			

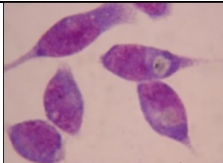
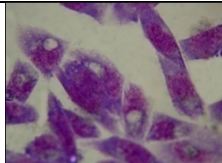
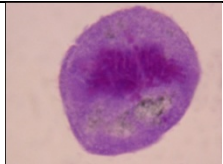
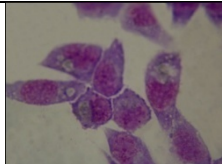
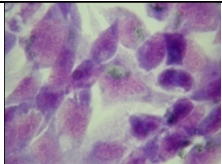
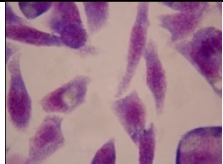

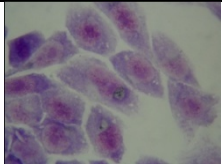
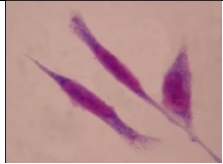
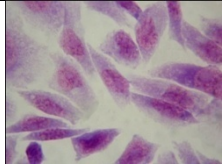
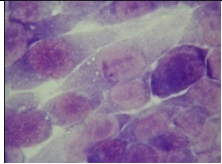
Fotografías tomadas en microscopio de luz transmitida con cámara Nikon Coolpix 5000, NR: no registradas en este estudio, las fechas azules () señalan algunos de los NTC en el citoplasma celular. En las células HOS, los primeros tres tiempos mostrados, 1, 2, y 4h, muestran una baja internalización que aumenta considerablemente a partir de las 24 horas. En las células THP-1 se observan la acumulación de NTC en el citoplasma celular en las 24 y 48h

Tabla 8. Internalización de NTC-Ch en células HOS.

NTC Ch en células HOS			
Tiempo	24 horas	48 horas	72 horas
Concentración $\mu\text{g/mL}$			
125			
62,5			
31,2			
Control			

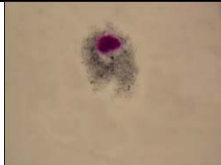
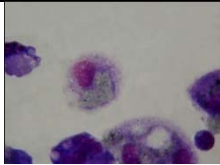
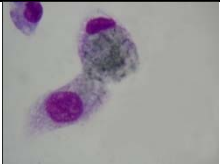
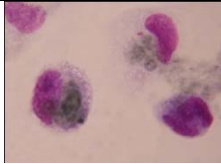
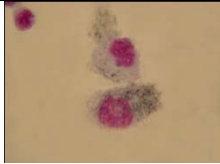
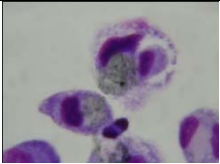
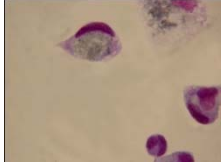
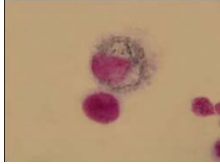
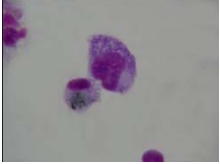
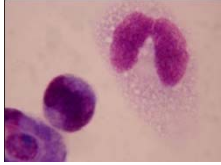
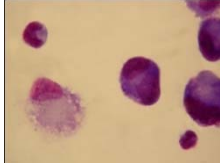
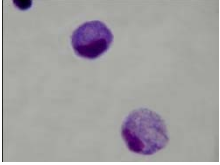
Fotografías tomadas en microscopio de luz transmitida con cámara Nikon Coolpix 5000, las imágenes muestran células HOS coloreadas con Giemsa, que muestran los NTC, agrupados en el citoplasma. En la tabla se muestran las fotografías más representativas de tres experimentos independientes

Tabla 9. Internalización de NTC-AF en células HOS

NTC-AF en células HOS				
Concentración $\mu\text{g/mL}$	Tiempo	24 horas	48 horas	72 horas
	125			
62,5				
31,2				
Control				

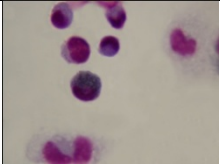
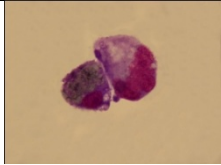
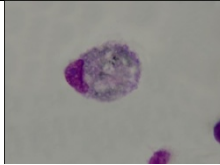
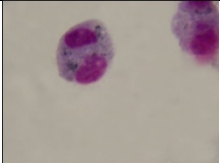
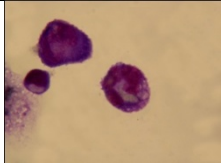
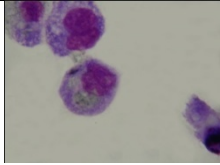
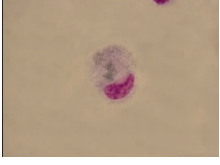
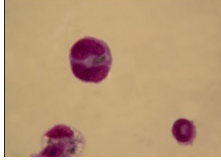
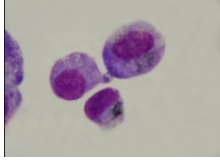
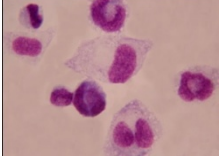
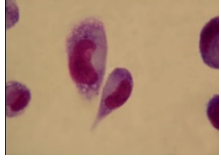
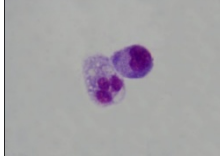
Fotografías tomadas en microscopio de luz transmitida con cámara Nikon Coolpix 5000, las imágenes muestran células HOS coloreadas con Giemsa, que muestran los NTC-AF, agrupados en el citoplasma. También se puede observar células en división celular. En la tabla se muestran las fotografías más representativas de tres experimentos independiente.

Tabla 10. Internalización de NTC-Ch en células THP-1

NTC Ch en células THP-1				
	Tiempo	24 horas	48 horas	72 horas
Concentración µg/mL				
125				
62,5				
31,2				
Control				

Fotografías tomadas en microscopio de luz transmitida con cámara Nikon Coolpix 5000, las imágenes muestran células THP-1, coloreadas con Giemsa, donde se observan los NTC-Ch distribuidos en el citoplasma. En la tabla se muestran las fotografías más representativas de tres experimentos independiente.

Tabla 11. Internalización de NTC-AF en células THP-1

NTC AF en células THP-1				
	Tiempo	24 horas	48 horas	72 horas
Concentración µg/mL				
125				
62,5				
31,2				
Control				

Fotografías tomadas en microscopio de luz transmitida con cámara Nikon Coolpix 5000, las imágenes muestran células THP-1, coloreadas con Giemsa, donde se observan los NTC-AF en agrupaciones únicas ubicadas en el citoplasma. En la tabla se muestran las fotografías más representativas de tres experimentos independientes.

6.5 ANALISIS ESTADISTICO DE LA INTERNALIZACION

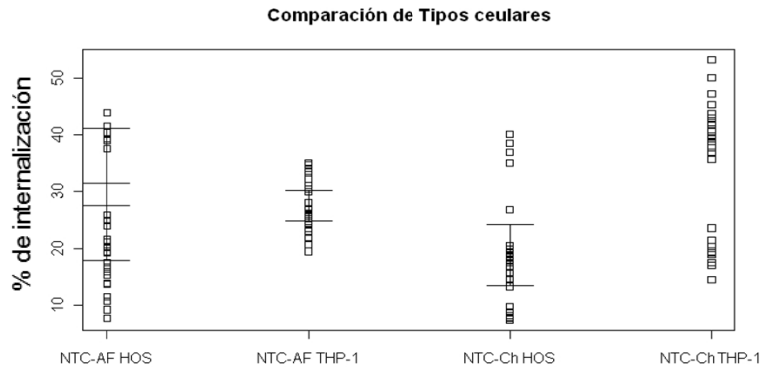
6.5.1 El porcentaje de internalización en cada tipo celular varía según el conjugado aplicado.

Según el análisis de ANOVA, en los cuatro grupos a comparar (NTC-AF HOS, NTC-Ch HOS, NTC-AF THP-1, NTC-Ch THP-1), el valor P fue de $1,21 \times 10^{-6}$ siendo inferior al nivel de significancia propuesto ($P > 0,05$) con lo cual se acepta que con respecto a la internalización hay diferencias significativas entre los distintos conjugados en las dos tipos de células.

6.5.2 Diferencias entre tipos celulares.

Dado que según el análisis de ANOVA se encontraron diferencias. Se realizó el análisis de comparación de múltiples medias-Tukey y las comparaciones se resumen en la **Figura 18**. Se obtuvieron diferencias significativas con respecto a la internalización al comparar los grupos: NTC-Ch THP1 vs NTC-AF HOS, NTC-Ch HOS vs NTC- AF THP-1 y NTC-Ch THP-1 vs NTC-Ch HOS, mostrando como dato importante que los conjugados con Ch tienen un porcentaje de internalización significativamente diferente en los dos tipos celulares probados.

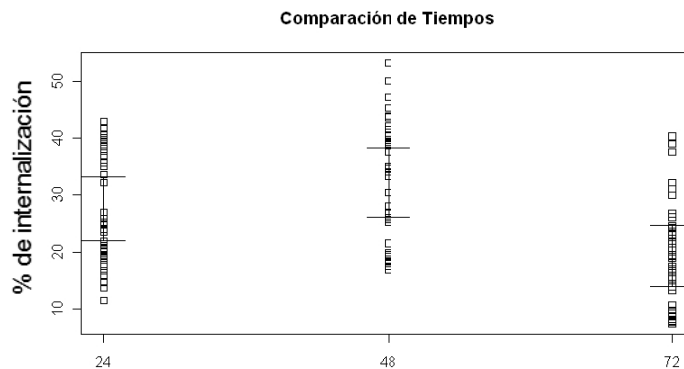
Figura 18. Comparación de tipos celulares vs solución de NTC.



6.5.3 Los tiempos de incubación influyen en el porcentaje de internalización.

Al analizar por la prueba de Tukey, los porcentajes de internalización obtenidos son significativamente diferentes comparando tanto 24 como 72 horas versus 48 horas, como se muestra en la **Figura 19** en el tiempo 48 horas independiente del tipo celular o el conjugado usado el porcentaje de internalización en este periodo de tiempo la mayoría de veces fue mayor que en los demás probados.

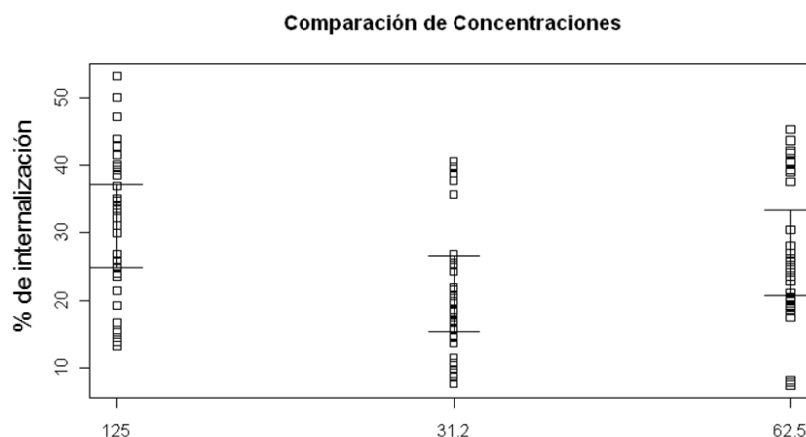
Figura. 19. Comparación de tiempos de incubación vs porcentaje de internalización.



6.5.4 La internalización de los conjugados es dependiente de su concentración.

El análisis de Tukey arrojó que existe diferencias significativas con valores p inferiores a 0.05 cuando se compara los siguientes grupos de concentraciones en todas las condiciones probadas (todos en $\mu\text{g/mL}$): 31,2 versus 125; 62,5 versus 31,2. La **figura 20** permite ver la representación gráfica de este comportamiento.

Figura. 20. Comparación de concentraciones versus porcentajes de internalización



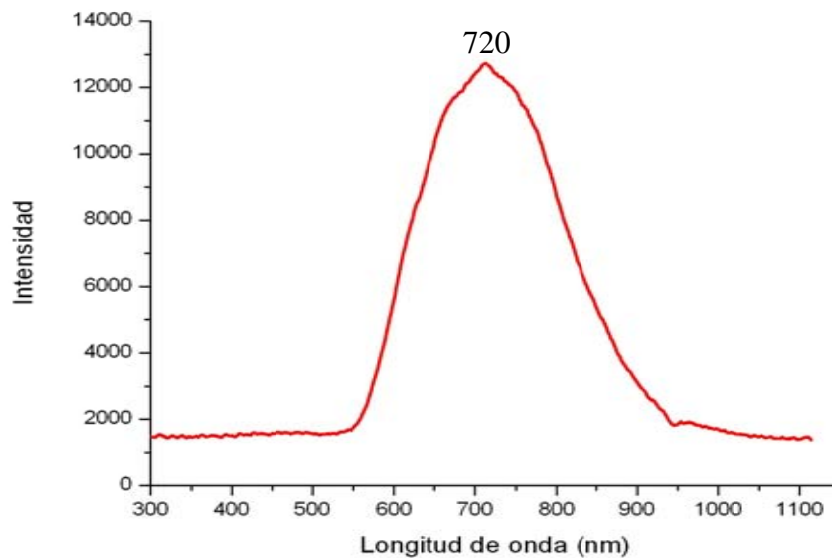
6.6 IRRADIACION

6.6.1 El espectro de Luz obtenido de la lámpara comercial abarca el rango de 550 nm a 950 nm.

Al tomar el espectro de luz producido por una lámpara comercial de IRC utilizada en este estudio se obtuvo que la mayoría de las radiaciones emitidas, estuvieron en el rango de 550 a 950 nm, encontrándose el pico máximo a 720 nm, este rango

de irradiación es transparente para sistemas biológicos. La **Figura 21** muestra el espectro de emisión.

Figura 21. Espectro de emisión de lámpara IRC.

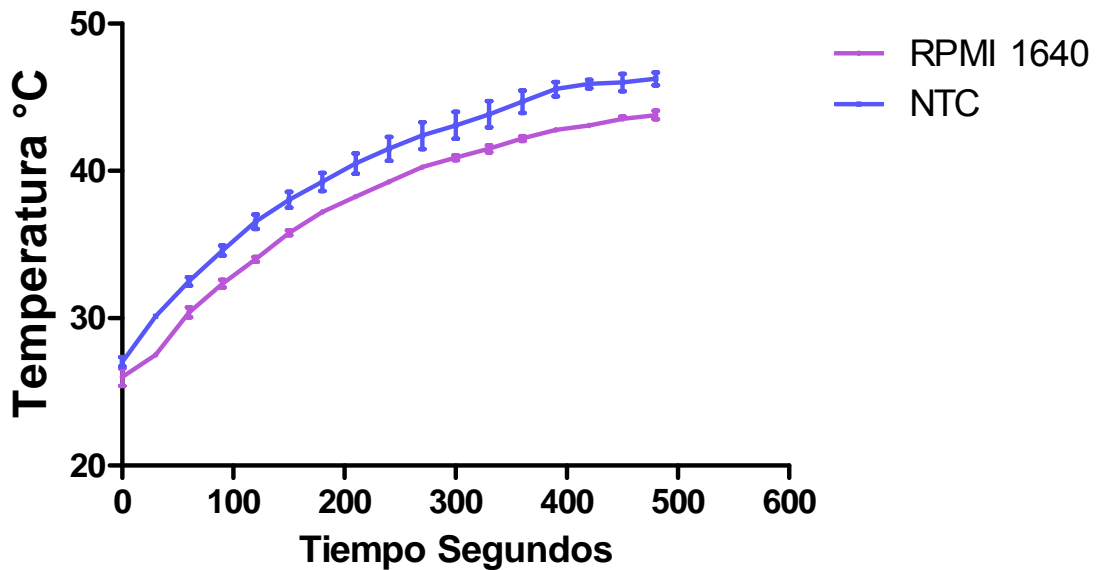


La figura muestra el espectro de emisión de la lámpara comercial de IRC, el pico máximo de emisión se encuentra a 720nm, la lámpara emite en el rango de 550-990nm.

6.6.2 La solución con NTC aumenta su temperatura cuando es irradiada con IRC.

Al evaluar la gráfica de calentamiento obtenida, cuando una solución que contiene NTC a una concentración de 2 $\mu\text{g/mL}$, es irradiada con IRC (550-900nm) a 12 cm de distancia, se observa en el tiempo, un incremento constante de la temperatura; en promedio de 3 grados al final del proceso por encima del control de medio de cultivo RPMI 1640 sin NTC.

Figura 22. Curva de calentamiento.



La figura muestra el registro de la temperatura a través del tiempo de dos soluciones: NTC en medio de cultivo RPMI-1640, y medio cultivo RPMI 1640; irradiadas con IRC, la temperatura se midió cada 30 segundos con termómetro de sonda, se observa que la solución que contiene NTC, incrementa su temperatura por encima de la solución sin NTC.

6.7 EFECTO DE LA IRC EN CELULAS Y PROMASTIGOTES

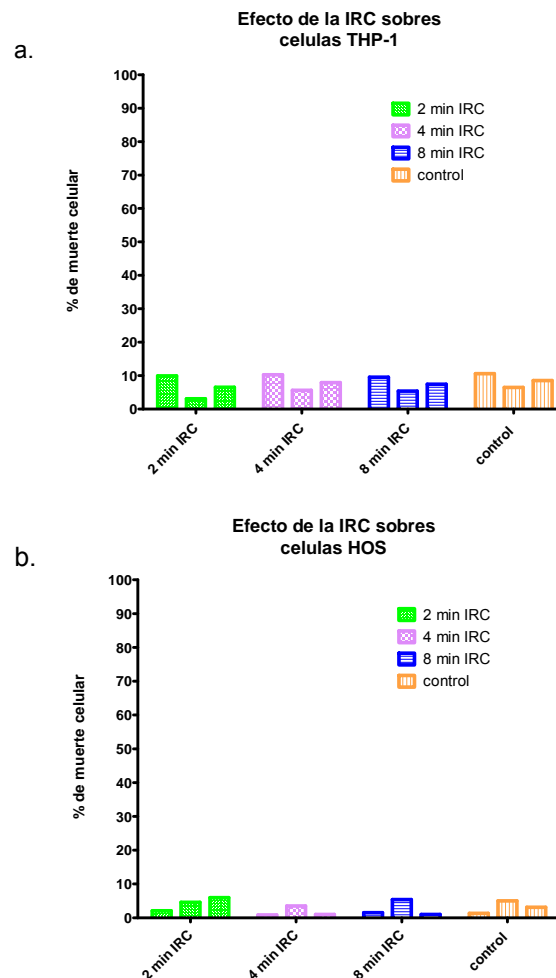
6.7.1 Las células HOS y THP-1 no fueron fotosensibles a la irradiación con IRC

Veinticuatro horas posteriores a la irradiación con IRC por 2, 4 y 8 min, no se produjo la muerte en las células HOS y THP-1 ni alteraciones en su crecimiento. Los porcentajes de muerte obtenidos nunca sobrepasaron el obtenido en el control de células sin IRC. En la **Figura 23**, se observaban los resultados encontrados entre diferentes experimentos.

6.7.2 Los promastigotes de *L. panamensis* no fueron sensibles a la irradiación con IRC

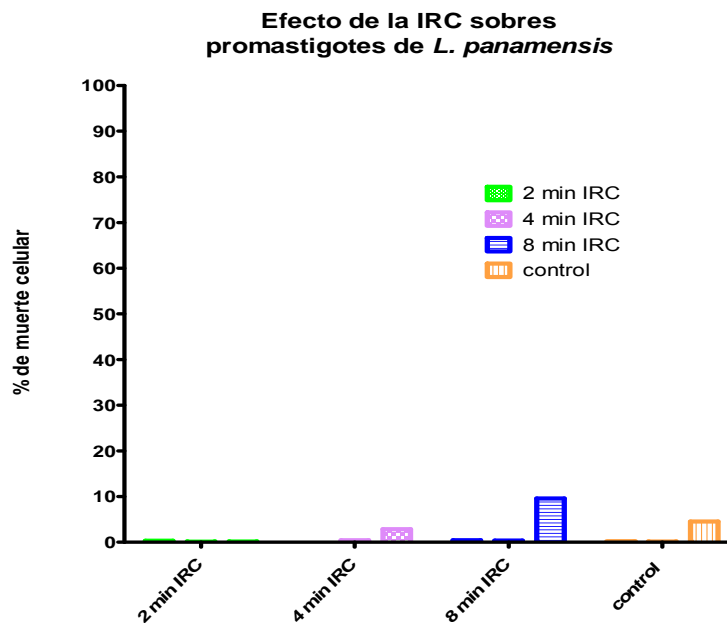
Veinticuatro horas posteriores a la irradiación con IRC por 2, 4 y 8 minutos la irradiación con IRC no produjo la muerte de los promastigotes de *L. panamensis*. Los porcentajes de muerte obtenidos no sobrepasaron el obtenido en el control de promastigotes sin IRC (**Figura 23**).

Figura 23. Efecto de la irradiación con IRC sobre células THP-1 (a) y HOS (b).



Las figuras muestran el porcentaje de muerte celular producido por el IRC en células THP-1 (a) y células HOS (b). Como se observa estos dos tipos celulares son transparentes a la IRC, con lo que no se registra muerte celular por la irradiación por los 2, 4 y 8 minutos probados.

Figura 24. Efecto del IRC sobre células promastigotes de *L. panamensis*.



Las figura muestra el porcentaje de muerte celular producido por el IRC en promastigotes de *L. panamensis*, en fase logarítmica de crecimiento. Como se observa la IRC es inofensiva para los promastigotes, no se registra muerte celular por la irradiación en los 2, 4 y 8 minutos probados.

6.8 Citotoxicidad en células de mamífero

6.8.1 Los conjugados NTC-Ch y NTC-AF no fueron tóxicos en oscuridad.

Cuando las células THP-1 y HOS fueron tratadas con concentraciones seriadas de NTC-Ch y NTC-AF y su citotoxicidad fue medida por dos métodos distintos, AlamarBlueTM y MTT. Los resultados mostraron que ni a las máximas concentraciones probadas de 300 y 335 µg/mL los compuestos fueron tóxicos. No se alcanzó en ninguno de los casos la concentración citotóxica 50 (CC₅₀) ni CC₉₀. Los datos se muestran en la **Tabla.12**

Tabla 12. Actividad de los conjugados en estudio sobre células HOS y THP-1.

COMPUESTO	CELULAS THP-1		CELULAS HOS	
	CC ₅₀	CC ₉₀	CC ₅₀	CC ₉₀
	DS	DS	DS	DS
Método AlamarBlue™				
NTC-Ch (µg/mL)	>330	>330	>330	>330
NTC-AF (µg/mL)	>330	>330	>330	>330
Miltefosine(µM)	34 ±1,77	87,17 ±9,67	131,46 ±3,84	185,04 ±6,18
Método MTT				
NTC-Ch (µg/mL)	>335	>335	>335	>335
NTC-AF (µg/mL)	>335	>335	>335	>335
Miltefosine (µM)	50,88 ±11,61	>200	184,65 ±0,89	>200

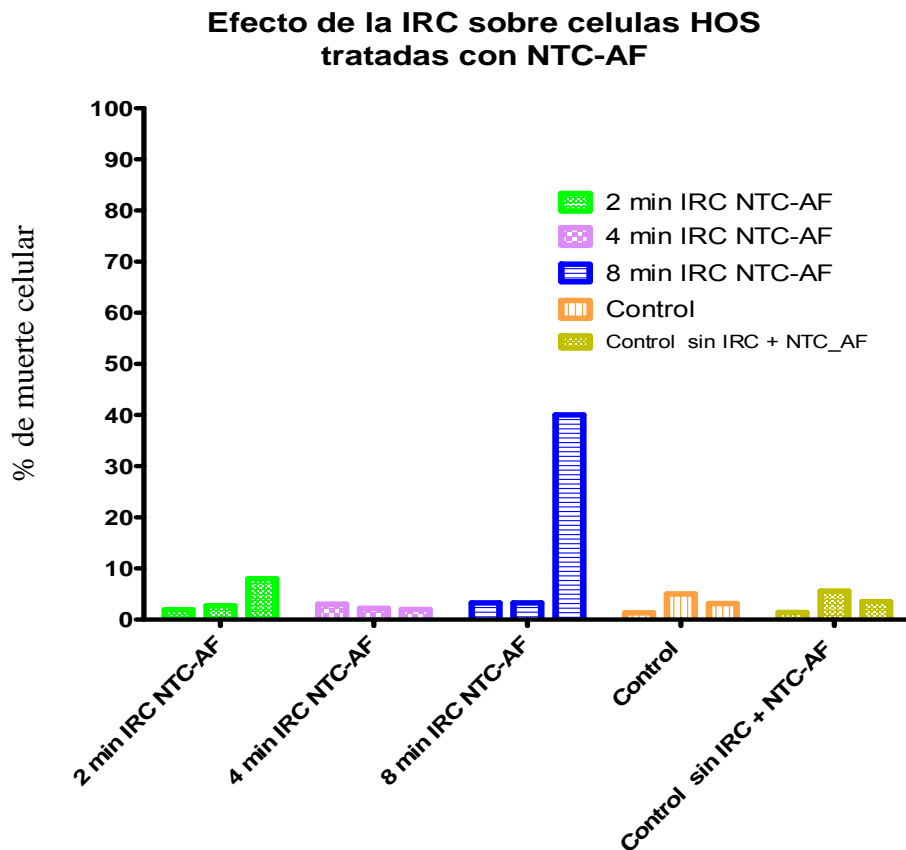
La tabla muestra la citotoxicidad de los conjugados NTC-Ch y NTC-.AF en células HOS y THP-1, en ninguna de las concentraciones probadas, se presentó muerte celular, la máxima concentración probada fue de 335 ug/mL.

6.9 TOXICIDAD DE LAS CELULAS Y PROMASTIGOTES

6.9.1 Las células HOS tratadas con NTC-AF no fueron fotosensibles al IRC.

Se realizaron tres experimentos con iguales condiciones en donde las células fueron tratadas con NTC-AF a una concentración de 125 µg/mL y se midió el porcentaje de muerte por el método de eosina amarilla. En todos los experimentos los porcentajes de muerte celular no superaron al control de células sin IRC, excepto en uno de los experimentos donde a los 8 min de IRC las células tratadas con NTC-AF tuvieron un porcentaje de muerte del 40% (**Figura 25**).

Figura 25. Efecto de la IRC sobre células HOS tratadas con NTC-AF.



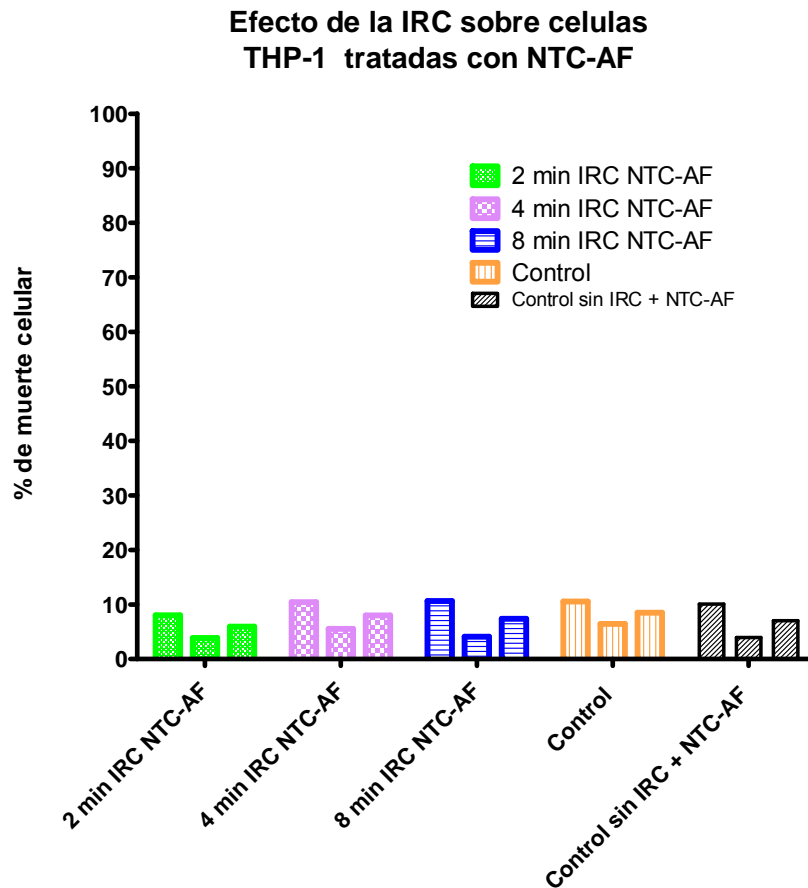
Las figura muestra el porcentaje de muerte celular producido por el IRC en células HOS tratadas con 125 µg/mL de NTC-AF. Como se observa la IRC fue inofensiva en la mayoría de los casos, solo uno de los 3 experimentos realizados con 8 min de IRC, mostro mas de un 30% de muerte celular.

6.9.2 Las células THP-1 tratadas con NTC-AF no fueron fotosensibles al IRC.

Se realizaron tres experimentos con iguales condiciones donde células tratadas con NTC-AF a una concentración de 0,125 mg/mL. Se midió el porcentaje de muerte por el método de eosina amarilla. Se mostró que en los tiempos probados

que los porcentajes de muerte celular no superaron al control de células sin IRC (Figura 26).

Figura 26. Efecto del IRC sobre células THP-1 tratadas con NTC-AF.

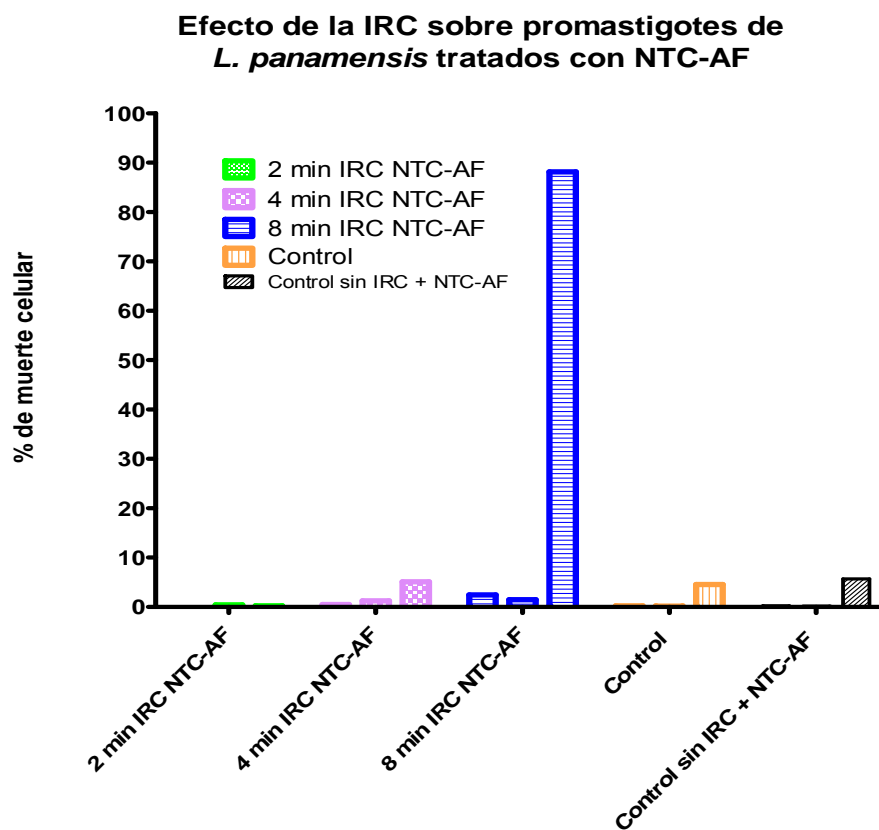


Las figura muestra el porcentaje de muerte celular producido por el IRC en células THP-1 tratadas con 125 µg/mL de NTC-AF. Como se observa la IRC fue inofensiva en todos de los casos provados.

6.9.3 Los porcentajes de muerte celular de promastigotes tratados con NTC-AF e irradiados con IRC no superaron el 10%.

Los promastigotes tratados con NTC-AF e irradiados con IRC por periodos de 0 a 8 minutos no presentaron porcentajes de muerte celular superiores al 10%, excepto en uno de los experimentos realizados donde se obtuvo un porcentaje de muerte superior al 80% en promastigotes tratados con NTC-AF con IRC por 8 minutos. Los controles sin IRC y con NTC-AF pero sin irradiación no mostraron muerte celular (**Figura 27**).

Figura 27. Efecto del IRC sobre promastigotes de *L. panamensis* tratados con NTC-AF.



Las figura muestra el porcentaje de muerte celular producido por el IRC en promastigotes de *L. panamensis* en fase logaritmica de crecimiento, tratados con 125 µg/mL de NTC-AF. Como se observa la IRC fue inofensiva en la mayoría de los casos, solo uno de los 3 experimentos realizados con 8 min de IRC, mostro mas de un 80% de muerte celular

6.10 TOXICIDAD EN AMASTIGOTES INTRACELULARES.

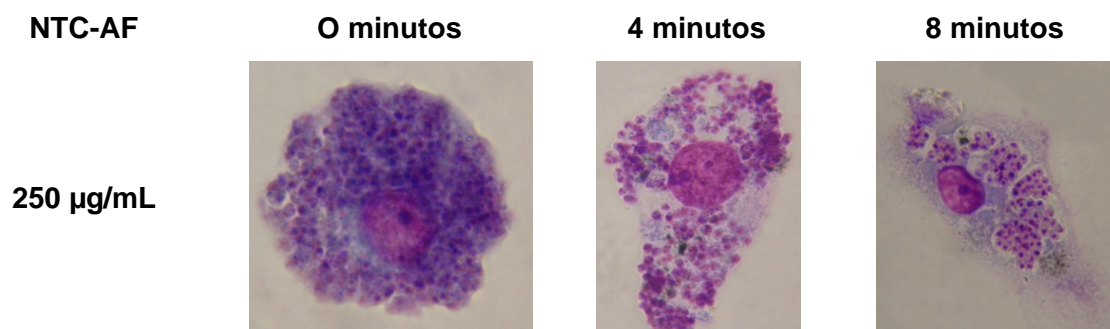
Cuando las células infectadas con *L. panamensis* fueron tratadas con diluciones seriadas de NTC-AF 16 e irradiadas con IRC por periodos de 0 a 8 minutos, no mostraron en ninguno de los casos disminución en el porcentaje de infección. En la **Tabla 13** se resumen los datos obtenidos.

Tabla 13. Efecto del IRC en células infectadas con *L. panamensis* tratadas con NTC-AF.

NTC-AF	Amastigotes Intracelulares	
	CI ₅₀	CI ₉₀
0 min	>250	>250
4 min	>250	>250
8 min	>250	>250

Los porcentajes de inhibición fueron muy bajos, el mayor obtenido en todos los duplicados fue del 1,9 % obtenido a una concentración de 250 µg/mL con 8 minutos de irradiación con IRC. El registro fotográfico muestra los amastigotes intracelulares en las células antes y después de irradiar (Figura 28)

Figura 28. Observación microscópica de amastigotes intracelulares en células antes y después de irradiar.



7 DISCUSIÓN

El diseño y desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la LC es uno de los principales objetivos en la investigación de esta enfermedad. Dentro de las nuevas opciones terapéuticas que se desarrollan se encuentra el uso de la nanotecnología. En el presente trabajo se dio inicio a la evaluación de una nueva alternativa en esta área, el uso de NTC acoplados a AF activados con IRC. Dado lo novedoso del tema, fue necesario ir analizando cada una de las variables para determinar las características biológicas y la actividad anti-*Leishmania* de este sistema.

El primer factor importante en éste y en todo nano-sistema es estudiar la solubilidad del compuesto. En este trabajo se obtuvieron dos soluciones de NTC solubles en medios acuosos y estables en periodos de tiempo de hasta 72 horas por medio de uniones no covalentes a Ch y AF.

Al unir el Ch al NTC, se logra combinar las propiedades de ambos, preservando las propiedades originales de los NTC, sin inducir defectos en la estructura y cambios en las propiedades mecánicas y electrónicas del NTC; ni dejar residuos que pueden ser citotóxicos. Otros métodos utilizados en la funcionalización de los NTC utilizan las oxidaciones con ácidos concentrados, entre estos el más reportado en la literatura, el ácido nítrico, que introduce grupos carboxilos que contribuyen a la solubilidad de los NTC.

Algunos de estos métodos pueden inducir defectos en los compuestos, como los reportados por Rosca y colaboradores, quienes introdujeron grupos carboxilos por oxidación fuerte con ácido nítrico en NTCM. En las primeras 6-9 h del tratamiento de oxidación no se observaron cambios en la morfología de los NTC, sin embargo, cuando se llegó a 24 h de oxidación se destruyeron los NTC de menor tamaño, y a

las 48 h se observaron NTC amorfos. La solubilidad solo fue satisfactoria después de la oxidación por 24-48 h con 60% de ácido nítrico (Rosca et al. 2005).

En otro trabajo se encontró que al funcionalizar con el biopolímero Ch no covalentemente se mantiene la estructura original del NTC, además la capacidad emulsificante del Ch le confiere solubilidad y una alta biocompatibilidad (Liu et al. 2005). La solución NTC-Ch obtenida en este estudio resultó de funcionalizar no covalentemente los NTC al Ch, a través de procesos de sonicación y centrifugación.

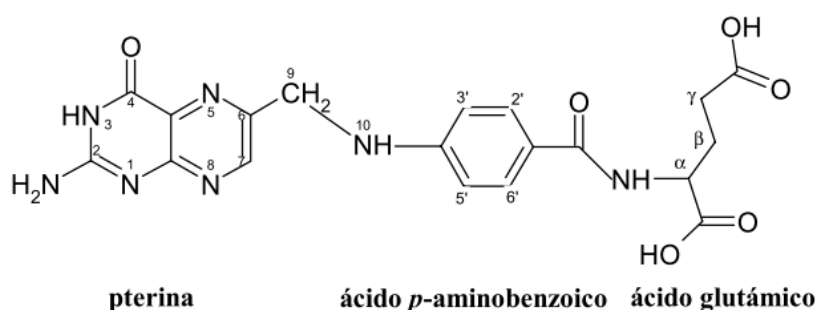
Una posible explicación del porqué se solubilizan los NTC con este método, se plantea en los trabajos de simulación de dinámica molecular, esta herramienta permite suministrar información teórica detallada a nivel molecular y se ha aplicado a el entendimiento de la solubilidad y la dispersión de NTC cuando son funcionalizados con Ch. Se propone que la agregación de NTC en soluciones acuosas se debe a la interacciones de Van de Waals entre los anillos aromáticos de los nanotubos o estos con el Ch, solo cuando las concentraciones de Ch son lo suficientemente altas para recubrir todos los NTC de la solución, estas interacciones se rompen, permitiendo la dispersión y solubilidad de los nanotubos (Rungrotmongkol et al. 2011).

La unión Ch-AF-NTC ha sido reportada por varios autores, por ejemplo Huang y colaboradores logran esta funcionalización a través de enlaces covalentes entre el Ch y el AF, utilizando el grupo amino y los dos grupos hidroxilos del Ch, los cuales interactúan con las cargas negativas de las biomoléculas y con la estructura de los NTC. El grupo carboxilo del AF sirve de unión al biopolímero pero es difícil de conjugar debido a la baja reactividad de este grupo, para lograrlo se necesita una activación del grupo carboxilo (Huang et al. 2011).

Otro de los métodos utilizados, es la unión no covalente de Ch a NTC, para posteriormente agregar AF disuelto en DMSO y EDC como agente de acoplamiento además de Sulfo-NHS. En este método es necesario retirar los residuos a través de una diálisis controlada (Kang et al., 2008). En nuestro trabajo no fue posible la doble funcionalización del NTC con AF y Ch, optando por la utilización de una solución de NTC funcionalizada solamente con el AF.

Con respecto a esta solución de NTC-AF, el AF es un compuesto que contiene un doble anillo pterínico con un sustituyente en la posición 6, donde se reconocen dos porciones: una la molécula de ácido *p*-aminobenzoico y la otra es una molécula de ácido glutámico, unidas entre sí por un enlace peptídico, por su parte el ácido *p*-aminobenzoico está ligado al doble anillo pterínico mediante un puente metilénico unido a su grupo amino (**Figura 29**)(Liang y Subirade 2010).

Figura 29. Estructura química del ácido fólico



La figura muestra la estructura química del AF, compuesto por un anillo doble pterínico, el ácido *p*-aminobenzoico, estas dos moléculas forman lo que se conoce como ácido ptericoico, por ultimo se encuentre el ácido glutámico.

La solubilidad del AF depende del pH del medio y de la temperatura. Básicamente la solubilidad se aumenta a temperaturas por encima de los 30°C y a pH fuertemente ácidos (pH 0-1.3) o medianamente alcalinos (pH 5-8) (Wu et al. 2010).

En nuestro estudio la funcionalización del NTC al AF, se obtuvo por ultrasonificación por sonda y centrifugación.

Muy posiblemente se formaron enlaces no covalentes entre los anillos pterinico del AF y los anillos que constituyen el NTC, o gracias a interacción de enlaces π de estos mismos anillos, el ácido fólico le confiere la solubilidad al conjugado NTC-AF como se muestra en la **Figura 10b**, y la ultrasonificación por sonda permitió obtener soluciones con concentraciones más elevadas de nanotubos en comparación a la solución de NTC-Ch.

El método de funcionalización, dispersión o solubilización afecta los resultados de citotoxicidad de los NTC. Estudios realizados en células HUVECs donde MNTC fueron dispersos directamente en agua por métodos de sonicación, mostraron una alta citotoxicidad dependiente de la concentración (Guo et al. 2011).

La alta hidrofobicidad de los NTC hace que se formen grandes agregados que aumentan la toxicidad, Wick y colaboradores demostraron que los aglomerados de NTC fueron más citotóxicos que estos mismos bien dispersos en las mismas concentraciones (Wick et al. 2006). Por este motivo uno de las mejores formas de mejorar la solubilidad y hacer compatibles los NTC en sistemas biológicos es la funcionalización por métodos covalente o no covalentes, a través de compuestos químicos que pueden generar residuos que pueden ser citotóxicos (Bianco et al. 2008).

Estudios donde se funcionalizaron NTC a Ch y AF este último disuelto en DMSO, no mostraron efectos de citotoxicidad a concentraciones de 2-50 $\mu\text{g/mL}$. Concentraciones más altas por encima de los 100 $\mu\text{g/mL}$ mostraron citotoxicidades de más del 70% (Kang et al. 2008). En contraste con lo obtenido en nuestro trabajo, donde concentraciones altas (330 $\mu\text{g/mL}$) no fueron citotóxicas, en ninguno de los dos conjugados. Sin embargo, cuando el AF fue disuelto en

carbonato de calcio mostró una fuerte citotoxicidad como se evidencia en la **figura 12**. Aunque no se evaluaron las posibles causas de citotoxicidad en el estudio de Kang y colaboradores, podría considerarse los residuos de DMSO como una posibilidad.

En este trabajo se eligieron aquellos métodos de funcionalización que involucraran uniones no covalentes. Como se mencionó anteriormente las uniones covalentes involucran métodos más drásticos, que pueden generar residuos asociados a citotoxicidad, además de producir cambios en la estructura original del NTC y afectar sus características electrofísicas, que pueden alterar su capacidad para activarse por IRC, además son más difíciles de caracterizar y de determinar la ubicación precisa y el número de los grupos funcionales formados o unidos (Hirsch y Vostrowsky 2005)

Se propone que el mecanismo de internalización del complejo NTC-AF utiliza una vía endocítica mediada por receptor a través de PFF. Estas proteínas son glicopeptidos con afinidad por el AF. En humanos son codificadas por un conjunto de genes de productos homólogos del tipo α , β y γ (Enakat y Rarman 2004).

En este trabajo la expresión del receptor de AF fue baja en células THP-1. La fluorescencia verde se registró en las células expuestas a los dos anticuerpos. En contraste, cuando se probaron iguales condiciones en células infectadas con *L. panamensis*, se evidenció una mayor cantidad de fluorescencia verde en comparación a células sin infectar.

Un método confiable para aumentar la expresión de PFF y probar el método que se utilizó para cualificar su expresión, es la limitación de AF en los cultivos de células THP-1, las células que fueron tratadas de esta forma mostraron la más alta expresión obtenida de PFF, ratificando que el método utilizado puede diferenciar cualitativamente las expresiones de las proteínas en cuestión.

En *Leishmania* se conoce el transporte, metabolismo, el sistema enzimático de reducción y la necesidad vital de adquirir folatos de forma exógena ya que no pueden sintetizarlos (Ouellete et al. 2002, Opperdoes y Coombs 2007). Sin embargo, no se ha reportado una modulación por parte del parásito sobre la expresión de PFF en las células hospedero.

La *Leishmania* es capaz de modular la respuesta de macrófagos, por ejemplo, induce la supresión de la activación de los macrófagos debido a hiperpolarización de la membrana, específicamente altera los canales de potasio suprimiendo la producción de óxido nítrico (Camacho et al. 2008). Por otra parte el parásito también puede suprimir la producción de citoquinas, disminuir la expresión de MHC clase II, alterar la homeostasis de calcio, disminuir la generación de inositol trifosfatado, incrementar el metabolismo del ácido araquidónico o alterar la fosforilación de la tirosina (Martiny et al. 1999).

Aunque la *Leishmania* no sintetiza folato, para superar esta deficiencia cuenta con mecanismos de transporte y sistema de degradación de pterinas conjugadas y no conjugadas como el AF y biopterinas respectivamente, posee dos distintos transportadores de membrana: los transportadores de folato (FT1) y los transportadores de biopterinas (BT1).

La reducción de folatos a las formas utilizables en células de mamífero, se generan a través de la enzima dihidrofolato reductasa (DHFR) dependiente de NADPH. En *Leishmania* la DHFR está presente como una enzima bifuncional unida a la timidilato sintentasa (DHFR-TS) (Cunningham et al. 2001).

La proteína FT1 es el mayor transportador de folato de *Leishmania*, según estudios en donde se dedujo su posible topología este transportador contiene 14 proteínas transmembranales con extremos N-terminal y C-terminal dentro de la

célula (Dridi et al.,2009). Estudios realizados por Ouameur y colaboradores reportaron que la máxima expresión de proteína FT1 en promastigotes se presenta en la fase logarítmica de crecimiento (Ouameur et al. 2008).

El transportador BT1 es una proteína que contiene 12 dominios localizados en la membrana plasmática y es el principal transportador de pterinas no conjugadas (Ouellette et al. 2002) aunque también tiene una capacidad reducida de transportar AF. Se encuentra de forma uniforme en la membrana plasmática al igual que se ha observado en un compartimiento intracelular en la base del flagelo que probablemente corresponde al bolsillo flagelar (Kûndig et al.1999).

El anterior dato es concordante con los resultados obtenidos en este trabajo, donde se puede observar la fluorescencia verde en todo el cuerpo del promastigote e igualmente a lo encontrado por Kundig y colaboradores una acumulación de fluorescencia verde en la base del flagelo, como se observa en la tabla 3, esta área del bolsillo flagelar es una invaginación en la base del flagelo, donde ocurre la mayoría de la endocitosis mediada por receptor y la secreción de proteínas al espacio extracelular. (Landfear y Ignatushchenko., 2001). También se conoce la existencia de otro miembro de esta familia de transportadores los FT5 que presentan una alta afinidad por el folato pero una baja capacidad para transportarlo (Anass y Ouellette.,2009, Richard et al. 2002).

La citotoxicidad de los NTC es un tema de gran conflicto en el ámbito científico, debido a que los resultados de citotoxicidad parece depender de múltiples factores, como el método de fabricación, la solubilidad, el método de funcionalización, el tipo de NTC, su tamaño, y hasta la prueba utilizada para medir la citotoxicidad.

Estudios realizados con NTCS, en células A549, muestran efectos totalmente contrarios de una misma solución, dependiendo de la prueba utilizada para

determinar la citotoxicidad, cuando esta fue medida por WST-1 (sal de tetrazolium que produce cristales de formazan altamente solubles en agua) no se registro citotoxicidad, mientras que utilizando la prueba MTT (Sal de tetrazolium que produce cristales de formazan altamente insolubles en agua) indico una alta citotoxicidad; los autores explican estos resultados como una interferencia de los NTC, los cuales se unen a los cristales de formazan, que se forman en la prueba del MTT impidiendo que estos se disuelvan en 2-propanol/HCL y permitan medir los cambios de color indicativos de la prueba. (Worle-Knisch et al.,2006):

Sin embargo, en nuestro estudio se midió la citotoxicidad por dos métodos entres estos el MTT, difiriendo con el estudio citado en el compuesto utilizado para solubilizar los cristales de formazan, utilizando DMSO, no encontramos citotoxicidad a concentraciones tan altas como 330 µg/mL de NTC-Ch y NTC-AF, muy probablemente la interferencia en esta prueba también dependa del tipo de NTC utilizado y de cómo fue obtenida la solución de trabajo, en el estudio de Worle y colaboradores se realizo por precipitación en acetona y resuspensión en agua destilada lo que posibilita la formación de aglomerados de NTC, precisamente los autores reportan fotográficamente como estos aglomerados se unen a los cristales de formazan impidiendo su solubilizacion. (Worle-Knisch et al.,2006),

Igualmente se ha reportado la interferencia de otras pruebas como Comassie Blue, AlamarBlue, Rojo neutro, y las mismas MTT y WST-1 en los resultados de citotoxicidad obtenidos en NTC sobre células A549 (Casey et al., 2007), sin embargo, los estudios de Lobo y colaboradores en 2009, demostraron que estas interferencias se pueden evitar al retirar inmediatamente antes de realizar la prueba los NTC. (Lobo et al., 2009).

En este trabajo se tuvieron en cuenta todos los parámetros que pudieran resultar en falsos positivos de citotoxicidad, producto de interferencias en las pruebas o

efectos no propios del NTC sobre las células, obteniendo dos soluciones con pocos residuos químicos, y funcionalizados por métodos no agresivos, evitando interferencias al realizar las pruebas de citotoxicidad retirando los NTC libres en el medio de cultivo antes de las pruebas, bajo estos parámetros las dos soluciones, NTC-Ch y NTC-AF no mostraron ninguna inferencia con las pruebas de citotoxicidad utilizadas y no presentaron citotoxicidad ni en HOS o THP-1, en ninguna de las concentraciones probadas (**Tabla 12**).

La internalización de NTC en células humanas fue medida con el método de Giemsa, con las dos soluciones NTC-Ch y NT-AF, la coloración de Giemsa permite definir fácilmente el núcleo del citoplasma celular, ya que los nanotubos de carbono forman aglomerados que no se tiñen con este colorante y se evidencian por tener un color negro, fueron fácilmente distinguibles en las células.

En la literatura se ha reportado el uso de colorantes para identificar nanopartículas en células, Mahmood y colaboradores utilizaron el verde de metilo (colorante que tiñe de verde intenso el núcleo celular y verde claro el citoplasma) para identificar nanopartículas, entre estas, NTCS en células HeLa y células osteocitos MLO-Y4. (Mahmood et al., 2009); de similar manera se ha reportado el uso de hematoxilina eosina para observar los aglomerados de NTC en células Caco-2, estos autores también reportan mediante este método la formación de vacuolas en las células tratadas con nanotubos. (Jos et al., 2009).

Sin embargo, los métodos más utilizados para identificar la colocación o cuantificar la internalización de NTC, es la funcionalización de los nanotubos con sustancias fluorescentes, de esta forma se puede observar su presencia en la célula a través de microscopios de fluorescencia o determinar su localización exacta a través de microscopía confocal, al igual que cuantificar la concentración intracelular por citometría de flujo, también se ha reportado el uso de microscopios electrónico de barrido o de transmisión (SEM y TEM respectivamente) (Kostarelos

et al., 2007, Shi et al., 2006, Sato et al., 2005, Kang et al., 2008, Shi et al., 2005, Belyanskaya et al., 2009, Chen et al., 2009)

Como se muestra en la Tabla 7, la cantidad de NTC visible por el método de giemsa depende del tiempo de incubación con las soluciones con NTC y de su concentración, la internalización de NTC-Ch en células HOS mostro (Tabla 8), la formación de estructuras que podrían ser vacuolas en el citoplasma, estas aumentan en tamaño y numero a través del tiempo, la formación de vacuolas en la internalización de nanocompuestos ha sido demostrada en los trabajos de Raffa y colaboradores, quienes reportan un aumento en la cantidad de lisosomas, cuando células de hipocampo de raton HN9.10e fueron incubadas con NTCM (Raffa et al., 2008).

En este trabajo también se demostró que la concentración utilizada influye en el número de células positivas para NTC, a mayores concentraciones mayor porcentaje de internalización, similares resultados se presentaron cuando las mismas células fueron expuestas a la solución de NTC-AF en iguales condiciones, solo que el porcentaje de internalización fue menor en comparación a la solución de NTC-AF, como lo demuestra el análisis estadístico por la prueba T Student, con la cual se determino que existe una diferencia significativa en el porcentaje de internalización entre las dos soluciones probadas en el mismo tipo de célula.

Cuando se probaron estas dos soluciones en células THP-1, lo que se obtuvo fue que con la solución NTC-Ch se formaron grandes aglomerados que cubrieron la mayoría del citoplasma, respetando el núcleo.

La cantidad de NTC que se registro fue dependiente del tiempo y de la concentración, mientras cuando las células THP-1 fueron incubadas con NTC-AF se evidencio acúmulos de NTC repartidos en el citoplasma, con formación en

ocasiones de múltiples posibles vacuolas, y una ubicación perinuclear, al igual que en los anteriores casos la internalización dependió de la concentración de NTC y del tiempo de incubación y existe una diferencia significativa en el porcentaje de internalización de ambas soluciones.

Las agrupaciones de NTC más grandes, presentadas en las soluciones que contienen Ch pueden deberse a que como se ha reportado, el Ch forma protuberancias en la superficie de los NTC provocando la formación de paquetes unidos por Ch (Liu et al., 2005), permitiendo la formación de aglomerados más grandes, mientras que en la solución de NTC-AF, se espera que la endocitosis sea mediada por receptor, a través de PFF presentes en la membrana de las células hospedero y como se demostró expresadas mas altamente en células infectadas con *L. panamensis*.

En la literatura son varias las vías implicadas en la endocitosis de nanopartículas, como se resumen en la Tabla 14. Esto depende del tamaño, la carga y las propiedades de superficie (Iversen et al 2011), sin embargo, determinar la vía endocítica y la ubicación intracelular exacta de los nanomateriales requiere de métodos más específicos, como es marcar fluorescentemente la nanopartícula estudiada y los orgánulos blanco, para evaluar su colocalización por microscopia confocal y así determinar si las vesículas que se forman son verdaderas o si son invaginaciones conectadas a la superficie celular.

En las observaciones realizadas por microscopia de las células HOS y THP-1, tratadas con diferentes concentraciones de NTC-Ch y NTC-AF, no se evidenciaron alteraciones significativas en la morfología celular, en comparación a los controles, similar a lo reportado en la literatura donde se registran muy pequeñas alteraciones en la morfología, que fueron dependientes de la concentración de NTC. (Jos et al.,2009, Shi et al 2005)

Tabla 14. Endocitosis de nanopartículas

Nanopartículas	Vía de endocitosis	Uso	Observaciones
Poly (glicol etileno)-polilactida	CME en células MDCK independiente de carga	Liberación de drogas	Nanopartículas cargadas positivamente se internalizan más que las cargadas negativamente
Carga Negativa (anionica)	CME y mediada por caveola en HeLa		La carga determina su ruta intracelular, en células MDCK las partículas positivas se enrutan por trancitosis y las negativas hacia lisosomas.
Carga Positiva (cationica)	CME, macropinocitosis		
Poli(lactic-co-acido glicolico) (PLGA)	CME en células VSMCs(musculo)	Fármaco biodegradable	El 85% de las partículas son recicladas a la superficie celular en endosomas tempranos el resto escapan y van al citosol.
	En células epiteliales de cornea vías independientes de clatrina y caveola	Tamaño: 300 nm	
Nanotubos de silica	CME	50 nm de diámetro y 200 nm de longitud	Funcionalizados con grupos aminosilanos cargados positivamente fueron internalizados por CME .
Nanopartículas de Chitosan cationico	CME en A549 (epitelio respiratorio) y Caco-2 (intestinal)	Tamaño: 430 nm	Esta selectividad de CME sugiere que en esta partícula la composición química fue más importante que el tamaño para definir el mecanismo de entrada.
Chitosan hidrofobicament e modificado	CME, caveola y macropinocitosis	360 nm, potencial zeta +22 mV	Posible interacción con la membrana celular a través del residuos del acido 5-B-colanico usado para la hidrofobizacion del chitosan. Lo cual altera su tráfico.

CME: dependiente de clatrina,

La termoterapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, es una práctica que se ha realizado con éxito, debido a la sensibilidad del parásito por las altas temperaturas, se ha reportado que aplicar en lesiones causadas por *L. tropica* termoterapia obtenida por radiofrecuencia muestra tener tasas de curación comparables con los tratamientos estándares.(Reithinger et al., 2005).

En este trabajo intentamos obtener aumentos de la temperatura intracelular de células infectadas con *L. panamensis*, a través de la activación de NTC-AF previamente internalizados, con IRC proveniente de una lámpara incandescente de infrarrojo, que emite longitudes de onda en el rango de 550 a 950 nm, un método que resultaría económico para lograr la activación de los NTC, las radiaciones que activan los NTC se encuentran en la longitud de onda de 808 nm, esperábamos que irradiar con esta lámpara pudiera, a través de periodos de tiempo más elevados, lograr la activación del NTC, resultando en un aumento de la temperatura que consiguiera producir la muerte al parásito.

Sin embargo, aunque registramos un aumento de temperatura en la solución de NTC-AF, como se muestra en la curva de calentamiento (Figura 22), esta no fue suficiente para producir la muerte del parásito en la mayoría de condiciones y experimentos probados, podemos explicar estos resultados ya que nuestra fuente de irradiación no permitía obtener fotones que pertenecieran solo a la longitud de onda de 808 nm, además, la potencia influye en los resultados obtenidos, como se evidencia en la **Tabla 15**.

En este estudio se usó una potencia de 50 mW y como se puede deducir de los datos mostrados en la Tabla 15, solo cuando la potencia es de 2 W o superior se consiguen resultados de fototoxicidad, en periodos cortos de tiempo.

Tabla 15. Fototoxicidad del IRC en células tratadas con soluciones de NTC.

TIPO NTC	FUNCIONALIZACION	TIEMPO DE INCUBACIÓN CON EL NTC	IRRADIACION	TIEMPO DE IRRADIACION	RESULTADO	REFERENCIA
NTCS 100-400 nm	*ácido polisulfónico – aminobenceno *polietilenglicol	1 día 3 días	Laser potencia de salida <900 mW, potencia promedio de 820,87 Mw óptica ajustable y longitud de onda de 808 ± 5 nm intensidad aplicada de 6.314 mW/cm ²	3 min	La irradiación no incrementa la toxicidad de manera significativa	González et al. 2008
NTCS	Varios fosfolipidos Polietilenglicol-Acido fólico *Cy3-DNA	HeLa 12 horas.	Lasr 808 nm Capacidad máxima: 3.5 W/cm ² Irradiación a: 1.4 W/cm ²	2 min	Células transparentes al IRC 5 min a 3.5 W/cm ² a 808 nm. Muerte celular después de 2 minutos IRC	Shi Kam et al. 2005
NTCS	Chitosan	6 horas	laser 808 nm Irradiación: 2 W/cm ²	5 min	90 % de Vitalidad Inhibicion de migración celular in vivo	Wang et al. 2011
NTCS	SDS DNA	U251	808 2 W/cm ²	30 s-5 min	Muerte celular notoria a los 5 min (10 µg/ml NTC)	Markovic et al. 2011

El IRC aplicada fue completamente transparente en las células y parásitos no tratadas con NTC, es decir, no se registro fototoxicidad, sin embargo, los resultados obtenidos en los experimentos tratados con NTC-AF fueron divergentes.

Aunque en dos de los tres experimentos realizados, no se obtuvo muerte celular o muerte del parásito, uno de los experimentos mostró una alta fototoxicidad en promastigotes y en células tratadas con NTC-AF, esto puede tener dos posibles explicaciones, la primera que las soluciones aplicadas variaron de un experimento al otro, o con mayor posibilidad, las diferencias se pueden deber a las características de la fuente de irradiación empleada, debido a que se uso una lámpara comercial de IRC.

La lámparas comerciales de infrarrojos funciona con un filamento de tungsteno (compuesto formado por wolframio y carbono, que produce una luz muy intensa cuando es atravesado por una corriente eléctrica). Debido a este filamento, mas otras caractristicas de la estructura de la lámpara, su funcionamiento puede variar tanto en la potencia como el rango de energía emitida, además de poseer una vida útil limitada.

En futuros experimentos es recomendable probar fuentes de irradiación como los laser que permiten definir una sola longitud de onda y pueden llegar a potencias tan altas como los 2 W, aunque se debe evaluar el costo beneficio de emplear estas herramientas.

8 CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación son los primeros pasos para el uso de NTC en enfermedades intracelulares como la Leishmaniasis, se hacen aportes al conocimiento del comportamiento de soluciones de conjugados de NTC en el modelo *Leishmania*, se estandariza metodologías para la evaluación de nanocompuestos, se evalúa el efecto del IRC (rango entre 550-950 nm y potencia de 45 mW) en este modelo, se determina la expresión de PFF en células infectadas y se plantea esta vía como un candidato para el tratamiento direccionado de medicamentos o vectores para el tratamiento de la LC, , abriendo nuevas líneas de investigación en leishmaniasis y aportando a la formación científica.

Se puede lograr conjugados de NTC funcionalizados por métodos no covalentes que logran ser estables en el tiempo y no dejan residuos tóxicos para los modelos biológicos.

La células infectadas con *L. panamensis* expresan una mayor cantidad de PFF que células sin infectar, mostrando una posible modulación del parásito sobre su célula hospedero y dejando esta vía como candidata para el tratamiento direccionado contra la leishmaniasis

La internalización de conjugados de NTC aumenta dependiendo de la concentración y del tiempo, a mayores concentraciones y tiempos de incubación de hasta 48 horas son mayores el número de células positivas para NTC, mostrándose como agrupaciones únicas en el citoplasma celular.

La lámpara comercial de IRC no es la mejor herramienta para lograr la activación y el posterior efecto de los NTC, dado los inconvenientes del modelo y la poca reproducibilidad que puede proporcionar por sus componentes eléctricos.

Los conjugados de NTC obtenidos en este trabajo no mostraron citotoxicidades a concentraciones tan altas como 330 $\mu\text{g/mL}$ de NTC, según la observación microscópica tampoco se observa cambios agresivos de la morfología celular.

El uso de NTC como herramienta para el tratamiento de la leishmaniasis es viable investigándolos como nanovectores o probando nuevas técnicas de activación.

9 RECOMENDACIONES

Es necesario para definir el camino de internalización, la colocalización, y la concentración intracelular de los NTC, marcarlos fluorescentemente y evaluarlos por microscopia confocal y citometría de flujo.

Aumentar las investigaciones en la evaluación de la modulación del parásito sobre la célula hospedero, para definir nuevas vías y herramientas terapéuticas.

Cuantificar la expresión de PFF, definir el subtipo expresado y las rutas empleadas por los nanocompuestos anclados a AF.

Evaluar el efecto del IRC en el modelo *Leishmania* tratado con NTC-AF cuando esta irradiación es aplicada con métodos más específicos como el laser de 808 nm con potencias superiores a 1W.

10 BIBLIOGRAFIA

1. Akasaka T, Matsuoka M, Hashimoto T, Abe S, Uo M, Watari F. The bactericidal effect of carbon nanotube/agar composites irradiated with near-infrared light on *Streptococcus mutans*. *Mater. Sci. Eng. B.* 2010; doi:10.1016/j.mseb.2010.01.001
2. Akilov, O. E., S. Kosaka, et al. (2006). "The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against *Leishmania* parasites." *Chem Biol* 13(8): 839-847.
3. Alrajhi, A. A., E. A. Ibrahim, et al. (2002). "Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*." *N Engl J Med* 346(12): 891-895.
4. Arevalo, I., B. Ward, et al. (2001). "Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator." *Clin Infect Dis* 33(11): 1847-1851.
5. Arias, J. R., P. S. Monteiro, et al. (1996). "The reemergence of visceral leishmaniasis in Brazil." *Emerg Infect Dis* 2(2): 145-146.
6. Asilian, A. and M. Davami (2006). "Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial." *Clin Exp Dermatol* 31(5): 634-637.
7. Bailey, M. S. and D. N. Lockwood (2007). "Cutaneous leishmaniasis." *Clin Dermatol* 25(2): 203-211.
8. Bates, P. A. (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies." *Int J Parasitol* 37(10): 1097-1106.
9. Bates, P. A. and M. E. Rogers (2004). "New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*." *Curr Mol Med* 4(6): 601-609.

10. Berman, J. (2005). "Miltefosine to treat leishmaniasis." *Expert Opin Pharmacother* 6(8): 1381-1388.
11. Bianco, A., K. Kostarelos, et al. (2008). "Opportunities and challenges of carbon-based nanomaterials for cancer therapy." *Expert Opin Drug Deliv* 5(3): 331-342.
12. Blum, J. A. and C. F. Hatz (2009). "Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers 2009." *J Travel Med* 16(2): 123-131.
13. Blum, J., P. Desjeux, et al. (2004). "Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers." *J Antimicrob Chemother* 53(2): 158-166.
14. Borm, P. J. and D. Muller-Schulte (2006). "Nanoparticles in drug delivery and environmental exposure: same size, same risks?" *Nanomedicine (Lond)* 1(2): 235-249.
15. Burchmore, R. J. and M. P. Barrett (2001). "Life in vacuoles--nutrient acquisition by *Leishmania amastigotes*." *Int J Parasitol* 31(12): 1311-1320.
16. Burlaka, A., S. Lukin, et al. (2010). "Hyperthermic effect of multi-walled carbon nanotubes stimulated with near infrared irradiation for anticancer therapy: in vitro studies." *Exp Oncol* 32(1): 48-50.
17. Cai SY, Kong JL. Advance in research on carbon nanotubes as diagnostic and therapeutic agents for tumor. *Chin. J. Anal. Chem.* 2009; 37(8): 1240-46.
18. Cai, X., H. Tong, et al. (2009). "Preparation and characterization of homogeneous chitosan-poly(lactic acid)/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering and evaluation of its mechanical properties." *Acta Biomater* 5(7): 2693-2703.
19. Camacho, M., M. E. Forero, et al. (2008). "Leishmania amazonensis infection may affect the ability of the host macrophage to be activated by altering their outward potassium currents." *Exp Parasitol* 120(1): 50-56.
20. Casey a, Davoren M, Herzog E, Lyng FM, Byrne HJ, Chambers. Probing the interaction of single walled carbon nanotubes within cell culture medium as a precursor to toxicity testing. *Carbon.* 2007; 45: 34-40

21. Chan-Bacab, M. J. and L. M. Pena-Rodriguez (2001). "Plant natural products with leishmanicidal activity." *Nat Prod Rep* 18(6): 674-688.
22. Chen, J., S. Chen, et al. (2008). "Functionalized single-walled carbon nanotubes as rationally designed vehicles for tumor-targeted drug delivery." *J Am Chem Soc* 130(49): 16778-16785.
23. Croft, S. L., M. P. Barrett, et al. (2005). "Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis." *Trends Parasitol* 21(11): 508-512.
24. Cuervo, P., G. B. Domont, et al. (2010). "Proteomics of trypanosomatids of human medical importance." *J Proteomics* 73(5): 845-867.
25. Cunningham, M. L., R. G. Titus, et al. (2001). "Regulation of differentiation to the infective stage of the protozoan parasite *Leishmania major* by tetrahydrobiopterin." *Science* 292(5515): 285-287.
26. Date, A. A., M. D. Joshi, et al. (2007). "Parasitic diseases: Liposomes and polymeric nanoparticles versus lipid nanoparticles." *Adv Drug Deliv Rev* 59(6): 505-521.
27. Datta, L.C., B. S. Jaitawat. (2005). "Nanotechnology- The new frontier of medicine." *MJAFI* 62(3): 263-268.
28. de Almeida, M. C., V. Vilhena, et al. (2003). "Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review." *Mem Inst Oswaldo Cruz* 98(7): 861-870.
29. Descoteaux, A. and S. J. Turco (1999). "Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity." *Biochim Biophys Acta* 1455(2-3): 341-352.
30. Desjeux, P. (2004). "Leishmaniasis: current situation and new perspectives." *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 27(5): 305-318.
31. Doroud, D., F. Zahedifard, et al. (2011). "Delivery of a cocktail DNA vaccine encoding cysteine proteinases type I, II and III with solid lipid nanoparticles potentiate protective immunity against *Leishmania major* infection." *J Control Release* 153(2): 154-162.
32. Dridi, L., A. Haimeur, et al. (2010). "Structure-function analysis of the highly conserved charged residues of the membrane protein FT1, the main folic

- acid transporter of the protozoan parasite *Leishmania*." *Biochem Pharmacol* 79(1): 30-38.
33. Elnakat, H. and M. Ratnam (2004). "Distribution, functionality and gene regulation of folate receptor isoforms: implications in targeted therapy." *Adv Drug Deliv Rev* 56(8): 1067-1084.
 34. Escobar, P., I. P. Hernandez, et al. (2006). "Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes." *Biomedica* 26 Suppl 1: 49-56.
 35. Faraut-Gambarelli, F., R. Piarroux, et al. (1997). "In vitro and in vivo resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis." *Antimicrob Agents Chemother* 41(4): 827-830.
 36. Foldvari, M. and M. Bagonluri (2008). "Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: I. Pharmaceutical properties." *Nanomedicine* 4(3): 173-182.
 37. Fraga, J., A. M. Montalvo, et al. (2010). "Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene." *Infect Genet Evol* 10(2): 238-245.
 38. Fukui, Y., Y. Ajichi, et al. (2003). "Monte Carlo prediction of near-infrared light propagation in realistic adult and neonatal head models." *Appl Opt* 42(16): 2881-2887.
 39. Gossage, S. M., M. E. Rogers, et al. (2003). "Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle." *Int J Parasitol* 33(10): 1027-1034.
 40. Guo, L. S. (2001). "Amphotericin B colloidal dispersion: an improved antifungal therapy." *Adv Drug Deliv Rev* 47(2-3): 149-163.
 41. Huang, H., Q. Yuan, et al. (2011). "A new family of folate-decorated and carbon nanotube-mediated drug delivery system: synthesis and drug delivery response." *Adv Drug Deliv Rev* 63(14-15): 1332-1339.

42. Hughes M. Carbon Nanotube–Conducting Polymer Composites in Supercapacitors. In: Schwarz JA, Contescu CI, Putyera K. ENN2-120024600 Dekker Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, Second Edition. Cambridge, U.K. 2009; p. 574-57
43. Instituto Nacional de Salud (2009). Comportamiento de los casos de Leishmania reportados al SIVIGILA hasta el 2009, Instituto Nacional de Salud-Colombia 1-16.
44. Instituto Nacional de Salud (2011). Comportamiento de los casos de Leishmania reportados al SIVIGILA en el año 2011, Instituto Nacional de Salud-Colombia.
45. Jackman, A. L., D. S. Theti, et al. (2004). "Antifolates targeted specifically to the folate receptor." *Adv Drug Deliv Rev* 56(8): 1111-1125.
46. Jos, A., S. Pichardo, et al. (2009). "Cytotoxicity of carboxylic acid functionalized single wall carbon nanotubes on the human intestinal cell line Caco-2." *Toxicol In Vitro* 23(8): 1491-1496.
47. Kam, N. W. and H. Dai (2005). "Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality." *J Am Chem Soc* 127(16): 6021-6026.
48. Kam, N. W., M. O'Connell, et al. (2005). "Carbon nanotubes as multifunctional biological transporters and near-infrared agents for selective cancer cell destruction." *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(33): 11600-11605.
49. Kane, M. M. and D. M. Mosser (2000). "Leishmania parasites and their ploys to disrupt macrophage activation." *Curr Opin Hematol* 7(1): 26-31.
50. Kang, B., D. Yu, et al. (2009). "Cancer-cell targeting and photoacoustic therapy using carbon nanotubes as "bomb" agents." *Small* 5(11): 1292-1301.
51. Kawasaki, E. S. and A. Player (2005). "Nanotechnology, nanomedicine, and the development of new, effective therapies for cancer." *Nanomedicine (Lond)* 1(2): 101-109.

52. Ke, C. Y., C. J. Mathias, et al. (2003). "The folate receptor as a molecular target for tumor-selective radionuclide delivery." *Nucl Med Biol* 30(8): 811-817.
53. Kostarelos, K., L. Lacerda, et al. (2007). "Cellular uptake of functionalized carbon nanotubes is independent of functional group and cell type." *Nat Nanotechnol* 2(2): 108-113.
54. Kundig, C., A. Haimeur, et al. (1999). "Increased transport of pteridines compensates for mutations in the high affinity folate transporter and contributes to methotrexate resistance in the protozoan parasite *Leishmania tarentolae*." *EMBO J* 18(9): 2342-2351.
55. Lacerda, L., A. Bianco, et al. (2006). "Carbon nanotubes as nanomedicines: from toxicology to pharmacology." *Adv Drug Deliv Rev* 58(14): 1460-1470.
56. Landfear, S. M. (2001). "Molecular genetics of nucleoside transporters in *Leishmania* and African trypanosomes." *Biochem Pharmacol* 62(2): 149-155.
57. Liang, L. and M. Subirade (2010). "Beta-lactoglobulin/folic acid complexes: formation, characterization, and biological implication." *J Phys Chem B* 114(19): 6707-6712.
58. Liu Y, Tang J, Chen X, Xin JH. Decoration of carbon nanotubes with chitosan. *Carbon N Y*. 2005; 43: 3178-80.
59. Lopes, R., C. V. Eleuterio, et al. (2011). "Lipid nanoparticles containing oryzalin for the treatment of leishmaniasis." *Eur J Pharm Sci*.
60. Love, D. C., M. Mentink Kane, et al. (1998). "*Leishmania amazonensis*: the phagocytosis of amastigotes by macrophages." *Exp Parasitol* 88(3): 161-171.
61. Mahmood, M., A. Karmakar, et al. (2009). "Synergistic enhancement of cancer therapy using a combination of carbon nanotubes and anti-tumor drug." *Nanomedicine (Lond)* 4(8): 883-893.

62. Markovic, Z. M., L. M. Harhaji-Trajkovic, et al. (2011). "In vitro comparison of the photothermal anticancer activity of graphene nanoparticles and carbon nanotubes." *Biomaterials* 32(4): 1121-1129.
63. Martiny, A., J. R. Meyer-Fernandes, et al. (1999). "Altered tyrosine phosphorylation of ERK1 MAP kinase and other macrophage molecules caused by *Leishmania amastigotes*." *Mol Biochem Parasitol* 102(1): 1-12.
64. Melby, P. C. (2002). "Recent developments in leishmaniasis." *Curr Opin Infect Dis* 15(5): 485-490.
65. Minodier, P. and P. Parola (2007). "Cutaneous leishmaniasis treatment." *Travel Med Infect Dis* 5(3): 150-158.
66. Mitropoulos, P., P. Konidas, et al. (2010). "New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment." *J Am Acad Dermatol* 63(2): 309-322.
67. Montanari, J., C. Maidana, et al. (2010). "Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark." *J Control Release* 147(3): 368-376.
68. Moor, A. C. (2000). "Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy." *J Photochem Photobiol B* 57(1): 1-13.
69. Mosleh, I. M., E. Geith, et al. (2008). "Efficacy of a weekly cryotherapy regimen to treat *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis." *J Am Acad Dermatol* 58(4): 617-624.
70. Ochsner, M. (1997). "Photodynamic therapy: the clinical perspective. Review on applications for control of diverse tumorous and non-tumorous diseases." *Arzneimittelforschung* 47(11): 1185-1194.
71. Oliveira, A. L., Y. M. Brustoloni, et al. (2009). "Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil." *Trop Doct* 39(3): 180-182.
72. OMS (2010). *Control de la Leishmaniasis Organizacion Mundial de la Salud* 7.

73. Opperdoes, F. R. and G. H. Coombs (2007). "Metabolism of Leishmania: proven and predicted." *Trends Parasitol* 23(4): 149-158.
74. Osiecka, B. J., Z. Piotr, et al. (2003). "Determination of basic fibroblast growth factor levels in serum of tumor-bearing BALB/c mice treated with photodynamic therapy." *Pol J Pathol* 54(2): 117-121.
75. Ouameur, A. A., I. Girard, et al. (2008). "Functional analysis and complex gene rearrangements of the folate/biopterin transporter (FBT) gene family in the protozoan parasite Leishmania." *Mol Biochem Parasitol* 162(2): 155-164.
76. Ouellette, M., J. Drummel-Smith, et al. (2004). "Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments." *Drug Resist Updat* 7(4-5): 257-266.
77. Papadopoulou, B., C. Kundig, et al. (1998). "Drug resistance in Leishmania: similarities and differences to other organisms." *Drug Resist Updat* 1(4): 266-278.
78. Parveen, S. and S. K. Sahoo (2006). "Nanomedicine: clinical applications of polyethylene glycol conjugated proteins and drugs." *Clin Pharmacokinet* 45(10): 965-988.
79. Pastorin, G., W. Wu, et al. (2006). "Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery." *Chem Commun (Camb)*(11): 1182-1184.
80. Pavli, A. and H. C. Maltezou (2010). "Leishmaniasis, an emerging infection in travelers." *Int J Infect Dis* 14(12): e1032-1039.
81. Pearson, R. D., R. Romito, et al. (1981). "Interaction of Leishmania donovani promastigotes with human monocyte-derived macrophages: parasite entry, intracellular survival, and multiplication." *Infect Immun* 32(3): 1249-1253.
82. Perez-Victoria, F. J., M. P. Sanchez-Canete, et al. (2006). "Phospholipid translocation and miltefosine potency require both L. donovani miltefosine

- transporter and the new protein LdRos3 in Leishmania parasites." *J Biol Chem* 281(33): 23766-23775.
83. Piscopo, T. V. and C. Mallia Azzopardi (2007). "Leishmaniasis." *Postgrad Med J* 83(976): 649-657.
84. Pramanik, M., M. Swierczewska, et al. (2009). "Single-walled carbon nanotubes as a multimodal-thermoacoustic and photoacoustic-contrast agent." *J Biomed Opt* 14(3): 034018.
85. Reithinger, R. and P. G. Coleman (2007). "Treating cutaneous leishmaniasis patients in Kabul, Afghanistan: cost-effectiveness of an operational program in a complex emergency setting." *BMC Infect Dis* 7: 3.
86. Reithinger, R., J. C. Dujardin, et al. (2007). "Cutaneous leishmaniasis." *Lancet Infect Dis* 7(9): 581-596.
87. Reithinger, R., K. Aadil, et al. (2004). "Cutaneous leishmaniasis, northern Afghanistan." *Emerg Infect Dis* 10(5): 966-967.
88. Roco, M. C. (2003). "Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine." *Curr Opin Biotechnol* 14(3): 337-346.
89. Rogers, M. E., M. L. Chance, et al. (2002). "The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*." *Parasitology* 124(Pt 5): 495-507.
90. Rokov, E., G. (2006). "Chemistry of carbon nanotubes". Taylor & Francis Group. Cap. 5.
91. Romero, M. and J. D. Sanches (2007). "Una mirada a la epidemiología y al control de la leishmaniasis zoonótica en Colombia." *Biosalud* 6: 99-111.
92. Romero, E. L. and M. J. Morilla (2008). "Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question." *Expert Opin Drug Deliv* 5(7): 805-823.
93. Romero, E. L. and M. J. Morilla (2010). "Nanotechnological approaches against Chagas disease." *Adv Drug Deliv Rev* 62(4-5): 576-588.

94. Rosca I D, Watari F, Uo M, Akasaka T. oxidation of multiwalled carbon nanotubes by nitric acid. *Carbon*. 2005; 3124-3131
95. Rungrotmongkol TR, Arsawang U, Iamsamai C, Vongachariya A, Dubas ST, Ruktanonchai U, et al. Increased dispersion and solubility of carbon nanotubes noncovalently modified by the polysaccharide biopolymer, chitosan. MD simulations. *Chem. Phys. Lett.* 2011; 134-137.
96. Sabharanjak, S. and S. Mayor (2004). "Folate receptor endocytosis and trafficking." *Adv Drug Deliv Rev* 56(8): 1099-1109.
97. Samuel, U. and J. P. Guggenbichler (2004). "Prevention of catheter-related infections: the potential of a new nano-silver impregnated catheter." *Int J Antimicrob Agents* 23 Suppl 1: S75-78.
98. Santos-Magalhaes, N. S. and V. C. Mosqueira (2010). "Nanotechnology applied to the treatment of malaria." *Adv Drug Deliv Rev* 62(4-5): 560-575.
99. Schmidt-Ott, R., T. Klenner, et al. (1999). "Topical treatment with hexadecylphosphocholine (Miltex) efficiently reduces parasite burden in experimental cutaneous leishmaniasis." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 93(1): 85-90.
100. Seifert, K., S. Matu, et al. (2003). "Characterisation of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine)." *Int J Antimicrob Agents* 22(4): 380-387.
101. Sereno, D., P. Michon, et al. (1997). "Phenotypic characterization of *Leishmania mexicana* pentamidine-resistant promastigotes. Modulation of the resistance during in-vitro developmental life cycle." *C R Acad Sci III* 320(12): 981-987.
102. Soto, J., J. Toledo, et al. (2001). "Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent." *Clin Infect Dis* 33(7): E57-61.
103. Suh, W. H., K. S. Suslick, et al. (2009). "Nanotechnology, nanotoxicology, and neuroscience." *Prog Neurobiol* 87(3): 133-170.
104. Sundar, S. (2001). "Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis." *Trop Med Int Health* 6(11): 849-854.

105. Sundar, S. and M. Chatterjee (2006). "Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities." *Indian J Med Res* 123(3): 345-352.
106. Sundar, S., T. K. Jha, et al. (2003). "Single-dose liposomal amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis in India: a multicenter study." *Clin Infect Dis* 37(6): 800-804.
107. Vaisman, L., H. D. Wagner, et al. (2006). "The role of surfactants in dispersion of carbon nanotubes." *Adv Colloid Interface Sci* 128-130: 37-46.
108. Vardy, D., Y. Barenholz, et al. (2001). "Efficacious topical treatment for human cutaneous leishmaniasis with ethanolic lipid amphotericin B." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 95(2): 184-186.
109. Vega, J. C., B. F. Sanchez, et al. (2009). "The efficacy of thermotherapy to treat cutaneous leishmaniasis in Colombia: a comparative observational study in an operational setting." *Trans R Soc Trop Med Hyg* 103(7): 703-706.
110. Wick, P., P. Manser, et al. (2007). "The degree and kind of agglomeration affect carbon nanotube cytotoxicity." *Toxicol Lett* 168(2): 121-131.
111. Worle-Knirsch, J. M., K. Pulskamp, et al. (2006). "Oops they did it again! Carbon nanotubes hoax scientists in viability assays." *Nano Lett* 6(6): 1261-1268.
112. Yin Wang a,b, Rui Guo b, Xueyan Cao b, Mingwu Shen b, Xiangyang Shi. Encapsulation of 2-methoxyestradiol within multifunctional poly(amidoamine) dendrimers for targeted cancer therapy. *Biomater*. 2011; 32: 3322-3329.