

**PERMEACIÓN Y RETENCIÓN DE FTALOCIANINA DE ALUMINIO CLORADA  
(PcAlCl) EN LOS DIFERENTES ESTRATOS DE LA PIEL HUMANA SANA  
PARA SU OPTIMIZACIÓN EN FORMULACIONES TÓPICAS EN  
LEISHMANIASIS CUTÁNEA**

**VICTORIA EUGENIA OSPINA ARISTIZABAL**

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE SALUD  
ESCUELA DE MEDICINA  
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS  
BUCARAMANGA  
2013**

**PERMEACIÓN Y RETENCIÓN DE FTALOCIANINA DE ALUMINIO CLORADA  
(PcAlCl) EN LOS DIFERENTES ESTRATOS DE LA PIEL HUMANA SANA  
PARA SU OPTIMIZACIÓN EN FORMULACIONES TÓPICAS EN  
LEISHMANIASIS CUTÁNEA.**

**VICTORIA EUGENIA OSPINA ARISTIZABAL**

**Tesis de grado como requisito para optar al título de  
MAGISTER 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  
2013**

## **AGRADECIMIENTOS**

A todos los que con su valiosa asesoría, dedicación, compromiso y apoyo contribuyeron a la realización de este trabajo.

Doctora Patricia Escobar, Doctor Julio Cesar Mantilla, Doctor Eduardo Ricci, Doctor Víctor Martínez, Doctor Javier Higuera, Doctor Carlos Díaz, Doctor Carlos Conde, Doctor Luis Carlos Orozco, Claudia Rico, Profesores Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Personal del laboratorio de patología de la escuela de medicina UIS, Personal del Laboratorio de quimioterapia del CINTROP, Laboratorio de Histopatología Doctor Alfredo Acevedo, Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” COLCIENCIAS.

## CONTENIDO

	<b>Pág.</b>
INTRODUCCION.	15
1. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE.	18
1.1. TRATAMIENTOS TÓPICOS DE APLICACIÓN CUTANEA.	18
1.1.1 Generalidades.	18
1.1.2. Componentes de una formulación tópica.	19
1.1.2.1 Excipientes.	19
1.1.2.2 Formas farmacéuticas.	20
1.1.2.3 Fármacos o sustancias activas.	23
1.1.3 Sistemas transdérmicos de liberación de fármacos.	23
1.2. NANOTECNOLOGIA Y SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS.	25
1.2.1 Generalidades.	25
1.2.2 Sistemas de liberación de fármacos.	26
1.3. LA PIEL.	30
1.3.1 Capas de la piel y sus componentes.	31
1.3.2 El estrato corneo como principal barrera de la piel.	34
1.3.3. Variaciones en la estructura de barrera del Estrato córneo.	35
1.4. ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA.	36
1.4.1 Generalidades.	36
1.4.2 Aspectos teóricos de la absorción transdérmica.	37
1.4.3 Factores que afectan la absorción transdérmica.	38
1.4.4 Vías de entrada de los fármacos a la piel.	39
1.4.5. Evaluación de la permeación transdérmica.	40
1.5. LEISHMANIASIS.	40
1.5.1 Generalidades.	40

1.5.2 Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	41
1.5.3 Leishmaniasis cutánea.	42
1.5.3.1 Clínica e histopatología de la Leishmaniasis Cutánea.	43
1.5.3.2 Diagnostico de la Leishmaniasis Cutánea.	44
1.5.3.3 Tratamiento de la Leishmaniasis Cutánea.	46
1.5.3.3 Tratamientos tópicos en Leishmaniasis Cutánea.	47
1.6. TERAPIA FOTODINÁMICA.	49
1.6.1 Fotosensibilizadores.	51
1.6.2 Ftalocianinas.	51
1.6.3 Terapia fotodinámica en el tratamiento de la Leishmaniasis Cutánea.	52
2. OBJETIVOS.	54
2.1. OBJETIVO GENERAL.	54
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.	54
3. METODOLOGÍA.	55
3.1 FORMULACIONES DE FTALOCIANINA DE ALUMINIO CLORADA.	56
3.1.1 Curvas de calibración.	58
3.1.2 Espectros de emisión y absorción.	59
3.2 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE FRAGMENTOS DE PIEL.	59
3.2.1 Condicionamientos éticos.	59
3.2.2 Procesamiento de la piel.	60
3.2.3 Biopsias de piel.	62
3.3 ENSAYOS DE PERMEACIÓN DE PcAlCl EN PIEL HUMANA.	62
3.3.1 Membranas.	62
3.3.2 Celdas de Franz.	63
3.3.3 Procedimiento.	65
3.4. ENSAYOS DE RETENCIÓN DE PcAlCl EN PIEL HUMANA SANA.	66
3.4.1 Método de las cintas adhesivas o <i>Tape stripping</i> .	66
3.4.2 Retención de PcAlCl en epidermis y dermis (E+D).	67

3.5. VALORACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PIEL DESPUÉS DE LOS EXPERIMENTOS.	67
3.6. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS EN PIEL CON ULCERACIONES.	68
3.6.1 Adquisición de las biopsias de piel.	68
3.6.2 Variables estudiadas.	68
3.6.3 Lectura y análisis de las muestras.	70
3.7. ANALISIS ESTADÍSTICO.	70
4. RESULTADOS.	71
4.1. CARACTERÍSTICAS FISICOQUIMICAS DE LA PcAICI EN LAS FORMULACIONES UTILIZADAS.	71
4.1.1 Espectros de absorción y emisión de fluorescencia.	71
4.1.2 Concentración de PcAICI en F1 y F2.	74
4.2. PIEL ABDOMINAL OBTENIDA PARA SER UTILIZADA EN LOS ENSAYOS CON CELDAS DE FRANZ.	75
4.3. PERMEACIÓN DE PcAICI EN PIEL HUMANA.	78
4.4. RETENCIÓN DE PcAICI EN LAS CAPAS DE LA PIEL.	79
4.5. VALORACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PIEL HUMANA DESPUÉS DE LOS EXPERIMENTOS.	83
4.6. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS EN PIEL CON ULCERACIONES.	86
4.6.1 Características encontradas en la piel con ulceraciones crónicas compatibles con leishmaniasis cutánea.	91
4.6.2 Características encontradas en la piel con ulceraciones crónicas por causa diferente a leishmaniasis cutánea.	93
5. DISCUSIÓN	96
6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	112
BIBLIOGRAFIA	114

## LISTA DE TABLAS

	<b>pág</b>
<b>Tabla 1.</b> Principales excipientes utilizados en las formulaciones tópicas.	20
<b>Tabla 2.</b> Especies de <i>Leishmania</i> implicadas en la leishmaniasis cutánea en el hombre.	43
<b>Tabla 3.</b> Diagnóstico diferencial de la leishmaniasis cutánea.	46
<b>Tabla 4.</b> Fármacos empleados en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea.	47
<b>Tabla 5.</b> Características químicas y moleculares de la PcAlCl.	57
<b>Tabla 6.</b> Formulaciones evaluadas en los ensayos con celdas de Franz y sus controles.	65
<b>Tabla 7.</b> Concentración de PcAlCl en las formulaciones.	75
<b>Tabla 8.</b> Total de ensayos de permeación y retención realizados	79
<b>Tabla 9.</b> Estadísticos de contraste para capas de la piel.	81
<b>Tabla 10.</b> Total de biopsias examinadas.	87
<b>Tabla 11.</b> Escala para valoración de <i>Kappa</i> .	89
<b>Tabla 12.</b> Índice <i>Kappa</i> para las variables estudiadas en epidermis.	89
<b>Tabla 13.</b> Índice <i>Kappa</i> para las variables estudiadas en dermis.	90
<b>Tabla 14.</b> Índice <i>Kappa</i> para las variables estudiadas en hipodermis.	90
<b>Tabla 15.</b> Características histológicas de las biopsias examinadas.	95

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
<b>Figura 1.</b> Sistemas de liberación de fármacos.	27
<b>Figura 2.</b> Esquema estructural de la piel.	31
<b>Figura 3.</b> Rutas de penetración de un fármaco a través de la piel.	40
<b>Figura 4.</b> Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> .	42
<b>Figura 5.</b> Diseño metodológico.	56
<b>Figura 6:</b> Preparación de la piel humana para los ensayos con celdas de Franz.	61
<b>Figura 7:</b> Representación del sistema de celdas de Franz.	64
<b>Figura 8.</b> Espectro de absorción de la PcAlCl en los diferentes solventes.	72
<b>Figura 9.</b> Espectro de emisión de fluorescencia de la PcAlCl en los diferentes solventes.	73
<b>Figura 10.</b> Microfotografías de biopsias de piel obtenida para ensayos de permeación y retención.	77
<b>Figura 11.</b> Retención de PcAlCl en piel humana.	80
<b>Figura 12.</b> Diferencia en la concentración de PcAlCl promedio en el EC y en E+D.	81
<b>Figura 13.</b> Retención promedio de la PcAlCl en piel, con las formulaciones utilizadas.	82
<b>Figura 14.</b> Incidencia entre concentraciones, capas de la piel y la formulación utilizada.	83
<b>Figura 15.</b> Microfotografías de la piel utilizada en los ensayos de permeación.	85
<b>Figura 16.</b> Microfotografías de piel con ulceración crónica compatible con leishmaniasis cutánea.	92-93
<b>Figura 17.</b> Microfotografías de piel con ulceración crónica por causa diferente a leishmaniasis cutánea.	94

## ABREVIATURAS

ALA	Acido amino levuleico
DMSO	Dimetil sulfóxido
EC	Estrato córneo
E+D	Epidermis + Dermis
F1	Formulación 1
F2	Formulación 2
FS	Fotosensibilizador
LC	Leishmaniasis cutánea
NE	Nanoemulsión
PBS	Solución amortiguadora de fosfato salino
Pc	Ftalocianinas
PcAlCl	Ftalocianina de aluminio clorada
PcZn	Ftalocianina de Zinc
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TFD	Terapia fotodinámica
UV-Vis	Ultravioleta-Visible

## RESUMEN

**TITULO:** PERMEACIÓN Y RETENCIÓN DE FTALOCIANINA DE ALUMINIO CLORADA EN LOS DIFERENTES ESTRATOS DE LA PIEL HUMANA SANA, PARA SU OPTIMIZACIÓN EN FORMULACIONES TÓPICAS EN LEISHMANIASIS CUTÁNEA.

**PALABRAS CLAVE:** Ftalocianina de Aluminio Clorada, Permeación, Retención, Histopatología, Leishmaniasis cutánea.

**AUTORES:** OSPINA ARISTIZABAL, Victoria Eugenia, ESCOBAR RIVERO Patricia \*\*

La ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) es un fotosensibilizador utilizado en terapia fotodinámica, constituye una importante alternativa para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea (LC). Aplicada tópicamente debe penetrar las capas de la piel y retenerse en dermis, dado que allí se alojan los macrófagos parasitados por *Leishmania*.

El objetivo fue determinar la permeación y retención de PcAlCl en piel humana sana para su optimización en formulaciones tópicas en LC. Se realizó adicionalmente un estudio de comparación histológica en biopsias de pacientes con ulceraciones crónicas por LC y por causas diferentes a LC.

Se prepararon una solución y una nanoemulsión de PcAlCl. Se obtuvo piel abdominal de mujeres sometidas a cirugía estética. Se realizaron estudios de permeación y retención de PcAlCl con celdas de Franz; y estudios histopatológicos de la piel antes y después de los ensayos. Los resultados se expresaron como concentración de PcAlCl ( $\text{nM}/\text{cm}^2$ ). Se realizó análisis histopatológico de 22 biopsias de piel con ulceración crónica. Se determinó concordancia entre observadores, obteniéndose el índice *Kappa* para las variables estudiadas.

La PcAlCl se retuvo principalmente en estrato córneo, en promedio 60,3 nM y en epidermis-dermis en promedio 8,1 nM; no se detectó en el medio receptor después de 12 y 24 horas. Se observaron cambios histológicos en la piel después de los ensayos: desprendimiento del estrato córneo, colágeno fragmentado y cambios epidérmicos. El estudio histopatológico mostró baja-moderada concordancia entre observadores, confirmando la dificultad diagnóstica de la histopatología en LC, sin embargo, se observaron algunas características propias de la lesión por LC.

Lo PcAlCl no permeó el medio receptor, pudo retenerse dermis. Realizar ensayos en piel desprovista de EC y ensayos *in vivo* en animales infectados con LC, estimaría el comportamiento de las formulaciones en piel ulcerada por LC, donde el EC y parte de la epidermis están ausentes.

---

\*Tesis de grado Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas.

\*\*Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director de Tesis: Patricia Escobar Rivero. Bacterióloga, M.SC., Ph.D

## ABSTRACT

**TITLE:** PERMEATION AND RETENTION OF CHLOROALUMINIUM PHTHALOCYANINE IN DIFFERENT HEALTHY HUMAN SKIN LAYERS, FOR OPTIMIZATION IN TOPICAL FORMULATIONS IN CUTANEOUS LEISHMANIASIS.[\*]

**KEYWORDS:** Chloroaluminum Phthalocyanine, Permeation, Retention, Histopathology, Cutaneous Leishmaniasis.

**AUTHORS:** OSPINA ARISTIZABAL, Victoria Eugenia, ESCOBAR RIVERO, Patricia [\*\*]

The Chloroaluminum phthalocyanine (CIAIPc) is a photosensitizer used in photodynamic therapy, and constitutes an important alternative for cutaneous leishmaniasis (CL) treatment. The AICIPc topically applied must have to penetrate skin layers and be retained in the dermis, as there are housed *Leishmania* parasitized macrophages.

The objective was to determine CIAIPc permeation and retention in healthy human skin for optimization in topical formulations in LC. We performed a comparison study histological in biopsies of patients with chronic ulceration by LC and by different causes to LC.

Were prepared a solution and a nanoemulsion of CIAIPc. Abdominal skin was obtained from women undergone cosmetic surgery. Permeation and retention studies were conducted with Franz cell method, and histological studies of skin before and after the tests. The results were expressed as concentration of PcAlCl ( $\text{nM}/\text{cm}^2$ ). Histopathological analysis of 22 skin biopsies with chronic ulceration (12 lesions by LC and 10 no LC lesions) was conducted, analyzed by three observers. The results were expressed qualitatively and the correlation between observers with the software Stata 10.0 was determined, finding *Kappa* index for each variable.

The AICIPc was retained mainly in stratum corneum (SC) with average values of 60,3 nM and in epidermis-dermis with values of 8,1 nM. The CIAIPc was not detected in the receptor fluid after 12 and 24 hours. Histological changes were noted in the skin after testing such as: SC detachment, collagen fragmentation and changes in epidermis. In the histopathological study, a low to moderate correlation between observers, confirming the diagnosis difficulty of histopathology in LC, however some characteristics of LC could be observed.

The AICIPc could not permeate the receptor fluid, it could be retained in the dermis. Performing tests using skin without SC and *in vivo* testing in LC-infected animals, estimate the behavior of the formulations by LC ulcerated skin, where the EC and parts of the epidermis are absent.

---

[\*] Thesis. Master in Basic Biomedical Sciences.

[\*\*] Faculty of Health. Master in Basic Biomedical Sciences. Thesis Director: Patricia Escobar Rivero. Bacteriologist, M.Sc., Ph.D

## INTRODUCCION

La terapia tópica de las afecciones cutáneas consiste en la aplicación de preparados farmacéuticos sobre la piel o en una lesión cutánea para ejercer una acción local. El tratamiento tópico de la leishmaniasis cutánea (LC) es una importante alternativa para esta enfermedad ya que al tratar las lesiones de forma localizada se evitan algunos inconvenientes de los tratamientos aplicados por vía sistémica tales como toxicidad, dolor en el sitio de aplicación, costo, variabilidad en su eficacia y uso limitado en embarazadas. (Croft *et al.*, 2006, Ameen *et al.*, 2010). Actualmente los tratamientos localizados de la LC pueden realizarse con fármacos como la paramomicina en forma de ungüentos o cremas (Neva *et al.*, 2006., Blum *et al.*, 2004, Minodier & Parola, 2006, Lecoœur *et al.*, 2010) antimoniales pentavalentes inyectados en la lesión (Blum *et al.*, 2004, Minodier&Parola, 2006) o con métodos físicos utilizando criógenos como el nitrógeno líquido (Asilian *et al.*, 2003), mediante generadores de ondas de radiofrecuencia con temperaturas hasta de 50°C (Navin *et al.*, 1990), o la terapia fotodinámica (TFD). En esta última se administra un fotosensibilizador (FS), que al ser activado a una longitud de onda específica, en presencia de oxígeno, puede generar especies reactivas de oxígeno produciendo un efecto citotóxico (Dutta *et al.*, 2005; Akilov *et al.*, 2006; Escobar *et al.* 2006; Ameen, 2010; Hernández, 2010; Montanari *et al.*,2010; Somenci *et al.*, 2011; Taylor *et al.*, 2011).

Dadas las propiedades de barrera de la piel, se requiere de sistemas adecuados para hacer que un compuesto aplicado tópicamente pueda atravesar la barrera del estrato córneo y retenerse en el sitio donde va a ejercer su efecto terapéutico. La nanotecnología brinda la posibilidad de obtener sistemas biocompatibles a escala nanométrica, los cuales tiene la capacidad de transportar y entregar un principio activo al blanco terapéutico. Estos sistemas de liberación de fármacos juegan un papel muy importante en la TFD contra leishmaniasis. En la actualidad, se

estudian el uso de liposomas (Montanari *et al.*, 2010), nanopartículas (Vargas *et al.*, 2008), nanoemulsiones (Primo *et al.*, 2007, Takegami *et al.*, 2010), para el transporte de fotosensibilizadores en formulaciones tópicas.

La actividad de la ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) como FS en la TFD contra *Leishmania sp* ha sido demostrada en amastigotes y promastigotes de *L. (L.) amazonensis*, *in vivo* e *in vitro*; y en promastigotes de *L. (Leishmania) chagasi* (*syn L. infantum*) y *L. (V.) panamensis*, *in vitro*. La PcAlCl es un fotosensibilizador (FS) utilizado en formulaciones tópicas para TFD en el tratamiento del cáncer de piel Kyriazi *et al.*, 2008). Sin embargo, su capacidad de permeación y retención en la piel humana no se ha establecido. Por lo tanto este trabajo de investigación propone determinar la permeación y retención de la PcAlCl en los diferentes estratos de la piel humana sana, para su optimización en formulaciones tópicas en LC y determinar las características histopatológicas de las ulceraciones cutáneas crónicas causadas por leishmaniasis cutánea y por causas diferentes a ésta, como aproximación al comportamiento de las formulaciones tópicas en la ulceración crónica por leishmaniasis cutánea.

En este documento se presenta una descripción de los tratamientos tópicos en general, los sistemas de liberación de fármacos y el aporte de la nanotecnología al desarrollo de éstos. Seguidamente se exponen los conceptos principales de la absorción transdérmica, enfatizando en las posibles rutas de entrada de los fármacos a la piel, las leyes de Fick, la piel y sus propiedades de barrera; luego se realiza una breve revisión de la LC en general, los tratamientos disponibles incluyendo entre estos la TFD como una promisoriosa alternativa para esta enfermedad.

La metodología fue desarrollada en dos fases. En la primera fase se llevaron a cabo ensayos de permeación transdérmica, realizados con el método de celdas de Franz, para lo cual se precisó de la obtención de piel abdominal humana y la

preparación de dos formulaciones de PcAICI (solución F1 y nanoemulsión F2). En esta fase se estandarizaron algunos procedimientos como la obtención y procesamiento de la piel para ser utilizada como membrana en los ensayos, el método de las celdas de Franz, el estudio histológico de la piel normal y la preparación de formulaciones de PcAICI. La segunda fase se realizó con el fin de establecer un patrón histológico propio de la LC, para lo cual se obtuvieron biopsias de piel de pacientes con ulceraciones crónicas, entre las que se encontraban lesiones con diagnóstico de LC y por causas diferentes a ésta.

Los resultados obtenidos en la fase I muestran la capacidad de las formulaciones utilizadas en este trabajo para transportar la PcAICI a las capas de la piel y permitir su retención; así como su permeación al medio receptor, lo cual dependía en parte, de la interacción de estas formulaciones con el estrato córneo. En la fase II, se encontraron importantes diferencias entre las ulceraciones crónica por LC y por otras causas, pudiendo así establecer algunas características histopatológicas propias de LC.

Conocido el potencial de las formulaciones para transportar la PcAICI al interior de la piel sana, y las características histopatológicas de las ulceraciones crónicas por LC, nos acercamos a predecir en parte, como sería el comportamiento de estas formulaciones de PcAICI en la piel ulcerada y su posibilidad de promover la retención de éste compuesto en suficiente concentración a nivel de la dermis.

Los perfiles de retención del PcAICI obtenidos sirven como base para realizar otros ensayos de permeación transdérmica con membranas que simulen las características de la piel ulcerada y en un momento dado, pasar a los ensayos *in vivo*, pudiendo así dar continuidad al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para la LC.

## 1. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

A continuación se realizará la revisión de los conceptos teóricos más importantes para el desarrollo del presente trabajo de investigación. En primer lugar se exponen las generalidades de los tratamientos tópicos y sus componentes principales; se revisan los conceptos y aplicaciones de la nanotecnología y los sistemas de liberación de fármacos. Se describen los aspectos más relevantes de la absorción transdérmica, sus fundamentos teóricos y las vías de entrada de los fármacos a la piel. Se presenta una descripción de la piel normal, la leishmaniasis en general, haciendo énfasis en la forma cutánea, tratamientos sistémicos y tópicos. Seguidamente se definirán otras modalidades terapéuticas actualmente en estudio para el tratamiento de la LC, enfatizando en la TFD y el uso de las ftalocianinas como FS.

### 1.1. TRATAMIENTOS TÓPICOS DE APLICACIÓN CUTANEA.

**1.1.1 Generalidades.** El tratamiento tópico consiste en la aplicación de preparados terapéuticos directamente sobre la piel o en una lesión cutánea; que además de producir una acción local, en ocasiones pueden conllevar la absorción sistémica del compuesto activo, lo cual es dependiente del estado de la piel, cuando ésta se encuentra lesionada la absorción aumenta; así mismo la absorción es menor en las zonas donde el grosor del estrato corneo es mayor (Peña, 2007)

La terapia tópica tiene como ventajas que la formulación puede ser administrada por el mismo paciente, es mínimamente invasiva, se pueden conseguir altas concentraciones locales evitando la aparición de efectos sistémicos indeseables, pueden utilizarse fármacos que por la vía sistémica podrían ser tóxicos como en el caso del sulfato de polimixina, un antibiótico contra bacterias gramnegativas, que

de alcanzar la vía sistémica, causa neurotoxicidad y nefrotoxicidad. (Robertson & Maibach, 2010) .

Algunas de las desventajas de las formulaciones tópicas son la ineficacia en afecciones sistémicas, en ocasiones se puede producir fototoxicidad y fotosensibilidad, existiendo riesgo de sensibilización, como la que se presenta con el uso de antibióticos tópicos como neomicina o aminoglucósidos en el tratamiento de las úlceras en las piernas (Thornton *et al.*, 2003). Cuando un tratamiento tópico adecuadamente indicado, en lugar de mejorar la patología la empeora, debe sospecharse que alguno de sus constituyentes está produciendo un efecto sensibilizante o irritante (Jover & García, 2004).

**1.1.2. Componentes de una formulación tópica.** La formulación tópica tiene tres componentes principales: excipientes, formas medicamentosas y fármaco o sustancia activa (Botello & García, 2004). A continuación se definen estos componentes y se describen algunas de sus características.

**1.1.2.1 Excipientes.** Son sustancias que sirven de vehículo al compuesto activo, son los que proporcionan las características físico-químicas al producto (forma farmacéutica) y le confieren la capacidad de penetrar a través del estrato córneo (EC). De acuerdo a su composición se clasifican como polvos, líquidos y grasas. De los excipientes líquidos el más importante es el agua, que se emplea en forma de emulsiones, suspensiones o soluciones. Los excipientes en polvo pueden ser de naturaleza orgánica e inorgánica. Los excipientes grasos son llamados así dado que éste término se emplea para todas las sustancias de consistencia untosa, aunque no sean auténticas grasas desde el punto de vista químico. Las grasas vegetales son emolientes (sustancias que ablandan o relajan), no hidratantes ni hidrosolubles. Algunos de los excipientes más utilizados en las formulaciones tópicas se muestran en la Tabla 1 (Peña, 2007).

**Tabla 1.** Principales excipientes utilizados en las formulaciones tópicas.

<b>Líquidos</b>		Agua (el más importante), alcohol, glicerina, propilenglicol.
<b>Sólidos (Polvo)</b>	Orgánicos:	Almidón
	Inorgánicos:	Talco, óxido de zinc, óxido de titanio, bentonita, calamina.
<b>Grasas</b>	Vegetales	Aceites de oliva, ricino, almendras, cacahuete, manteca de cacao.
	Animales	Manteca de cerdo, cera de abejas y lanolina.
	Minerales	Parafina, aceite de parafina, vaselina.
	Industriales	Estearina, polietilenglicoles.

**1.1.2.2 Formas farmacéuticas.** También llamadas formas medicamentosas, son la base o vehículos en los que se añade el principio activo, están formadas por un excipiente o la combinación de varios de estos. Dado que hay tres tipos de excipientes, las bases pueden ser monofásicas, bifásicas o trifásicas (Jover & García, 2004, Peña, 2007)

- **Las bases monofásicas** pueden ser polvos, líquidos o grasas. Entre estas se encuentran:

**Polvos o sólidos:** como se muestra en la Tabla 1, estos pueden ser inorgánicos u orgánicos. Se caracterizan por su incapacidad para atravesar el EC, su uso está limitado a la acción en superficie. Se utilizan principalmente como protectores de la piel por su efecto refrescante y antiinflamatorio superficial, disminuyendo el prurito y la fricción en los pliegues, dada su capacidad de absorción son productos secantes, están contraindicados en la piel xerodérmica (Boada, 2004, Peña, 2007).

**Líquidos:** Unidos a sustancias activas pueden utilizarse en diferentes preparaciones. Entre estos se encuentran las soluciones, donde el vehículo más utilizado es el agua. Al añadir alcohol al 20% o 30% aumenta la evaporación; su aplicación es útil en superficies pilosas. Las tinturas, que consisten en soluciones alcohólicas fluidas con un principio activo disuelto, se evaporan rápidamente proporcionando alta concentración en el lugar de la aplicación. Los barnices son soluciones que al aplicarse dejan una película, éstos habitualmente contienen colodión. Las suspensiones son preparaciones turbias que llevan disperso el principio activo (Thornton *et al.*, 2003).

**Grasas:** Son los vehículos por excelencia. Pueden ser líquidas, sólidas o semisólidas, se licúan al aplicarse en la piel. Comprenden las pomadas, constituidas en un 70% de grasa y 30% agua, y los ungüentos constituidos en un 100% por grasa. Según la consistencia, la grasa puede ser líquida, semisólida o sólida. Las pomadas son impermeables y tienen un efecto oclusivo ya que evitan la evaporación y las secreciones por lo que se emplean en procesos dermatológicos secos y crónicos (Boada, 2004).

- **Vehículos o bases bifásicos:** Formados por la combinación de dos excipientes (Jover & García, 2004, Peña, 2007). Entre estos se encuentran: (Boada, 2004, Peña, 2007)

**Polvos:** formados por la mezcla de dos polvos.

**Ungüentos:** formados por la mezcla de dos grasas.

**Soluciones compuestas:** son la mezcla de dos líquidos

**Lociones:** formadas por la mezcla de polvo y líquido.

**Pasta o pasta grasa:** es la unión de grasas y polvo. En las pastas duras la proporción Polvo/Grasa es 2/1; en las pastas blandas la proporción es ½. .Un ejemplo de estas es la Pasta Lassar (Almidón, óxido de Zinc, Vaselina, lanolina.)

**Mixtura:** es la unión de polvo y líquido. Cuando predomina el polvo se denomina polvo secante (empleadas en lesiones extensas y ampollas en piel) y cuando predomina el líquido, loción para agitar. Cuando la unión es en partes iguales se denomina pasta al agua.

**Emulsiones:** Son mezclas no miscibles de grasas y agua. En toda emulsión se distingue una fase continua o externa y otra dispersa o interna. El comportamiento de una emulsión está determinado por las características de su fase externa. En las emulsiones agua en aceite (W/O), la fase discontinua interna acuosa se encuentra dispersa en la fase externa continua oleosa, se les denomina cremas frías, un ejemplo de estas son las pomadas. En las emulsiones aceite en agua (O/W), la fase interna discontinua oleosa está dispersa en la fase externa continua acuosa, son llamadas también cremas evanescentes. (Boada, 2004, Peña, 2007, Devarajan & Ravichandran, 2011)

- **Vehículos trifásicos:** Son la unión de tres excipientes (líquido, polvo y grasa). Entre estos se encuentran algunas pastas refrescantes, las cuales, por su contenido lipídico, resultan menos desecantes que las lociones (Boada, 2004, Peña, 2007).

**Los geles son** preparaciones semisólidas que al contacto con la piel presentan licuefacción. Se caracterizan por tener poca capacidad de penetración y son usados en fármacos de acción muy superficial entre estos se encuentran los hidrogeles, formados por agua y glicerol o propilenglicol; estos tienden a la desecación. Los lipogeles están compuestos por una base oleosa y un gelificante,

son oclusivos, de acción emoliente-lubricante, utilizados en dermatosis crónicas (Boada, 2004)

**1.1.2.3 Fármacos o sustancias activas.** Son los compuestos terapéuticos o principios activos que incorporados a las formas farmacéuticas se emplean para el tratamiento. Estos se clasifican en función de su aplicación clínica, por ejemplo, antimicóticos (clotrimazol, fluconazol), antiinflamatorios (corticoides), antimicrobianos (ácido fusídico), inmunomoduladores (imiquimod, tacrolimus), queratolíticos (ácido salicílico), hidratantes (vaselina, lanolina), entre otros (Boada, 2004, Peña, 2007, Devarajan & Ravichandran, 2011).

**1.1.3 Sistemas transdérmicos de liberación de fármacos.** Los sistemas de liberación transdérmica de fármacos representan una importante alternativa a la administración oral e inyecciones hipodérmicas, ya que evita el efecto del primer paso hepático que puede metabolizar prematuramente los fármacos. Además, los sistemas transdérmicos son no invasivos y puede ser auto-administrados, con estos se logra una liberación del fármaco durante largos períodos de tiempo (de hasta una semana), son más confortables para los pacientes y generalmente son de bajo costo. El mayor desafío para la administración transdérmica es que sólo algunos fármacos son susceptibles a la administración por esta vía. (Allevato, 2007, Prausnitz & Langer, 2008). A través del tiempo, se han desarrollado cambios en estos sistemas, los cuales han permitido mejorar las estrategias de entrega y aumentar el espectro de fármacos que pueden ser suministrados por la vía transdérmica.

Prausnitz & Langer, 2008 proponen que los avances en los sistemas transdérmicos de liberación de fármacos pueden ser categorizados en tres generaciones de desarrollo:

En la primera generación, se encuentran los parches que hasta la fecha, han estado en uso clínico. Se han logrado importantes avances en la tecnología de

parches y estos han sido comercializados con éxito ya que han tenido la aceptación del público. Estos son una buena estrategia cuando se trata de fármacos de bajo peso molecular, lipófilos y eficaces en dosis bajas, siendo su limitante cuando el fármaco no cumple con estas condiciones, además de la barrera que representa el EC a la entrada de los compuestos. (Betlloch & Silvestre, 2002, Prausnitz & Langer, 2008).

La segunda generación, enfatiza en la necesidad de modificar las propiedades de barrera de la piel, haciéndola más permeable a la entrada de los fármacos. (Williams & Barry, 2004). En esta se utilizan potenciadores de la permeación, entre los que se encuentran potenciadores químicos los cuales tienen la capacidad de alterar la estructuras de bicapa de los lípidos intracelulares del EC, o por extracción de lípidos mediante disolventes y agentes tensoactivos. Algunos de estos potenciadores de la permeación son la azona, el dimetil sulfóxido (DMSO), y el ácido oleico, entre otros. Un buen potenciador debe tener la capacidad de: Aumentar la permeabilidad de la piel mediante la interrupción reversible de la estructura del EC, proporcionar una fuerza motriz adicional para el transporte en la piel y evitar lesiones en los tejidos vivos. (Williams, 2003). Esta generación de sistemas de liberación transdérmica ha avanzado en particular, en la mejora de la liberación o entrega de pequeñas moléculas en un sitio terapéutico localizado, utilizando además otras estrategias de liberación transdérmica como Liposomas, dendrímeros y microemulsiones; estos se han utilizado como potenciadores con estructura supramolecular, los cuales además de aumentar la permeabilidad, aumentan la solubilidad del fármaco en la formulación y la partición en la piel (Sáez *et al.*, 2004, Prausnitz & Langer, 2008, ).

La tercera generación de sistemas de administración transdérmica ha causado un impacto significativo en la administración de fármacos dirigidos hacia el EC. Esta permite una interrupción en la estructura de barrera del EC, haciendo más efectiva la permeación transdérmica, al tiempo que protege los tejidos más

profundos. Los potenciadores químicos novedosos, la electroporación, la cavitación ultrasónica, las microagujas, y la ablación térmica, han demostrado importantes efectos en la liberación transdérmica de proteínas y vacunas. (Prausnitz & Mitragotri, 2008, Falabella & Victoria, 2009).

## **1.2. NANOTECNOLOGÍA Y SISTEMAS DE LIBERACIÓN DE FÁRMACOS.**

**1.2.1 Generalidades.** La nanotecnología puede definirse como el conjunto de tecnologías que tienen como objetivo el aprovechamiento de las características peculiares que tiene la materia cuando es reducida o estructurada a dimensiones nanométricas; comprende entonces el estudio, diseño, creación, síntesis, manipulación y aplicación de materiales y sistemas funcionales mediante el control de los fenómenos y propiedades de la materia a nanoescala (Finardi, 2011). Las nano-ciencias se sitúan en el origen de la nanotecnología, éstas comprenden las actividades científicas que tienen como objetivo descubrir, describir y definir las propiedades de la materia nanoestructurada (Finardi, 2011), aprovechándola para crear materiales y sistemas novedosos y poco costosos con propiedades únicas. La nanotecnología utiliza técnicas en las cuales se manipulan átomos y moléculas que dan lugar a la formación de nanoestructuras artificiales del tamaño de las biomoléculas, lo que garantiza que estas estructuras pueden interactuar con las células (Speiser, 1991). Dado lo anterior, la nanomedicina ofrece grandes alternativas en diagnóstico, tratamientos, y medicina regenerativa, actuando y estimulando los propios mecanismos controladores y reparadores del cuerpo humano (González *et al.*, 2006).

Mediante la nanoterapia, se consigue entonces orientar las moléculas del fármaco de forma específica y directa a los tejidos enfermos, reduciendo la cantidad de efectos no deseados encontrados con la terapia convencional (Santos-Magalhaães *et al.*, 2000). La condición fisiopatológica y anatómica de los tejidos

enfermos o inflamados ofrece grandes ventajas para la entrega de fármacos mediante el uso de sistemas de liberación de fármacos. La focalización de fármacos puede llevarse a cabo aprovechando las características fisiopatológicas de los distintos tejidos enfermos. Las diferencias anatómicas y fisiológicas entre los tejidos normales y enfermos, contribuyen a lograr la especificidad de sitio y suministro dirigido de fármacos. El aumento de la permeabilidad vascular, acoplado con el drenaje linfático en los tejidos tumorales, permite un aumento de la permeabilidad y del efecto de retención de los nanosistemas en los tumores o tejidos inflamados (Matsumura *et al.*, 1986, Maeda *et al.*, 2000), permitiendo la extravasación de los nanosistemas y su selectiva localización en los tejidos dañados (Allen *et al.*, 2004). Un sistema de liberación ideal debe permitir que el fármaco se acumule en concentraciones apropiadas en el sitio blanco conservando su eficacia terapéutica.

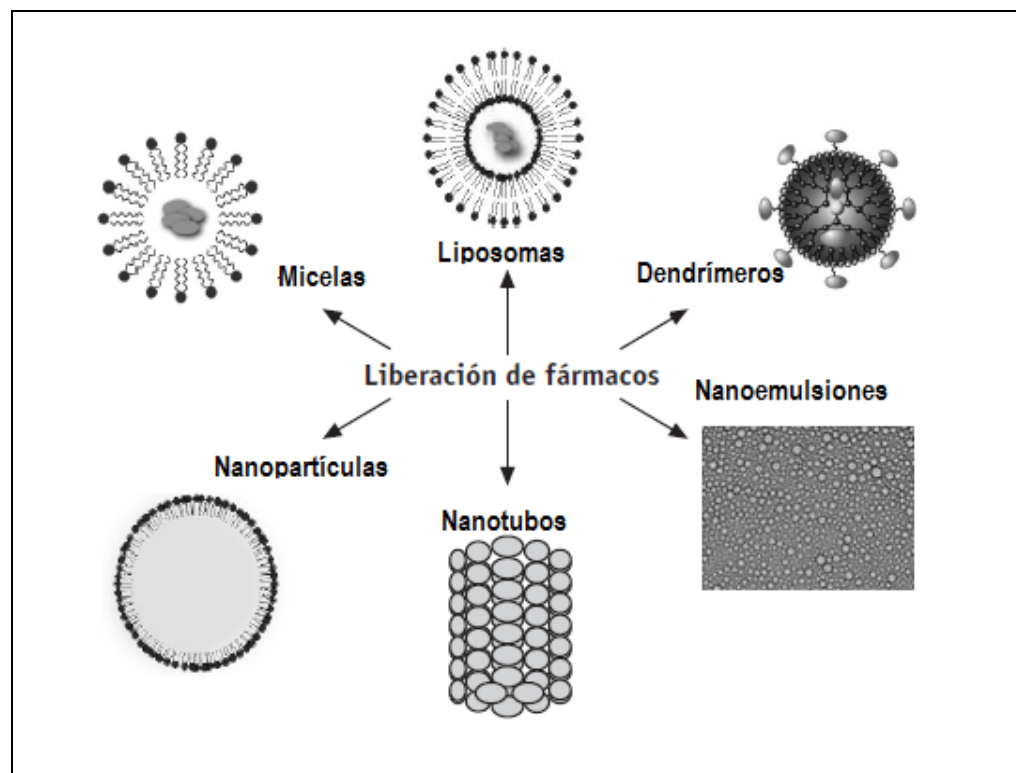
**1.2.2 Sistemas de liberación de fármacos.** El principal propósito de la nanotecnología aplicada a la farmacéutica es el diseño de sistemas miniaturizados para ser utilizados como transportadores de fármacos, que tengan una estabilidad adecuada, que brinden una mejor absorción, que permitan una liberación controlada, proporcionando unos niveles deseados del fármaco en el sitio de acción, llevando esto a la actividad farmacodinámica esperada (Speiser, 1991). Los sistemas de liberación de fármacos fueron diseñados como estrategia para trasladar de forma directa y efectiva los compuestos o principios activos al blanco terapéutico. Estos sistemas están formados por un fármaco y un sistema transportador o vehículo, que dirigen la liberación del fármaco al sitio adecuado y en la cantidad apropiada; además hacen que la efectividad del medicamento se vea incrementada ya que es posible hacer un control preciso de la dosis requerida y del tamaño, la morfología y las propiedades superficiales del compuesto. Las nanopartículas, al ser liberadas de forma específica en los tejidos blanco, disminuyen la toxicidad asociada al fármaco. Al ser posible la liberación paulatina

del fármaco de acuerdo con las necesidades terapéuticas, se consigue disminuir los efectos adversos de la administración sistémica. (González *et al.*, 2006).

Estos sistemas de liberación de fármacos se diferencian en su composición (química, propiedades fisicoquímicas) y estructura, pero tienen en común que cumplen con los objetivos de: transportar fármacos de manera específica y controlada, evitar problemas relacionados con la solubilidad del fármaco, y proporcionar alternativas a las vías de administración tradicionales, mucho más invasivas (COTEC, 2006).

A continuación se presentan algunos de los sistemas de liberación de fármacos más utilizados, la Figura 1 muestra la representación esquemática de los sistemas de liberación de fármacos que serán descritos más adelante.

**Figura 1.** Sistemas de liberación de fármacos.



Modificado de González *et al.*, 2006.

**Nanoemulsiones:** Son dispersiones de aceite y agua en las cuales la fase dispersa está formada por gotas de la sustancia activa en nanoescala (Constantinides *et al.*, 2008). Son estabilizadas en la superficie con una cubierta de surfactante y co-surfactante como Sefsol ® 218, Tween ® 80, Tween ® 85 y solución salina, agua como agente tensioactivo, el cotensioactivo y la fase acuosa (Ahmed *et al.*, 2008). Son buenos vehículos de suministro de fármacos para la administración transdérmica y dérmica. El tamaño de partícula y las propiedades de superficie de las nanoemulsiones juega un papel importante en el comportamiento biológico de la formulación (Shakeel *et al.*, 2012)

Las nanoemulsiones poseen muchos atractivos biológicos y propiedades farmacéuticas tales como biodegradabilidad, biocompatibilidad, estabilidad física y facilidad de producción. Por lo tanto, han sido utilizados como vehículos para fármacos lipófilos, para la estabilización de compuestos susceptibles a la hidrólisis, y para la reducción de la irritación o toxicidad del fármaco.

**Micelas:** Son agregados moleculares en forma de esfera, se encuentran compuestos por moléculas que tienen una parte hidrófila y otra hidrofóba. En medio acuoso, las partes apolares tendrán la tendencia a protegerse del agua y formarán una estructura esférica con un núcleo hidrofóbico y una parte exterior hidrófila. Este tipo de estructuras tiene un tamaño aproximado de 50 nm, se utilizan para el transporte y liberación de fármacos que no son solubles en agua. Los fármacos quedan encerrados en el interior de la micela, protegidos en el núcleo apolar de la misma. (COTEC, 2006, González *et al.*, 2006).

**Liposomas:** son vesículas esféricas compuestas por bicapas paralelas de fosfolípidos. Tienen la propiedad de adoptar de forma espontánea la configuración en bicapas cuando se encuentran en un medio acuoso, debido que son moléculas anfipáticas, es decir, tienen un extremo hidrofílico que se orienta hacia la fase acuosa y un extremo hidrofóbico que rechaza la fase acuosa y se orienta hacia el interior de la bicapa. (González *et al.*, 2006, Clavijo *et al.*, 2008). Pueden ser

producidos a partir de fosfolípidos naturales no tóxicos y colesterol (Sahoo *et al.*, 2003). Son particularmente útiles como dispositivos de terapia génica debido a su capacidad de pasar a través de las bicapas lipídicas y membranas celulares; varios grupos han informado resultados satisfactorios después de la entrega local (Hart, 2005, Ewert *et al.*, 2005). Son los más estudiados y clínicamente reconocidos nanotransportadores debido a su larga trayectoria, baja toxicidad y capacidad para proporcionar el transporte de moléculas hidrófilas y lipófilas (Costantino *et al.*, 2009); por lo tanto, son útiles en la entrega de fármacos antifúngicos, compuestos quimioterapéuticos, antirretrovirales, anti-epilépticos, entre otros.

**Dendrímeros:** Son moléculas poliméricas esféricas, son altamente ramificadas, poseen un núcleo central (en algunos casos  $\text{NH}_3$ ) y capas alternantes de monómeros, generalmente ácido crílico y etilendiamina. Son muy buenos vehículos para el transporte de genes y fármacos, además de otras aplicaciones como catálisis a nanoescala, sensores químicos, micelas unimoleculares, imitación de la función de las enzimas (COTEC, 2006, Clavijo *et al.*, 2008).

**Nanopartículas:** Son partículas esféricas poliméricas, dentro de estas se incluyen nanocápsulas y las nanoesferas. Las nanocápsulas son sistemas vesiculares en los que el fármaco está confinado en una cavidad rodeada de una única membrana polimérica, son vehículos eficaces para antibióticos y vacunas, dada su biodegradabilidad y biocompatibilidad; las nanoesferas son sistemas matrices en los que el fármaco aparece disperso en la partícula (González *et al.*, 2006, Clavijo *et al.*, 2008).

**Nanotubos de carbono:** Son estructuras cilíndricas compuestas por una o varias capas de grafito u otro material de carbono enrolladas sobre sí mismas. Los nanotubos de carbono pueden ser funcionalizados con péptidos bioactivos, proteínas, ácidos nucleicos o fármacos, y pueden liberar su carga de manera

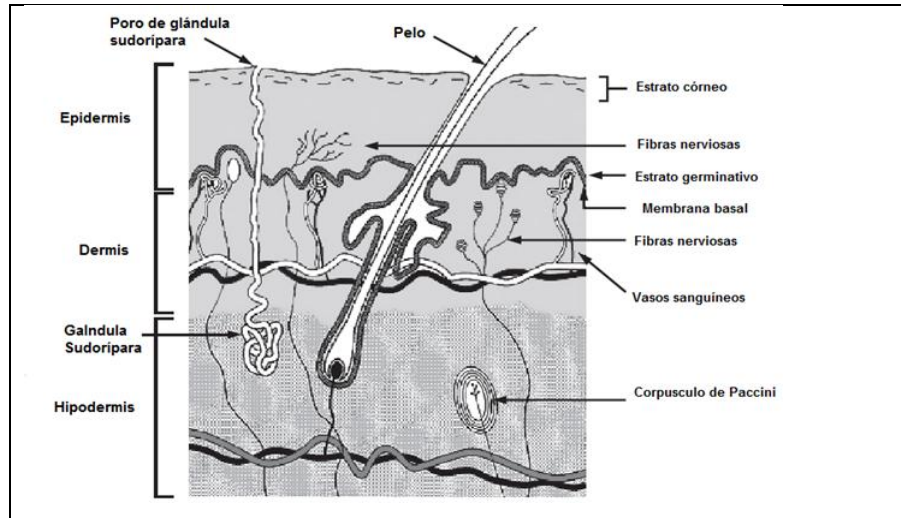
específica en células diana (Tamborero & Vincent 2006). Muestran una baja toxicidad y no son inmunogénicos lo que les convierte en buenos sistemas de liberación de fármacos (COTEC, 2006).

### **1.3. LA PIEL**

La piel es el órgano más extenso del cuerpo humano, constituye el 10% de la masa corporal total. Además de ofrecer una cubierta, tiene importantes funciones como protección contra lesiones, invasión de microorganismos y desecación; regulación de la temperatura corporal, recepción de sensaciones provenientes del ambiente, excreción de sustancias a través de las glándulas sudoríparas y absorción de las radiaciones UV para la síntesis de vitamina D (Gartner & Hiatt, 2004).

La piel está conformada por dos capas, la externa llamada epidermis, que está compuesta por epitelio escamoso queratinizado derivado del ectodermo y la dermis, conformada por tejido conectivo colagenoso denso irregular, derivada del mesodermo, que se encuentra directamente por debajo, interdigitándose con la epidermis. Por debajo de la piel se encuentra la hipodermis, capa de tejido conectivo laxo que contiene diversas cantidades de grasa (Gartner & Hiatt, 2004; WHO, 2006). Ver Figura 2.

**Figura 2.** Esquema estructural de la piel.



Adaptado de WHO, 2006.

**1.3.1 Capas de la piel y sus componentes.** La epidermis, comprende aproximadamente un 5% del grosor total de la piel. Tiene un espesor de 0,07 a 0,12 mm en la mayor parte del cuerpo, siendo de mayor grosor en plantas y palmas (Gardner & Hiatt, 2004). El epitelio escamoso estratificado de la piel está conformado por queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel. La epidermis está constituida, desde su parte más profunda, por el estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, estrato lúcido y estrato córneo que es la capa más superficial (Gardner & Hiatt, 2004; WHO, 2006, Junqueira & Carneiro, 2000).

El estrato basal, también llamado capa germinativa, se caracteriza por presentar una alta actividad mitótica, siendo responsable de la constante renovación de la epidermis.

El estrato espinoso está compuesto por células ligeramente aplanadas, con núcleo central y pequeñas expansiones citoplasmáticas, unidas por desmosomas que dan a las células un aspecto espinoso, cuya función es el mantenimiento de la

cohesión de las células de la epidermis y su resistencia al rozamiento (Junqueira & Carneiro, 2000).

En el estrato granuloso se encuentran células poligonales achatadas con núcleo central, en su citoplasma se encuentran gránulos basófilos gruesos de queratohialina que contribuyen a impermeabilizar el estrato granuloso contra el agua y otras moléculas (Gardner & Hiatt, 2004; WHO, 2006, Junqueira & Carneiro, 2000).

El estrato lucido, está compuesto de una fina capa de células aplanadas, hialinas, cuyos núcleos serán degradados por enzimas lisosomales. El citoplasma posee filamentos compactos y rodeados de material electrodensso (Gardner & Hiatt, 2004; Junqueira & Carneiro, 2000).

El EC, está conformado por corneocitos, son células muertas, sin núcleo, aplanadas; su citoplasma está repleto de queratina. El espesor del EC es variable dependiendo del sitio anatómico. (Gardner & Hiatt, 2004; Junqueira & Carneiro, 2000). Los lípidos presentes en el EC corresponden a ceramidas (45-50%), colesterol (25%) y ácidos grasos de cadena larga (15%), y el 10% restante corresponde a otros lípidos entre los que se encuentran esteres de colesterol y glucosilceramidas (WHO, 2006).

Los melanocitos tienen su origen en el ectodermo. Se encuentran normalmente en el estrato basal y el espinoso, son las células encargadas de producir la melanina, un pigmento de color marrón oscuro que da el color a la piel. Una vez producidos los gránulos de melanina, emigran al interior de las células epiteliales, donde se ubican alrededor del núcleo para proteger el ADN de la radiación UV (Junqueira & Carneiro, 2000).

Las células de Langerhans proceden de la médula ósea, colonizan el epitelio epidérmico y los otros epitelios estratificados del cuerpo humano. Se encuentran en toda la epidermis, pero principalmente en el estrato espinoso, se caracterizan por sus numerosas prolongaciones; fagocitan y desintegran antígenos extraños. Son células presentadoras de antígenos (Gardner & Hiatt, 2004).

Las células de Merkel se encuentran intercaladas entre los queratinocitos del estrato basal de la epidermis, abundan en la piel gruesa de la palma de la mano y la planta del pie, en su base, se observan terminaciones nerviosas sin vesículas sinápticas (Gardner & Hiatt, 2004; Junqueira & Carneiro, 2000).

La dermis está dividida en dermis reticular y dermis papilar. Proporciona el soporte nutricional a la epidermis avascular. La superficie externa de la dermis es muy irregular, y acompaña los entrantes correspondientes a la epidermis, que se conocen como papilas dérmicas. Estas papilas aumentan en la zona de contacto dermis-epidermis, confiriéndole mayor resistencia a la piel (Junqueira & Carneiro, 2000). Esta resistencia está dada por la composición de la dermis que es principalmente, una matriz proteica, colágeno, elastina, embebidos en una abundante sustancia coloidal. En la dermis encontramos también vasos sanguíneos, terminaciones nerviosas y conductos linfáticos, además de segmentos de glándulas sudoríparas y unidades pilosebáceas (Gardner & Hiatt, 2004; Junqueira & Carneiro, 2000, WHO, 2006).

La piel posee además estructuras conocidas como apéndices, entre las que se encuentran los folículos pilosos, glándulas sebáceas, sudoríparas, etc. Estos varían en cantidad dependiendo del sitio anatómico y ayudan a la piel en las funciones de protección, respiración, y excreción.

**1.3.2 El estrato córneo como principal barrera de la piel.** El EC es la principal estructura biológica que protege al cuerpo de la agresión externa (Kogan *et al.*, 2006). A continuación se describen los principales componentes bioquímicos del EC.

**Proteínas.** El interior de los corneocitos se encuentra formado por filamentos de queratina, ricos en puentes disulfuro. La filagrina, también llamada proteína rica en histidina o proteína básica del EC, asegura la conexión de los filamentos de queratina. La profilagrina, constituye los gránulos de querato-hialina y es precursor de la filagrina (Jamouille *et al.*, 1993). En el proceso de diferenciación final del EC, se producen ciertas reacciones enzimáticas, de las cuales se obtienen como producto final, aminoácidos y péptidos que son liberados en la parte más externa del EC, y juegan un papel muy importante en la hidratación, ayudando a mantener sus propiedades de barrera y depósito, importantes para controlar la penetración de sustancias exógenas. Los corneocitos poseen una cubierta reticulada muy resistente a la acción química de los surfactantes. La red de proteínas se encuentra sostenida por enlaces covalentes y lípidos.

**Lípidos.** El espacio intercelular del EC se encuentra conformado en un 80% de lípidos. Un 45% corresponde a ceramidas, 25% colesterol, 25% ácidos grasos libres, y un 5% correspondiente a glucolípidos, colesterol sulfato y triglicéridos. (WHO, 2006). Esta mezcla de lípidos es muy importante en la cohesión de los corneocitos y por lo tanto en las propiedades de barrera del EC. Estudios moleculares de la estructura lipídica de la piel, han evidenciado el grado de asociación de lípidos y las proteínas por enlaces covalentes, mostrando que los lípidos son menos sensibles a la extracción por solventes. Una importante fracción de los lípidos de la piel no se encuentra unida a las proteínas, por consiguiente, estos lípidos son más susceptibles a la extracción por solventes como acetona y cloroformo, produciendo cambios importantes en la permeabilidad de la piel. (Jamouille *et al.*, 1993, Kogan *et al.*, 2006). Se han descrito variaciones en la

permeabilidad de la piel, dependiendo del sitio anatómico, todo esto relacionado con la composición lipídica y espesor del EC.

Estudios demuestran que la barrera lipídica del EC a la penetración de agua está determinada más por la organización estructural de los lípidos y no por la estructura individual de las especies de lípidos que lo conforman. (Jamouille *et al.*, 1993).

**Agua y constituyentes minerales.** A nivel tridimensional el EC demuestra una estructura compleja, teniendo en cuenta la presencia de agua y su asociación con lípidos, creando estructuras similares a liposomas multilamelares en el espacio intercelular, posibilitando que una formulación tópica pueda difundirse a través de estas estructuras hasta alcanzar las capas más profundas de la piel. (Jamouille *et al.*, 1993). El contenido de agua y el pH del EC, influyen sus características eléctricas (conductividad), posibilitando entonces la difusión de moléculas cargadas. Esto es particularmente relevante, cuando se trata de la penetración de moléculas en la piel, aplicando diferentes potenciales eléctricos, como es el caso de la iontoforesis. (Jamouille *et al.*, 1993, WHO, 2006).

**1.3.3. Variaciones en la estructura de barrera del EC.** Las variaciones en la estructura de barrera del EC, pueden ser ocasionadas por factores externos o ser inherentes a condiciones fisiológicas, a continuación se enumeran algunas de estas.

**Daño artificial del estrato corneo:** el EC es inespecíficamente dañado o removido, mediante un *stripping*, observándose incremento en la penetración a capas profundas de la piel. (WHO, 2010).

**Edad:** la piel de los recién nacidos y niños, es más permeable que la piel adulta.

**Enfermedad:** las alteraciones en la piel producen cambios en su estructura, alterando sus propiedades de barrera. Esto ha sido observado en quemaduras solares, irritación mecánica, infecciones, condiciones causadas por procesos patológicos endógenos. En algunas prescripciones dermatológicas, el tipo y frecuencia de lavado de la piel, puede modificar la permeabilidad y la penetración de formulaciones tópicas (Ramos-e-Silva & Moura-Castro, 2012).

**Sitio anatómico:** El EC tiene un grosor variable dependiendo del sitio anatómico, (Gartner & Hiatt, 2004); lo que conduce a que haya diferencias en la penetración de sustancias en estos sitios. Esto fue demostrado por Rougier *et al* 1988, al realizar ensayos de penetración en piel de cadáver de diferentes sitios anatómicos, antes de realizar los ensayos se hicieron biopsias de la piel para establecer el espesor del EC. Estableció entonces, un orden decreciente de permeabilidad desde: región pos-auricular, escroto, abdomen, cuero cabelludo, antebrazo y plantas.

**Hidratación del estrato córneo:** es uno de los factores más importantes en la absorción percutánea. Bajo oclusión, el contenido de agua y la permeabilidad del EC aumentan (Jamouille *et al.*, 1993).

## **1.4. ABSORCIÓN TRANSDÉRMICA**

**1.4.1 Generalidades.** La absorción dérmica describe el transporte de fármacos o químicos, desde la superficie exterior de la piel hacia la circulación sistémica. Este término involucra los conceptos de penetración, permeación y resorción.

La penetración, es la entrada de una sustancia en una determinada capa o estructura, como la entrada de un compuesto en el estrato córneo.

La permeación, es la penetración a través de una capa en una segunda capa, que es tanto funcional como estructuralmente diferente a la primera.

La resorción, se define como la entrada de una sustancia en la circulación sanguínea y linfática local de la piel, que en la mayoría de los casos dará lugar a entrada en la circulación sistémica. (WHO, 2006).

**1.4.2 Aspectos teóricos de la absorción transdérmica.** La permeación de compuestos a través del EC es un proceso que se lleva a cabo por difusión pasiva. (WHO, 2006). El paso de moléculas desde el exterior hasta el interior de la piel y la sangre, está gobernada por las leyes de difusión de Fick. (Jamouille *et al.*, 1993; WHO, 2006, Primo *et al.*, 2007).

Aplicando la primera ley de Fick, la piel puede ser considerada como una compleja membrana donde el flujo (tasa de transferencia por unidad de área) de un compuesto (**J**, masa/cm<sup>2</sup> por segundo) en un momento dado, y la posición es proporcional al cambio de concentración diferencial **dc** durante una distancia diferencial **dx** (gradiente de concentración **dc / dx**); es decir un gradiente de concentración en función del tiempo.

$$J = D \cdot dc/dx$$

Durante la difusión de una sustancia en el EC, el gradiente de concentración en el área de distribución disminuye. Este gradiente es definido por la segunda ley de Fick:

$$dc/dt = D(d^2c/dx^2)$$

Después de la transformación matemática, se encuentra que la cantidad de sustancia difundiendo sobre el sitio de aplicación de una distancia **d** es proporcional a la raíz cuadrada del tiempo de difusión. Estos hallazgos demuestran que la velocidad de penetración disminuye durante la difusión de una sustancia en el EC. No obstante, en distancias muy cortas, la difusión (y el

coeficiente de difusión) pueden ser consideradas constantes. Adicionalmente, la relación entre la concentración del fármaco en la formulación y la superficie de la piel es una función de  $K_m$ , el coeficiente de distribución entre el vehículo y la membrana.

Si la diferencia en la concentración en la parte superior e inferior de la membrana se configura como  $\Delta C$ , y el grosor de la membrana como  $d$ , la ecuación, se formula de la siguiente manera:

$$J = K_m \cdot D \cdot C / d = K_p \cdot \Delta C$$
$$K_p = K_m \cdot D / d$$

Donde  $J$  es el flujo del fármaco;  $K_m$ , coeficiente de distribución vehículo/membrana;  $D$ , Coeficiente de difusión;  $\Delta C$ , diferencia de concentración en la parte superior e inferior de la membrana;  $d$ , grosor de la membrana;  $K_p$ , coeficiente de permeabilidad (Jamouille *et al.*, 1993, WHO, 2006; Florence *et al.*, 2003).

**1.4.3 Factores que afectan la absorción transdérmica.** La absorción transdérmica de una formulación está influenciada por tres factores principales: la movilidad del fármaco en el vehículo, la liberación del fármaco del vehículo y la permeación del fármaco a través de la piel (Kogan *et al*, 2006). Entre los mecanismos posibles para mejorar la penetración del fármaco en la piel se incluyen afectar directamente la piel o modificar la formulación de modo que la partición, difusión, o la solubilidad sean alteradas. A continuación, se hará breve mención a estos mecanismos, los cuales se encuentran estrechamente relacionados entre sí (Kogan *et al*, 2006).

**Causando un efecto directo en la piel.** Puede darse por medio de la desnaturalización de la queratina intercelular o modificación en su conformación,

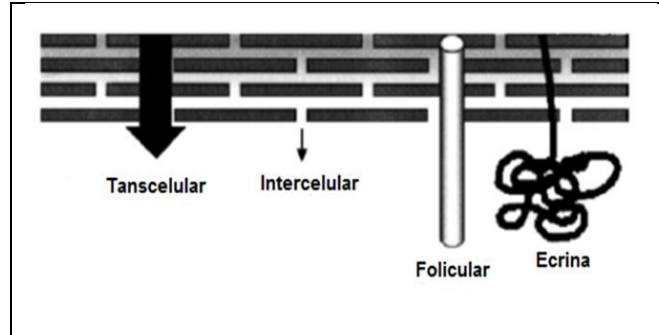
produciendo hinchazón e incremento en la hidratación; afectando los desmosomas, modificando las bicapas lipídicas, utilizando un solvente que pueda extraer lípidos del estrato corneo y disminuir la resistencia a la penetración.

**Modificando la formulación.** Produciendo un estado de supersaturación, con un solvente volátil que lleva a la sustancia activa, a un estado termodinámicamente más activo; utilizando en el vehículo, sustancias promotoras, que sean buenas solventes para el ingrediente activo, y que promuevan la permeación a través de la capas de la piel; facilitando la difusión del ingrediente activo a través de la piel mediante el uso de promotores que den lugar a la formación de retención de líquidos entre las bicapas como el ácido oleico, o que causen disrupción en la uniformidad de las bicapas, como la azona, que actúa como surfactante y como potenciador del transporte a través de la piel. (Karande *et al.*, 2005)

**1.4.4 Vías de entrada de los fármacos a la piel.** La permeación de fármacos a través de la piel puede darse por las vías transcelular, intercelular y por medio de los apéndices cutáneos (Kogan *et al.*, 2006). En la vía transcelular, el fármaco es transferido a través del paquete de queratina de los corneocitos, dentro y fuera de la membrana celular; en la vía intercelular, el fármaco es transferido alrededor de los corneocitos en las regiones extracelulares ricas en lípidos y en la absorción por los apéndices, el fármaco entra en las derivaciones de los folículos pilosos, glándulas sudoríparas y glándulas sebáceas. Dado que los apéndices ocupan una pequeña área de superficie, este medio de permeación es uno de los menos significativos.

La Figura 3 muestra las posibles vías de permeación de fármacos a través de la piel (Kogan *et al.*, 2006).

**Figura 3.** Rutas de permeación de un fármaco a través de la piel.



Tomado de Kogan *et al.*, 2006.

**1.4.5 Evaluación de la permeación transdérmica.** Los ensayos de permeación transdérmica *in vitro*, están encaminados a valorar la penetración de un compuesto aplicado en la piel. (Kreilgaard, 2002; Primo *et al.*, 2007; Santoyo *et al.*, 2001). Se realiza con el fin de establecer los cambios en la concentración del fármaco que se encuentra difundiendo a través de las capas de la piel en función del tiempo. La permeación a través del EC es la etapa limitante de velocidad para la absorción percutánea; esta depende de factores específicos, como el peso molecular del compuesto, y la formulación o vehículo en el que el compuesto esté incorporado. Las propiedades de permeabilidad del EC no se modifican después de la escisión del cuerpo (WHO, 2006). Un método muy empleado para valorar la permeación transdérmica de fármacos *in vitro*, es el método de las celdas de difusión Franz, que se describirá en detalle en el numeral 3.3.2 de la metodología.

## 1.5. LEISHMANIASIS.

**1.5.1 Generalidades.** La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por protozoos del genero *Leishmania*, pertenecen a la familia Tripanosomatidae, y

son transmitidos al hombre por la picadura de insectos infectados del genero *Phlebotomus* (en el Viejo Mundo) y *Lutzomya* (en el Nuevo Mundo) (Reithinger *et al.*, 2007).

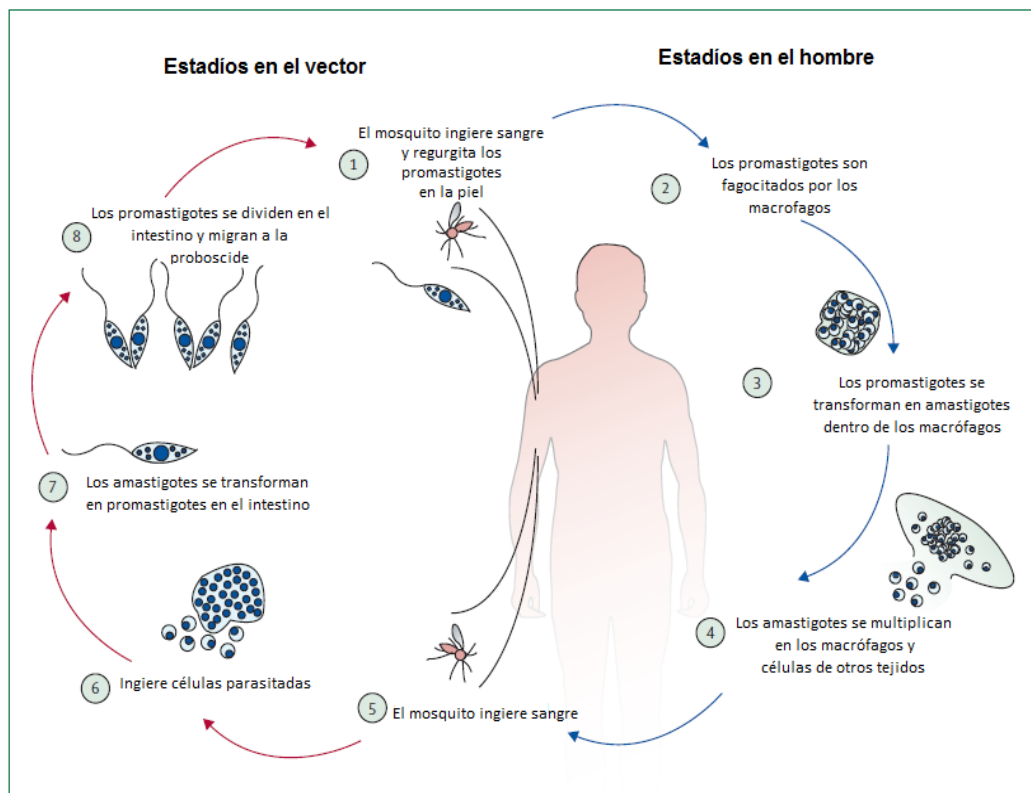
De acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (OMS, 2006), la leishmaniasis es endémica en las regiones tropicales y subtropicales de 88 países en 4 continentes. Se calcula una prevalencia mundial de 20 millones de casos y se cree que la incidencia anual oscila entre 1,5 - 2 millones de nuevos casos para LC y 500.000 nuevos casos para la leishmaniasis visceral (OMS, 2009). En Colombia, en la década de los 90 se notificaron alrededor de 6500 casos nuevos, y en los años 2005 y 2006, esta cifra superó los 20.000 casos nuevos (Informe Sivigila 2010).

La leishmaniasis producen un espectro de manifestaciones clínicas que van desde las formas tegumentarias que incluyen la leishmaniasis cutánea (LC), caracterizada por la presencia de lesiones ulcerativas en piel, que en ocasiones curan de manera espontánea; la leishmaniasis cutánea difusa (LCD), que se presenta en pacientes que tienen alteraciones de la respuesta inmune celular, produciendo unas lesiones similares a las de la lepra lepromatosa; y la leishmaniasis mucocutánea (LMC), que afecta la mucosa oral, nasal y faríngea, y en algunos casos ocasiona mutilaciones faciales. La leishmaniasis visceral (LV), también llamada Kala Azar, que se caracteriza por invasión a los órganos del sistema retículo endotelial, produciendo esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatías y anemia, entre otros (Desjeux, 2004).

**1.5.2 Ciclo de vida de *Leishmania*.** Como se muestra en la Figura 4, el vector infectado, cuando se alimenta de la sangre del hospedero vertebrado, regurgita los promastigotes metacíclicos (que es la forma infectante para el mamífero) y los inocula en la dermis, donde son fagocitados por células del sistema mononuclear fagocítico. En estas células, se forma una vacuola, donde el parásito se diferencia a la forma de amastigote y se reproduce por fisión binaria. La célula puede

explotar y los parásitos pueden invadir otras células o ir a órganos dependiendo de la especie de *Leishmania*. El ciclo continúa cuando un vector hembra succiona la sangre de un hospedero vertebrado infectado, los amastigotes van al tubo digestivo, se diferencian en formas de promastigote procíclico, se multiplican por fisión binaria, se diferencian a promastigotes metacíclicos, para continuar nuevamente el ciclo (Courret *et al.*, 2002).

**Figura 4.** Ciclo de vida de *Leishmania*.



Basado en el gráfico de Reithinger *et al.*, 2007.

**1.5.3 Leishmaniasis cutánea.** Es la forma clínica más frecuente en nuestro país, según informe del Instituto Nacional de Salud (INS, 2010). Se reconocen alrededor de 14 especies de *Leishmania* de los subgéneros *Leishmania* y *Viannia*,

responsables de LC en el Nuevo Mundo (Ferreira *et al.*, 2004). La Tabla 2 resume las especies de *Leishmania* implicadas en la LC en el hombre.

**Tabla 2.** Especies de *Leishmania* implicadas en la LC en el hombre.

<b>Ubicación</b>	<b>Especie</b>
<i>Leishmaniasis cutánea</i> Viejo mundo	<i>L. major</i> <i>L. tropica</i>
<i>Leishmaniasis cutánea</i> Nuevo mundo	Complejo <i>L. mexicana</i> . Subgéneros: <i>L. mexicana</i> <i>L. amazonensis</i> <i>L. venezuelensis</i>
<i>Leishmaniasis cutánea / mucocutánea</i> Viejo mundo	<i>L. aethiopica</i> Complejo <i>L. donovani</i> <i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i>
<i>Leishmaniasis cutánea / mucocutánea</i> Nuevo mundo	Complejo <i>L. braziliensis</i> Subgenero <i>Viannia</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. colombiensis</i> <i>L. guyanensis</i> <i>L. panamenssis</i> <i>L. peruviana</i> Complejo <i>L. donovani</i> <i>L. infantum chagasi</i>

Modificado de Ameen, 2010.

**1.5.3.1 Clínica e histopatología de la LC.** Luego de un periodo de incubación que va de 2 semanas a 2 meses, se presenta en la piel una lesión papuloeritematosa indurada, que aumenta de tamaño y luego de varios días puede ulcerarse o formar una placa, luego se cubre de un líquido amarillo formando una costra. Pueden aparecer lesiones satélites. Se presenta principalmente en partes expuestas como brazos, piernas y cara. Evoluciona crónicamente, aumentando en tamaño y profundidad.

La LC es una enfermedad con diferentes manifestaciones clínicas (Silveira *et al.*, 2004), donde las úlceras representan más del 90% de estas manifestaciones. En un número menor de pacientes, otras formas clínicas pueden presentarse como las lesiones verrucosas, lesiones vegetativas, pápulas y nódulos.

Algunas lesiones curan de forma espontánea dejando cicatrices visibles, pero la mayoría de las lesiones tienen un curso crónico de meses o años.

La respuesta del hospedero contra la *Leishmania* se caracteriza por un marcado desarrollo de la inmunidad celular y baja respuesta de anticuerpos circulantes.

A nivel histológico, puede observarse en la etapa inicial, un infiltrado dérmico denso y difuso, compuesto principalmente por histiocitos, linfocitos y células plasmáticas. Se encuentran también neutrófilos y eosinófilos en menor cantidad (García-Almagro, 2004.; Silveira *et al.*, 2004., Oliveira Cardoso *et al.*, 2010).

Pueden observarse amastigotes dentro de los macrófagos y también en el espacio extracelular. Conforme avanza la lesión, se van formando granulomas epitelioides inicialmente en la dermis superior, y que pueden luego ocupar toda la dermis. Pueden verse células de Langerhans. La epidermis suele presentar hiperqueratosis y acantosis, ocasionalmente se observa paraqueratosis y atrofia. Puede producirse degeneración hidrópica de la capa basal (García-Almagro, 2004., Oliveira Cardoso *et al.*, 2010).

En lesiones que llevan más tiempo de evolución, el componente granulomatoso se hace más predominante y hay más células plasmáticas. En estos casos los amastigotes son más difíciles de encontrar (García-Almagro, 2004).

**1.5.3.2 Diagnóstico de la LC.** Según la Guía de atención de la Leishmaniasis, del Ministerio de la Protección Social, 2008; el examen directo de las lesiones

coloreado con Giemsa o Wright es un método rápido, económico y de fácil realización en centros de salud de nivel de atención básico. La sensibilidad de este método es variable de acuerdo al tiempo de evolución de la lesión. La sensibilidad del examen directo es de 85% a 90% en pacientes cuya enfermedad no supere los cuatro meses de evolución. (Zerpa *et al.*, 2002). Se recomienda la toma de más de una muestra de una misma lesión, como mínimo tres preparaciones tanto del borde activo como del centro de la ulcera, lo cual aumenta la sensibilidad de este método.

La biopsia de piel se realiza luego de que dos exámenes directos, cada uno con tres tomas, han arrojado un resultado negativo. Se realiza para establecer un diagnóstico concluyente al demostrar los parásitos, realizar diagnóstico diferencial, sugerir diagnóstico de leishmaniasis, aun si los organismos no son demostrables por microscopía.

Otros métodos diagnósticos para la LC son la PCR, el cultivo, la intrademostración, y métodos serológicos como la inmunofluorescencia indirecta y la ELISA. (Botero & Restrepo, 2005).

El amplio espectro de las manifestaciones clínicas de la LC, hacen que su diagnóstico sea difícil, siendo necesario hacer un diagnóstico diferencial. La Tabla 3 describe algunas de las entidades clínicas que cursan con lesiones cutáneas similares a la LC.

**Tabla 3.** Diagnóstico diferencial de la LC.

<b>TIPO DE LESIONES</b>	<b>CAUSAS</b>
<b>Ulcerosas</b>	Úlceras traumáticas, vasculares y piógenas. Esporotricosis fija y linfangítica Paracoccidioidomicosis, TBC cutánea Úlceras por micobacterias atípicas, pioderma gangrenoso, tumores malignos ulcerados
<b>Papulosas nodulares o en placa.</b>	Picaduras de insecto con formación de granuloma, Lepra, sarcoidosis, psoriasis
<b>Verrucosas</b>	Cromomicosis, tuberculosis verrugosa, histoplasmosis, lobomicosis, carcinomas espinocelulares
<b>Formas linfangíticas</b>	Esporotricosis, úlceras por micobacterias típicas.

Guía de atención de la Leishmaniasis, Ministerio de la Protección Social, 2008.

**1.5.3.3 Tratamiento de la LC.** El tratamiento sistémico de la leishmaniasis se ha realizado con los antimoniales pentavalentes (Glucantime® o Pentostam®). En los últimos 30 años la dosis se ha ido aumentando para mantener su eficacia (Soto & Soto 2006). Otros fármacos usados cuando no es posible administrar los antimoniales o cuando estos han fallado son: la anfotericina B (Fungizone®), el isotianato de pentamidina (Pentacarinat®), formulaciones lipídicas de anfotericina B y miltefosine (Ameen, 2010. Soto & Soto 2006., Croft *et al.*,2006).

Entre las limitaciones para su uso están el costo, la toxicidad, dolor en el sitio de aplicación, variabilidad en su eficacia, en algunas ocasiones se requieren hospitalización y su uso es limitado en gestantes. En la Tabla 4 se exponen los fármacos empleados en el tratamiento de la LC.

**Tabla 4.** Fármacos empleados en el tratamiento de la LC.

<b>Fármacos de primera línea</b>	Estibogluconato de sodio (Pentostam). Antimonio de meglumine (Glucantime). Anfotericina B (Fungizone). Pentamidina. Paramomicina (Formulación tópica con metilbenzatonio o úrea).
<b>Ensayos clínicos</b>	Miltefosine (oral, Fase III registrado en Colombia). Paramomicina (Formulación tópica con gentamicina y surfactantes, Fase II). Imiquimod (Inmunomodulador tópico, Fase II) Azoles antifúngicos Ketoconazol, Fluconazol, Itraconazol.

Modificado de Croft *et al.*, 2006.

**1.5.3.4 Tratamientos tópicos en LC.** Los tratamientos tópicos para la LC son una importante alternativa porque se trata la lesión de forma localizada, evitando los efectos tóxicos de los tratamientos de la vía sistémica, además se facilita su administración, lo que contribuye a que los esquemas de tratamiento se cumplan rigurosamente y eventualmente podrían ser menos costosos. Entre las posibles terapias localizadas para la LC se encuentran los fármacos, métodos físicos, o la combinación de ambos, los cuales se expondrán a continuación. Los ungüentos o cremas de paramomicina al 15% combinados con metil benzatonio Cloruro (MBCI), han mostrado buena actividad contra LC, porque al parecer, el MBCI por si solo tiene actividad contra *Leishmania* (El-On *et al.*,1987). El inconveniente de esta formulación es la irritación e inflamación local que lleva a baja tolerancia al tratamiento; para disminuir estos efectos indeseables, se han evaluado otras formulaciones que contienen PM y úrea, donde se observa una

mayor tolerancia, pero al mismo tiempo, menor actividad contra ciertas especies de *Leishmania* (Neva *et al.*,2006., Blum *et al.*,2004, Minodier & Parola, 2006).

Están en estudio compuestos como el imiquimod y la miltefosina. El imiquimod, en las dos primeras semanas de aplicación reduce el tamaño de la lesión, pero hacia la tercera o cuarta semana de tratamiento, se observa progresión de la lesión, lo que indica que su actividad contra *Leishmania* es insuficiente. (Seeberger *et al.*, 2003). La formulación tópica con miltefosine (Miltex®) ha mostrado resultados poco satisfactorios ya que en fase inicial, se observa reducción considerable del tamaño de las lesiones, pero luego se evidencia progresión de las mismas (Soto & Soto, 2006).

La administración de antimoniales pentavalentes en el sitio de la lesión ha mostrado eficacia similar a la observada con la administración sistémica, reduce el tiempo de tratamiento, la toxicidad y los costos. Debe infiltrarse el borde de la lesión y la base, por lo tanto presenta baja tolerancia por parte del paciente, debido al dolor. (Blum *et al.*, 2004, Minodier & Parola, 2006).

La Anfotericina B (Amphocil®) en dispersión coloidal, ha mostrado buenos resultados contra *L. major*, en Israel (Minodier & Parola, 2006).

Las terapias físicas para el tratamiento localizado de la LC tienen como ventaja una buena tolerancia y bajo costo. Entre estos métodos están la crioterapia, termoterapia y la TFD (Ameen, 2010).

**La crioterapia** consiste en la destrucción de células infectadas o tumorales, por medio de la aplicación de criógenos como el nitrógeno líquido, óxido nitroso, dióxido de carbón, entre otros. Para el tratamiento de LC, puede usarse en pacientes con lesiones pequeñas, o en etapas iniciales; en las cuales se producen lesiones estructurales al parásito, provocando su muerte. En Irán, se ha reportado

curación hasta del 50% con crioterapia, y curaciones hasta del 90% con la combinación de la crioterapia y antimoniales pentavalentes, en infecciones con *L. major* y *L. tropica* (Asilian *et al.*, 2003).

**La termoterapia**, mediante un generador de ondas de radiofrecuencia controladas y localizadas, produce calor en el sitio de la lesión. Se administran temperaturas hasta de 50°C por 30 segundos. (Velasco-Castejón *et al.*,1997., Reithinger *et al.*,2007). Es un procedimiento doloroso, que en ocasiones requiere de anestesia. Se reportaron tasas de curación hasta del 90%, en LC por *L. mexicana*, después de 8 semanas de tratamiento (Navin *et al.*, 1990).

## 1.6 TERAPIA FOTODINÁMICA

La TFD, es una terapia local muy utilizada en dermatología, oncología y oftalmología (Kalka, 2000). Consiste en la administración de un FS, que al ser activado a una longitud de onda específica en presencia de oxígeno molecular, puede generar especies reactivas de oxígeno, como radicales superóxido y oxígeno singlete; que reaccionan con sustratos celulares como lípidos y proteínas, produciendo un efecto citotóxico.

El empleo de fotosensibilizadores para el tratamiento de enfermedades de la piel, se dió inicialmente en Egipto, India y Grecia, donde se utilizaron extractos de plantas que contenían psoraleno y la luz, para tratar la psoriasis y el vitiligo. (Kalka, 2000). Este concepto, se conoció inicialmente como fotoquimioterapia y fue la base para el inicio de la terapia fotodinámica.

El termino TFD, fue utilizado por primera vez por von Tappeiner en 1904 para describir las reacciones químicas que consumían oxígeno y que eran inducidas por fotosensibilización. En este sentido, la TFD es una modalidad terapéutica que

involucra la administración de un compuesto fotosensibilizador (FS) y la acumulación de moléculas sensibilizantes en la célula blanco, seguida de la irradiación selectiva de la lesión con luz visible. La acumulación de estos dos elementos no tóxicos, PS y luz, es responsable de la destrucción de tejidos, por TFD. (Kalka, 2000).

En 1900, Raab observó la muerte de un cultivo de *Paramecium caudatum*, después de la exposición a la luz, en presencia de naranja de acridina. Seguidamente, Von Tappeiner y Jesionek, reportaron el uso de eosina tópica y luz visible, en el tratamiento de tumores de piel, condilomas y lupus vulgaris, introduciendo el uso de la TFD en la clínica. En años posteriores, fueron reveladas las propiedades de las porfirinas para localizar tumores, Policard en 1924, Auler y Banzer en 1942, y Figge, Weiland, and Manganiello en 1948. Estos investigadores describieron la importancia de la irradiación infrarroja, combinada a la hematoporfirina, en tejidos neoplásicos y traumatizados. (Kalka, 2000; Allison & Sibata 2010). El compuesto purificado se llamó derivado de hematoporfirina (HPD), y poseía superiores propiedades para la detección de tumores; además fue el punto de referencia para el desarrollo de nuevos FS.

La expansión del uso clínico de la terapia fotodinámica se basó en el trabajo pionero de Dougherty *et al*, quien presentó datos relevantes sobre el éxito de la aplicación de esta técnica para el tratamiento de cáncer de piel y otros tumores malignos en 1978.

En las últimas décadas, se ha demostrado la efectividad de la TFD en microbiología, específicamente en el tratamiento de infecciones por patógenos intracelulares (Akilov *et al.*, 2006). Se ha reportado la efectividad de la TFD contra *L. (L.) amazonensis*, *in vitro e in vivo* (Dutta *et al.*, 2005., Escobar *et al.*, 2006., Valdivieso *et al.*, 2008., Hernández, 2010), contra *L. major* (Asilian *et al.*, 2006) y contra *L. (V.) braziliensis* (Montanari *et al.*, 2010).

**1.6.1 Fotosensibilizadores.** Un FS es una especie química capaz de promover una reacción fotoquímica al absorber la radiación y transferir su energía de excitación a las moléculas reaccionantes. Un FS debe poseer propiedades físicas y químicas ideales para que no cause daño al organismo, entre las que se encuentran: baja toxicidad cuando no está expuesto a la luz, no producir efectos adversos durante su administración, tener rápida eliminación para evitar la toxicidad sistémica, alto rendimiento cuántico para la generación del anión superóxido, alta afinidad por el órgano blanco, tener una fuente de absorción con un alto coeficiente de extinción en un rango de 600-800 nm para que la luz tenga mayor penetración en los tejidos (Detty *et al.*,2004, Castano *et al.*,2004).

Existen diversos tipos de FS, entre los que se encuentran los derivados de las porfirinas, como el Photofrin®, Temoporfin® y Verteporfin®; los derivados de la clorofila, tales como las clorinas, purpurinas y bacterioclorinas. También se usan como FS algunos colorantes como las ftalocianinas (Pc). (Allison &, Sibata, 2010).

**1.6.2 Ftalocianinas.** Las Pc, son FS de segunda generación, son dependientes del ion metal como el Aluminio, Cobre o Zinc, lo que les confiere características importantes para su efecto fototóxico. Son de fácil preparación y se caracterizan por absorber en la región roja del espectro entre 670 y 780 nm. (Konan *et al.*, 2001, Wainwright, 2008; Allison & Sibata, 2010).

Las Pc presentan grandes ventajas con respecto a otros PS, entre las que se encuentran: Retención selectiva en el tejido afectado, fácil síntesis, resistencia a la fotodegradación química, larga vida media en el estado de triplete fotoexcitado (fundamental para la producción de ERO) y baja toxicidad en la oscuridad. (Rosseti *et al.*, 2011).

En las últimas décadas, las Pc han sido ampliamente estudiadas, encontrando que tienen la propiedad de ser retenidas en el tejido blanco y esto proporciona una gran capacidad fotoselectiva en la destrucción de tumores, con daños mínimos a

las células sanas (Yslas *et al.*, 2009). La PcAlCl es un FS químicamente estable, altamente lipofílico, con un peso molecular de 574,96 g/mol. Ha demostrado ser altamente eficaz en la destrucción de células tumorales, siendo menos activa en células normales. En un estudio realizado por Kyriazi en 2008, en un modelo murino de carcinoma de piel no melanoma, se demostró la afinidad de la PcAlCl por las células tumorales, encontraron que este PS se absorbió 40 veces más y penetró 19 veces más profundo en los tejidos tumorales que en la piel normal, lo cual dió lugar a la remisión completa del tumor en el 60% de los ratones.

**1.6.3 Terapia fotodinámica en el tratamiento de la LC.** La combinación de luz y químicos para el tratamiento de las enfermedades de la piel ha sido una práctica muy empleada en dermatología en los últimos años (Kalka *et al.*, 2000).

Kassab *et al.*, 2000, evaluaron la capacidad de penetración a la piel de la PcZn en una formulación en gel, aplicada tópicamente a ratones sanos; encontrándose distribuida en las diferentes capas de la epidermis, sin detectar rastros de PcZn en sangre ni en hígado; determinaron mediante estudio histopatológico que en ausencia de luz no se evidenciaba daño tisular.

Dutta *et al.*, 2005, determinaron que los promastigotes y amastigotes axénicos de *L. (L.) amazonensis*, fueron más sensibles a bajas concentraciones de PcAlCl (5ug/mL), que los macrófagos J774, sugiriendo el potencial selectivo de la PcAlCl contra *Leishmania*.

Akilov *et al.*, 2006, compararon la acumulación de dos FS de la familia de benzofenoxazinas y dos porfirínicos a nivel intracelular en *L. major*, encontrando que los primeros se acumulaban más a nivel intracelular, debido a su carácter aniónico y a su alta hidrofobicidad.

Escobar *et al.* 2006, determinaron la actividad fotodinámica de la PcAlCl y la PcZn *in vitro*, en promastigotes de *L. (V.) panamensis* y *L. infantum*, concluyendo que la TDF sería una importante estrategia en el tratamiento de leishmaniasis.

Se conoce la actividad fototóxica de la PcAlCl *in vivo* e *in vitro* contra amastigotes y promastigotes de *L. (L.) amazonensis* (Escobar *et al.*,2006., Dutta *et al.*,2007 Hernández, 2010).

Se ha comprobado la actividad fototóxica de la PcZn en formulación liposomal, *in vitro* contra amastigotes y promastigotes de *L. (V.) braziliensis*; además se determinó la adecuada penetración en la piel, cuando fue aplicada en una formulación liposomal (Montanari *et al.*,2010).

Hernandez., 2010, comprobó que la TFD-PcAlCl en hamsters infectados con *L. (L.) amazonensis*, curó las lesiones, pero no eliminó completamente los amastigotes del sitio de la lesión; sugiriendo la necesidad de optimizar otras formulaciones con PcAlCl, a otras concentraciones.

Somenci *et al.*, 2011, investigaron la eficacia de la terapia fotodinámica (TFD) utilizando como FS, azul de metileno en hámsters infectados con *L. (L.) amazonensis*; encontraron que el tratamiento promueve la disminución en el tamaño de las lesiones y la reducción en la carga parasitaria en los ganglios linfáticos regionales; siendo esta una terapia es muy prometedora por su bajo costo y fácil administración.

Taylor *et al.*, 2011 han demostrado que la TFD utilizando como FS los Cetales de carbaporfirina, es efectiva contra *L. tarentolae in vitro*. Determinaron además que su incorporación dentro de liposomas disminuye notablemente su toxicidad. *In vivo*, en hámsters infectados encontraron reducción del tamaño de la lesión y los análisis histopatológicos y frotis evidenciaron que la carga parasitaria fue disminuida sin la presencia de efectos tóxicos.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la permeación y retención de la PcAlCl en los diferentes estratos de la piel humana sana, para su optimización en formulaciones tópicas en LC.

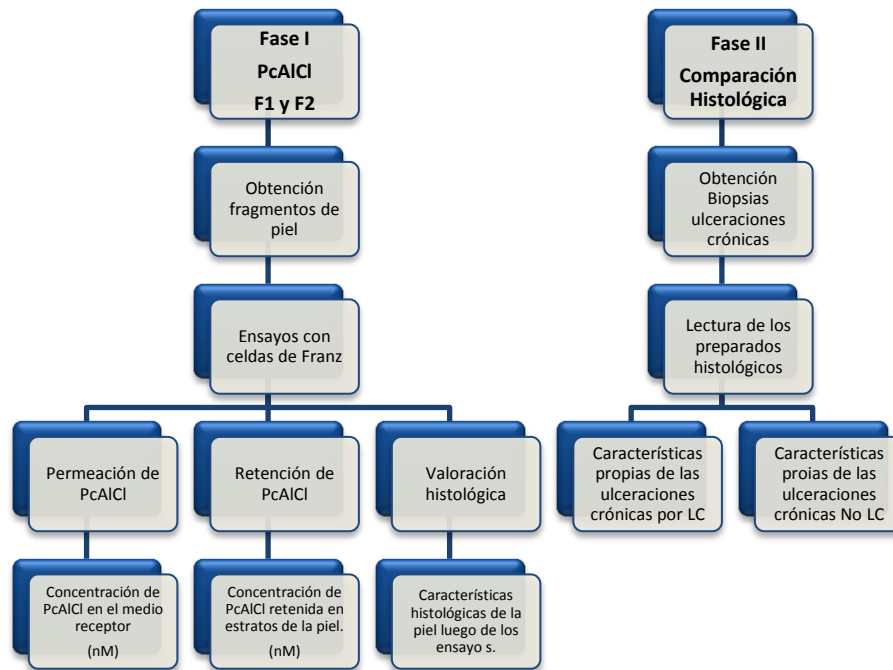
### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Determinar la permeación de la PcAlCl en piel humana sana, aplicada en solución y como nanoemulsión.
- Determinar la retención de la PcAlCl en los diferentes estratos piel humana sana, aplicada en solución y como nanoemulsión.
- Determinar las características histopatológicas de las ulceraciones cutáneas crónicas por leishmaniasis cutánea y por causas diferentes a ésta, como aproximación al comportamiento de las formulaciones tópicas en la ulceración crónica por leishmaniasis cutánea.

### 3. METODOLOGIA

La metodología llevada a cabo para realizar el presente trabajo, se desarrolló en dos fases. La primera fase consistió en la realización de ensayos de permeación transdérmica utilizando el sistema de celdas de Franz, en los que se empleó como membrana piel humana sana y donde se probaron dos formulaciones de PcAlCl, una en solución (F1) y otra en nanoemulsión (F2). En la segunda fase se realizó un estudio de las características histopatológicas presentes en biopsias de piel de pacientes con ulceraciones crónicas con diagnóstico de LC y de otras ulceraciones crónicas de etiología diferente. Los ensayos de permeación transdérmica, que incluyeron también estudios de retención, se realizaron de acuerdo a las indicaciones proporcionadas por el Profesor Eduardo Ricci, de la Facultad de Farmacia, Universidad de Rio de Janeiro (Comunicación personal: marzo, 2011), y según protocolo de Primo *et al.*, 2008. El procesamiento y lectura de las biopsias se realizó en el laboratorio del departamento de patología, Escuela de Medicina de la Universidad Industrial de Santander (UIS), con el apoyo y asesoría del Profesor Julio Cesar Mantilla. Los experimentos con celdas de Franz, se realizaron en el laboratorio de quimioterapia del CINTROP, ubicado en la sede UIS Guatiguará. En la Figura 5 se expone el diseño metodológico desarrollado en el este trabajo.

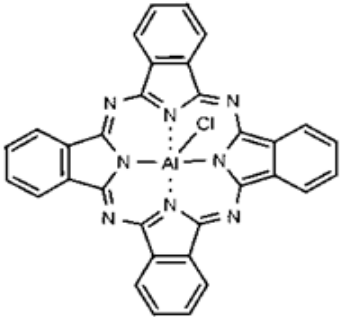
**Figura 5.** Diseño metodológico.



### **3.1 FORMULACIONES DE FTALOCIANINA DE ALUMINIO CLORADA (PcAlCl).**

Se utilizaron dos formulaciones de ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) obtenida de Sigma Aldrich® (St. Louis, MO, USA), las cuales fueron identificadas como F1(Solución) y F2 (Nanoemulsión). La Tabla 5 muestra la estructura química y molecular de la PcAlCl.

**Tabla 5.**Características químicas y moleculares de la PcAlCl.

ESTRUCTURA QUÍMICA	PESO MOLECULAR	FÓRMULA MOLECULAR
	574,96 g/mol	$C_{32}H_{16}AlClN_8$

La F1, fue preparada según protocolo de Kyriazi *et al*, 2007; de la siguiente manera: en un tubo ámbar tapa rosca de 4,5 mL, se pesaron 2,5 mg de PcAlCl, que fueron disueltos en una mezcla que contenía 357  $\mu$ L de dimetilsulfóxido, (DMSO, Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italia), 214  $\mu$ L de Tween 80 (Sigma Aldrich) y 429  $\mu$ L de agua tipo I, de esta manera se obtuvo una solución madre de PcAlCl, a partir de la cual se preparó la F1 a una concentración de 100  $\mu$ M. Se preparó además una solución con todos los componentes anteriormente descritos pero sin la PcAlCl, a la cual nos referiremos como vehículo de la F1, con el fin de ser utilizada como control en los ensayos con celdas de Franz.

La F2, compuesta por una fase acuosa y una fase oleosa, fue preparada utilizando técnicas de ultrasonificación. La nanoemulsión fue diluida en agua (1:50) antes de cada medición. Se determinó la concentración de PcAlCl mediante espectrometría de fluorescencia, utilizando el fluorómetro Perkin Elmer L55, USA, a una longitud de onda de excitación de 670 nm y emisión de 682 nm.

En el presente trabajo se utilizaron las formulaciones F2, con código F2-a y F2-9, asignados por su fecha de preparación. Todas las formulaciones F2 tienen los mismos componentes y fueron preparadas de la misma manera.

Se utilizó el vehículo de la F2 (nanoemulsión sin la PcAlCl) como control para los ensayos con celdas de Franz.

Las soluciones preparadas se mantuvieron en refrigeración, protegidas de la luz y su concentración fue determinada por fluorometría.

**3.1.1 Curvas de calibración de PcAlCl.** Se realizaron curvas de calibración de PcAlCl en DMSO, etanol y buffer fosfato salino (PBS 7,4) en Sodio dodecil de J.T. Baker® al 2%. Para realizar las curvas de calibración, se preparó una solución madre de PcAlCl diluida en DMSO, a partir de la cual se hicieron las curvas en los solventes mencionados.

Para la curva de calibración de PcAlCl en DMSO, se hicieron nueve diluciones 1:2 desde 50 nM hasta 0,19 nM, utilizando como diluyente el DMSO. Sus rangos de detección se encontraron en concentraciones entre 22,676 a 353,172 nM, con un coeficiente de correlación de 0,999%. La ecuación de la recta fue  $Y = 6,59 x + 20,87$ . Se utilizó esta curva de calibración para todas las lecturas de PcAlCl en DMSO, utilizando siempre como blanco el DMSO.

Para la curva de calibración de PcAlCl en etanol, se realizaron nueve diluciones 1:2 desde 50 nM hasta 0,19 nM, utilizando como diluyente el etanol. Sus rangos de detección se encontraron en concentraciones entre 4,171 a 254,598 nM, con un coeficiente de correlación de 0,998%. La ecuación de la recta fue  $Y = 5,061 x + 5,673$ . Se utilizó esta curva de calibración para todas las lecturas de PcAlCl en etanol, utilizando siempre como blanco el etanol.

Para la curva de calibración de PcAlCl en PBS (pH 7,4)-SDS 2%, se realizaron nueve diluciones 1:2 desde 50 nM hasta 0,19 nM, utilizando como diluyente el PBS en SDS 2%. Sus rangos de detección se encontraron en concentraciones entre 0,73 a 139.955 nM, con un coeficiente de correlación de 0.9991 %. La ecuación de la recta fue  $Y = 2,774 x + 2,802$ . Se utilizó esta curva de calibración para todas las lecturas de PcAlCl en PBS 7,4 -SDS 2%, utilizando siempre como blanco el PBS 7,4 -SDS 2%.

**3.1.2 Espectros de emisión y absorción de la PcAlCl.** Se realizaron los espectros de absorción y de emisión de fluorescencia de la PcAlCl en las dos formulaciones utilizadas, con los diferentes solventes. Para esto se tomaron 10  $\mu$ L de las formulaciones y se diluyeron con cada uno de los diferentes solventes, ajustando a un volumen de 3 mL.

El espectro de absorción se realizó en el espectrofotómetro Shimadzu UV Vis 2401, Canadá, con el Software UV Probe Vis. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 250-800 nm, velocidad de escaneo media, intervalo de medición 1 nm y ancho de endija 1 nm.

El espectro de emisión de fluorescencia, se realizó en el espectrofluorómetro Perkin Elmer L55, fijando rangos de emisión a una longitud de onda inicial de 374nm y final de 800nm; la longitud de onda de excitación fue 364 nm, a una velocidad de escaneo media y un ancho de endija de 10nm.

## **3.2 OBTENCIÓN Y PROCESAMIENTO DE FRAGMENTOS DE PIEL.**

**3.2.1 Condicionamientos éticos.** Para la obtención de los fragmentos de piel humana, se contó con la aprobación del Comité de Ética de para la investigación científica de la Universidad Industrial de Santander (UIS), con el código CB 12012. Según la Resolución 008430 de Octubre 4 de 1993, se clasificó en la categoría de RIESGO MÍNIMO, ya que se requirieron segmentos de piel abdominal de

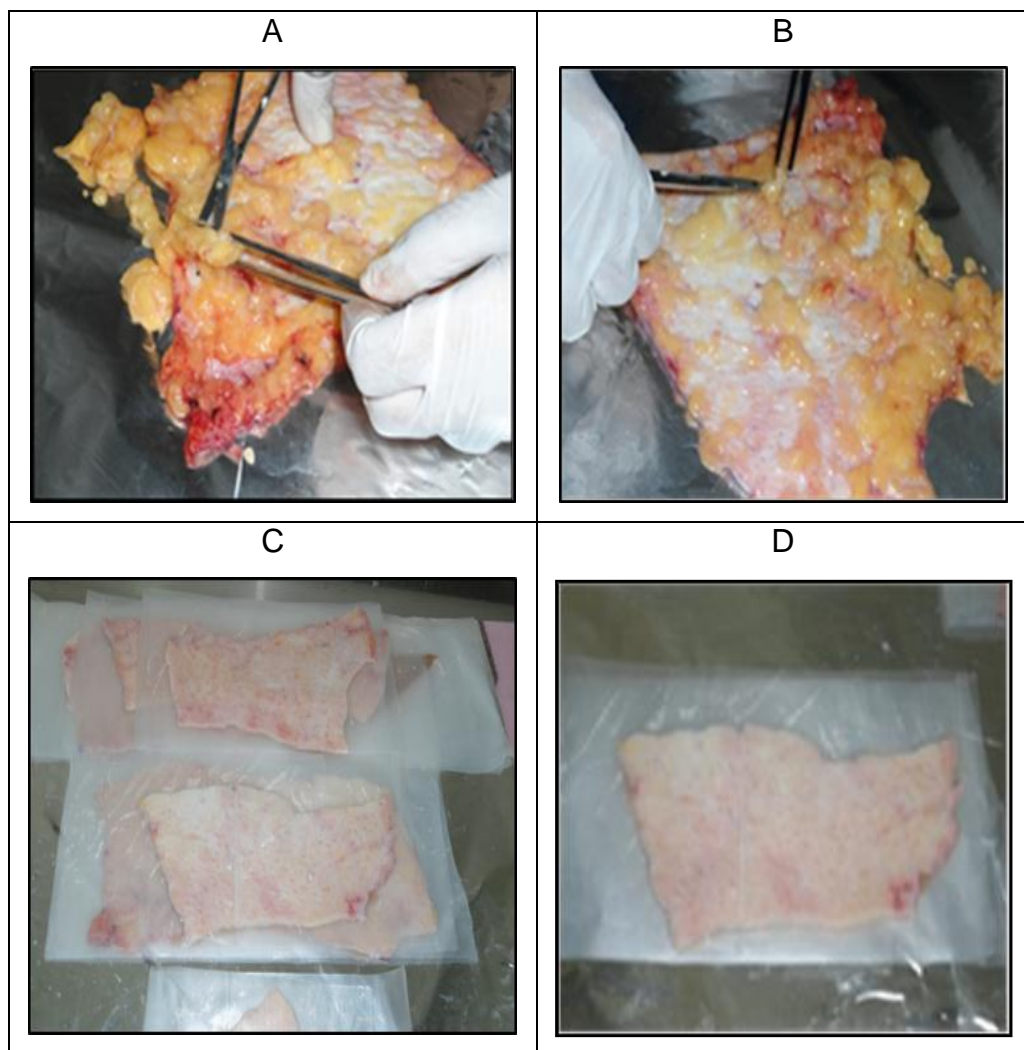
pacientes sanos, de género femenino, entre 25 y 45 años de edad, que se sometieron a cirugía estética o de corrección de eventraciones.

Estos fragmentos de piel fueron adquiridos con el apoyo de un cirujano plástico y un cirujano general, quienes se comprometieron con la consecución de estos tejidos. Explicaron a las pacientes el consentimiento informado y nos dieron detalles de la fecha y hora de la cirugía, para que por nuestra parte estuviera todo dispuesto para el inmediato transporte y procesamiento de los tejidos donados.

La piel utilizada en este proyecto fue obtenida de procedimientos quirúrgicos realizados en el Hospital Universitario de Santander (HUS), así como en la clínica el Pinar, que es una institución de carácter privado, dedicada a la cirugía estética.

**3.2.2 Procesamiento de la piel.** Una vez extraída, la piel se colocó dentro de una bolsa ziploc, en una nevera de icopor con hielo seco, bajo condiciones de asepsia, y se llevó inmediatamente al laboratorio. Para iniciar su procesamiento, la piel fue lavada con suero fisiológico, se tomó muestra para biopsia, la cual fue conservada en formol buferado (formalina 10%, formaldehído 35%-40%, agua destilada, fosfato de sodio monobásico, fosfato de sodio dibásico). La piel se colocó sobre una Tabla de disección previamente cubierta con papel aluminio. En la Figura 6 se muestran los pasos seguidos para la preparación de la piel. La piel se fijó con alfileres en los bordes, manteniendo el EC en contacto con el aluminio (Figura 6A). Se procedió a la remoción del tejido graso subcutáneo, con el uso de un equipo de disección (Figura 6B), hasta conseguir solo la capa de piel. Durante la remoción del tejido graso, la piel se mantuvo hidratada mediante la humidificación con una gasa impregnada de suero fisiológico de la casa comercial Baxter®. Una vez la piel estuvo desprovista de tejido graso, se retiraron los alfileres, la piel fue lavada, se estiró al máximo posible y se envolvió en parafilm (Figura 6C y D); este a su vez se cubrió con papel aluminio, para su almacenamiento a -20°C. Las muestras de piel preparadas bajo este protocolo podrán almacenarse hasta por 3 meses. (WHO, 2006).

**Figura 6:** Preparación de la piel humana para los ensayos con celdas de Franz. **(A).** Ubicación de la piel en la Tabla de disección previamente cubierta con papel aluminio, se fijó con alfileres en los bordes, con el Estrato córneo (EC) en contacto con el aluminio. **(B).** Remoción del tejido graso subcutáneo, con un equipo de disección. **(C y D).** Fragmentos de piel listos para almacenar, luego de la remoción completa del tejido graso, la piel se estiró y se cubrió con parafilm, se envolvió a su vez con aluminio y se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ .



**3.2.3 Biopsias de piel.** Se tomó biopsia a la piel obtenida para los ensayos en diferentes tiempos de la siguiente manera: antes de proceder a la remoción del tejido graso subcutáneo (piel recién resecada), luego de la remoción del tejido graso, después de la descongelación (antes de su montaje en las celdas de Franz), y luego de experimentos de 12 y 24 horas con celdas de Franz. Las biopsias fueron conservadas en formol buferado. Se realizaron cortes de la piel los cuales fueron coloreados con hematoxilina-eosina (H-E). El procesamiento de las biopsias se realizó según lo descrito en el manual de procesos y procedimientos del laboratorio del departamento de patología de la escuela de medicina de la Universidad Industrial de Santander (UIS).

### **3.3. ENSAYOS DE PERMEACIÓN DE PcAICI EN PIEL HUMANA.**

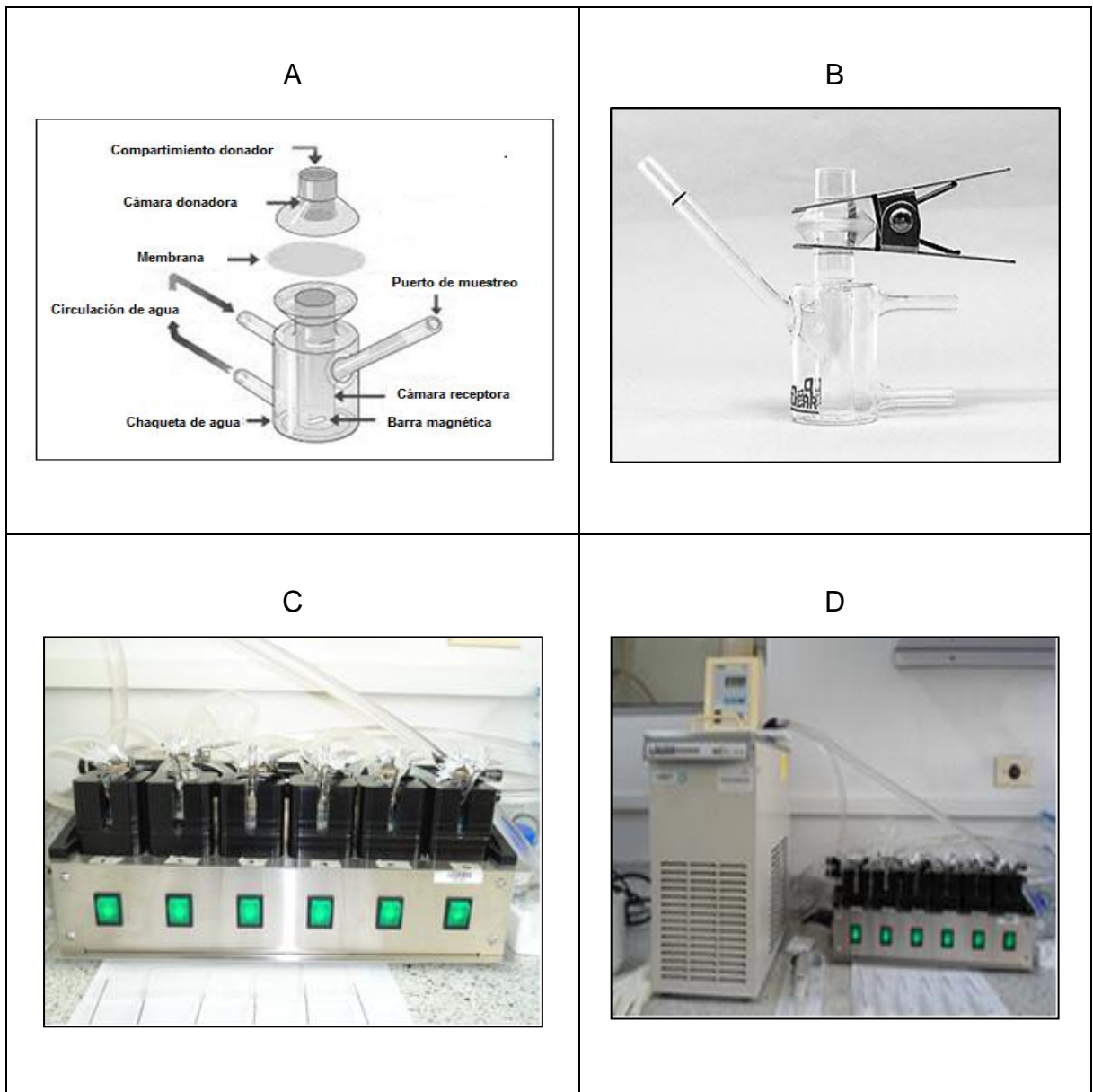
Los ensayos de permeación en piel humana se realizaron según lo descrito por Primo *et al.*, 2008. Se utilizaron celdas de Franz de Permeagear® USA, en donde se evaluó la permeación y retención de las formulaciones F1 y F2 en la piel humana. Los ensayos se llevaron a cabo durante 12 horas, realizando muestreos a la hora cero, 4, 8, 10 y 12 de cada experimento. Se realizaron 4 ensayos con la F1 con un tiempo final de 12 horas. Se realizaron 6 ensayos con la F2 con un tiempo final de 12 horas.

**3.3.1 Membranas.** El fragmento de piel a utilizar como membrana, se sacó del congelador y se dejó a temperatura ambiente durante 1 hora. Se cortaron discos de piel de 1,77 mm de diámetro. Se tomó biopsia para análisis histopatológico de la piel conservada y se analizó según lo descrito anteriormente (numeral 3.2.3).

**3.3.2 Celdas de Franz.** En la Figura 7 se muestra la representación del sistema de celdas de Franz. La Figura 7A y B, muestra la celda de difusión de Franz, la cual consta de dos compartimientos, una cámara donadora y una cámara receptora. En el primero, se adiciona la formulación a evaluar, en el segundo se incorpora el medio receptor. La cámara receptora, se encuentra rodeado por una chaqueta de agua que estabiliza la temperatura durante el experimento; posee además un puerto de muestreo, por donde se extrae el medio receptor para determinar la permeación del compuesto a lo largo del ensayo.

En medio de los dos compartimientos, se coloca la membrana, en este caso la piel, y se aseguran ambos compartimientos por medio de una pinza, como se muestra en la Figura 7B. En un agitador (stirrer), se ubican las seis celdas de Franz, las cuales van unidas a este por medio de mangueras, Figura 7C, que hacen el llenado y recirculación en la chaqueta de agua. El agitador, se encuentra a su vez conectado con un baño recirculante referencia Lauda Brinkmann Ecoline RE 106, USA, al que previamente se le ha estabilizado la temperatura a 32°C, Figura 7D.

**Figura 7:** Representación del sistema de celdas de Franz. **(A y B)** Celda de difusión de Franz con sus partes. **(C)** Agitador (stirrer), donde se ubican las seis celdas de Franz, las cuales van unidas a este por medio de unas mangueras, **(D)** Agitador conectado con el baño recirculante.



**3.3.3 Procedimiento.** Se instaló el equipo para el ensayo con celdas de Franz, se verificó el completo llenado de la chaqueta de agua de las celdas. Previa colocación de la barra magnética en la cámara receptora de la celda, se realizó el llenado de éste compartimiento con 3 mL de PBS 7,4 SDS 2%, a cada una de las 6 celdas. Se ubicó la piel en la celda, colocando el EC hacia arriba, (en contacto con la cámara donadora). Se colocó encima de la piel, la cámara donora y se aseguró con la pinza. A partir de este momento, se esperó una hora para que todo el sistema se estabilizara a 32°C.

Luego se procedió a la incorporación de 0,3 mL de la formulación a evaluar (F1 o F2) en la cámara donora de las celdas 2, 3, 4, 5 y 6. A la celda 1 se colocaron 0.3 mL del vehículo (la formulación sin PcAlCl), la cual fue evaluada como control del experimento, Tabla 6. Todas las cámaras donoras se cubrieron con suficiente papel aluminio para protegerlas de la luz durante todo el ensayo.

**Tabla 6.** Formulaciones evaluadas en los ensayos con celdas de Franz y sus controles.

<b>FORMULACION</b>	<b>CONTROL</b>
F1 (Solución)	Vehículo F1
F2a (Nanoemulsión)	Vehículo F2a
F2-9 (Nanoemulsión)	Vehículo F2-9

Seguidamente, se extrajeron 0,3 mL del puerto de muestreo de la solución receptora de cada una de las seis celdas, la cual se consideró la hora cero del ensayo. El volumen extraído de cada celda se incorporó en un tubo ámbar tapa rosca y se conservó para su cuantificación. Se utilizó un catéter Rymco # 14, adaptado a una jeringa de 5 mL para cada una de las celdas para todo el ensayo. El puerto de muestreo se mantuvo cubierto con parafilm.

Se tomaron muestras de la misma manera a las horas 4, 8, 10 y 12 del ensayo. Cada vez que se extrajeron 0,3 mL del puerto de muestreo de la cámara receptora, se repuso el volumen extraído con medio receptor fresco (0,3 mL PBS-SDS 2%).

Se determinó por fluorometría la concentración de PcAlCl en cada uno de los muestreos del ensayo de permeación, con espectros de excitación de 670 nm y emisión de 682 nm.

Se utilizó una curva de calibración de PcAlCl en PBS 7,4 -SDS 2%. Los resultados fueron expresados como concentración de PcAlCl en nM.

### **3.4. ENSAYO DE RETENCIÓN DE PcAlCl EN PIEL HUMANA SANA**

Al completar las 12 horas del ensayo de permeación, se retiró la piel utilizada como membrana en cada una de las celdas, con el fin de evaluar la retención en el EC por el método de *tappe stripping* y en epidermis dermis mediante un macerado del tejido luego de retirar el EC con las cintas. (Primo *et al.*, 2008). Se realizaron 4 ensayos con la F1 con un tiempo final de 12 horas y 6 ensayos con la F2 con un tiempo final de 12 horas

**3.4.1 Método de las cintas adhesivas o *Tape stripping*.** La concentración de PcAlCl retenida en el EC se determinó por el método de *tappe stripping* según lo descrito por Primo *et al.*, 2008. Se cortaron 15 cintas Scotch 310 Magic Tape de 3M®, del tamaño del orificio central de la cámara donora. La piel proveniente del ensayo con celdas de Franz se lavó con solución salina y se cortó la parte central que estuvo en contacto con la cámara donora y la receptora. Se colocó la primera cinta con la ayuda de una pinza y se hizo presión con la pesa provista para tal fin durante 30 segundos. Se despegó y se incorporó la cinta en un tubo ámbar que contenía 3 mL de etanol. Se realizó el mismo procedimiento con las 14 cintas

restantes y se incorporaron todas en el mismo tubo ámbar tapa rosca. Se realizó el mismo procedimiento con la piel de las seis celdas. Se dejó en agitación durante toda la noche y al día siguiente se cuantificó la PcAlCl por fluorometría, con espectros de excitación de 670 nm y emisión de 682 nm. Se utilizó una curva de calibración de PcAlCl en etanol, cuyos rangos de detección se encuentran en intensidades entre 4,171 a 254,59 nM. Los resultados fueron expresados como concentración de PcAlCl en EC, en nm/cm<sup>2</sup>.

**3.4.2 Retención de PcAlCl en epidermis y dermis (E+D).** La concentración de PcAlCl retenida en E+D se realizó según lo descrito por Primo *et al.*, 2008. Luego de la completa remoción del estrato córneo con las cintas adhesivas, el tejido restante se cortó en pequeños trozos, se maceró y se adicionó en un tubo ámbar tapa rosca que contenía 3 mL de etanol. Se realizó el mismo procedimiento con la piel de las seis celdas. Los tubos se dejaron en agitación durante toda la noche y al día siguiente se cuantificó la concentración de PcAlCl por fluorometría, con espectros de excitación de 670 nm y emisión de 682 nm. Se utilizó una curva de calibración de PcAlCl en etanol, cuyos rangos de detección se encuentran en intensidades entre 4,171 a 254,59 nM.

### **3.5 VALORACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PIEL DESPUÉS DE LOS EXPERIMENTOS.**

Según lo descrito en el numeral 6.3.3, se realizó el montaje de un ensayo con celdas de Franz a 12 horas y otro a 24 horas, aplicando la F1 y la F2 de la siguiente manera: Celda 1 Vehículo F1, celda 2 y 3 F1, Ceda 4 Vehículo F2, celdas 5 y 6 F2. Transcurridos los tiempos de cada ensayo, se recolectaron los discos de piel utilizada como membrana, y se conservaron en formol buferado para su estudio histopatológico. Se realizaron cortes histológicos y se colorearon con H-E.

Se realizó lectura al microscopio óptico. Se realizó registro fotográfico de las imágenes observadas.

### **3.6. ANÁLISIS HISTOLÓGICOS EN PIEL CON ULCERACIONES.**

Se realizó el análisis histológico de biopsias de piel de individuos con ulceraciones crónicas con diagnóstico de leishmaniasis cutánea (LC) y por causas diferentes a la LC.

**3.6.1 Adquisición de las biopsias de piel.** Se consiguieron preparaciones de piel de pacientes confirmados con LC y con otras ulceraciones por causa diferente a LC, en forma de bloques de parafina o como láminas coloreadas con H-E.

Las muestras de piel embebidas en bloques de parafina fueron obtenidas en el laboratorio del Dr. Julio Cesar Mantilla; procedentes de pacientes a quienes se les practicó biopsia de lesiones cutáneas crónicas, en algunos casos con diagnóstico compatible con LC. Estos tejidos fueron nuevamente embebidos en parafina de Leika Microsystems®. Se realizaron cortes en micrótomo RM2135 de Leika Microsystems® y se colorearon con H-E.

Las biopsias de piel coloreadas con H-E fueron obtenidas en el laboratorio de histocitopatología del Dr. Alfredo Acevedo, quien nos facilitó las preparaciones con el diagnóstico de LC.

**3.6.2 Variables estudiadas.** Se analizaron variables a nivel de la epidermis, dermis e hipodermis.

En epidermis las variables fueron:

**Variable 1 Acanthisis:** Lesión epidérmica debida a una multiplicación exagerada o hipertrofia de las células del cuerpo de Malpighi.

**Variable 2 Ulceración:** Formación de una lesión en la piel o en la superficie de un órgano. Una úlcera se forma cuando las células superficiales mueren y se desintegran.

**Variable 3 Hiperqueratosis:** Se debe a una acumulación excesiva de queratina en las capas externas de la piel. El engrosamiento de la piel la protege de la fricción, la presión y la irritación.

**Variable 4 Paraqueratosis:** Alteración de la queratinización en la que desaparece el estrato granuloso y persisten los núcleos en el estrato córneo.

**Variable 5 Atrofia:** Disminución importante del tamaño de la célula y del órgano del que forma parte, debido a la pérdida de masa celular, estas células muestran una disminución de su función.

**Variable 6 Espongiosis:** Se debe al edema intraepidérmico, aparece como espacios en las tinciones habituales. Se observa sólo como la separación de las células epidérmicas, especialmente de las del estrato de Malpighi, observándose como pequeñas vesículas.

Con respecto a los cambios a nivel de la dermis e hipodermis, las variables estudiadas fueron:

**Variable 7 Infiltrado granulomatoso:** Es una reacción de hipersensibilidad tipo IV. Es la respuesta inespecífica a una agresión externa, mediada por los linfocitos T y sus productos solubles; se trata de un reclutamiento de linfocitos T sensibilizados e inducidos a producir citoquinas que mediarán la inflamación local. Se observa una inflamación productiva organizada constituida por células gigantes, células epitelioides y una corona de linfocitos que las rodea. Este tipo de respuesta ocurre en tejidos conectivos vascularizados y se da con el fin de aislar y destruir el agente causal, así como de reparar el tejido u órgano dañado.

**Variable 8 Tipo celular presente en el infiltrado:** linfocitos, plasmocitos, polimorfonucleares, histiocitos, eosinófilos, células gigantes.

**Variable 9 Fibrosis:** formación o desarrollo excesivo del tejido conectivo fibroso en un órgano o tejido, el cual se presenta como consecuencia de un proceso reparativo o reactivo.

**Variable 10** Estado de los vasos sanguíneos: vasos proliferativos, eritrocitos extravasados y endotelio prominente.

**Variable 11** Presencia de amastigotes.

**3.6.3 Lectura y análisis de las muestras.** Se realizó la lectura de las preparaciones histológicas por 3 observadores diferentes, utilizando microscopio óptico. En total fueron examinadas 22 biopsias.

Los resultados fueron registrados en un formato para lectura de biopsias. Se determinó una escala cualitativa con cruces así: 1+ (Leve), 2+ (moderado), 3+ (severo). Para los amastigotes 0 (ausencia) y 1 (presencia).

Se realizó registro fotográfico de los hallazgos histológicos más relevantes.

### **3.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO**

El análisis estadístico de los experimentos de retención en EC y Epidermis + Dermis, con las formulaciones F1 y F2, se realizó mediante el software SPSS versión 19.0, utilizando como herramientas estadísticas las pruebas no paramétricas de Kruskal Wallis y de Mann Whitney.

Las variables analizadas en este trabajo fueron: Formulaciones (F1 y F2), tiempo de los experimentos y capas de la piel (Estrato corneo, epidermis, dermis).

Los resultados obtenidos en el estudio de comparación histológica se procesaron en el software Stata 10.0, de cuyo análisis se obtuvo el índice *Kappa* corregido (*K*) para cada una de las variables estudiadas.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 CARACTERÍSTICAS *FISICOQUÍMICAS* DE LA PcAlCl EN LAS FORMULACIONES UTILIZADAS.

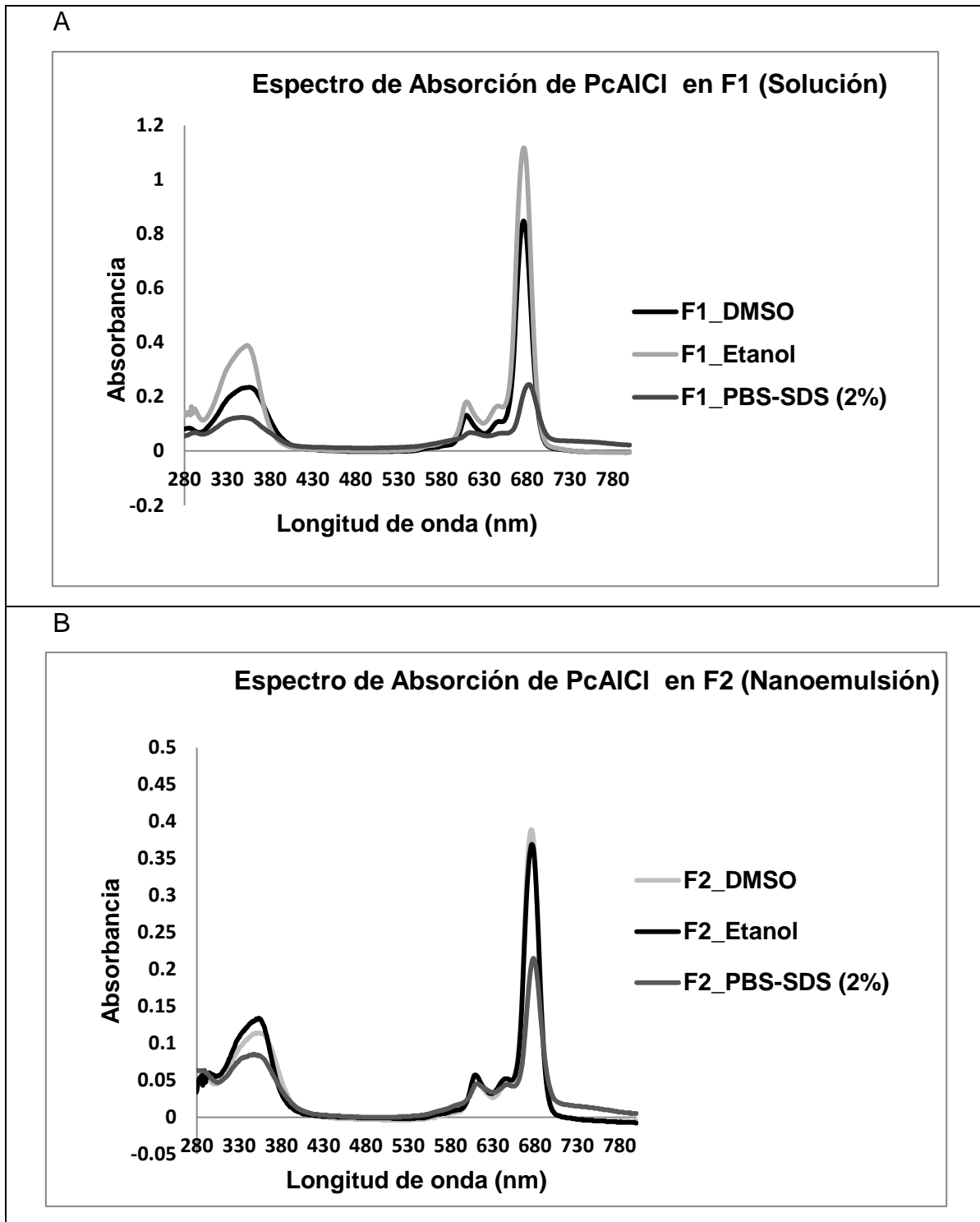
**4.1.1 Espectros de absorción y emisión de fluorescencia.** Se realizaron los espectros de la PcAlCl en las formulaciones, utilizando como solvente el DMSO, etanol y PBS-SDS 2%. Los espectros de absorción y emisión de la PcAlCl en las formulaciones utilizadas, con los diferentes solventes, se muestran en las Figuras 8 y 9 respectivamente.

La PcAlCl diluida en los diferentes solventes utilizados, mostró picos máximos de absorción a 680 nm, cuando se utilizaron como solventes el etanol y el DMSO, se mantuvieron sus bandas características Soret de 300 a 380 nm y su banda Q de 600 a 700 nm. Cuando se utilizó como solvente el PBS-SDS 2%, se mantuvo la banda Soret, pero la banda Q, no se evidenció de forma característica, como se muestra en la Figura 8-A.

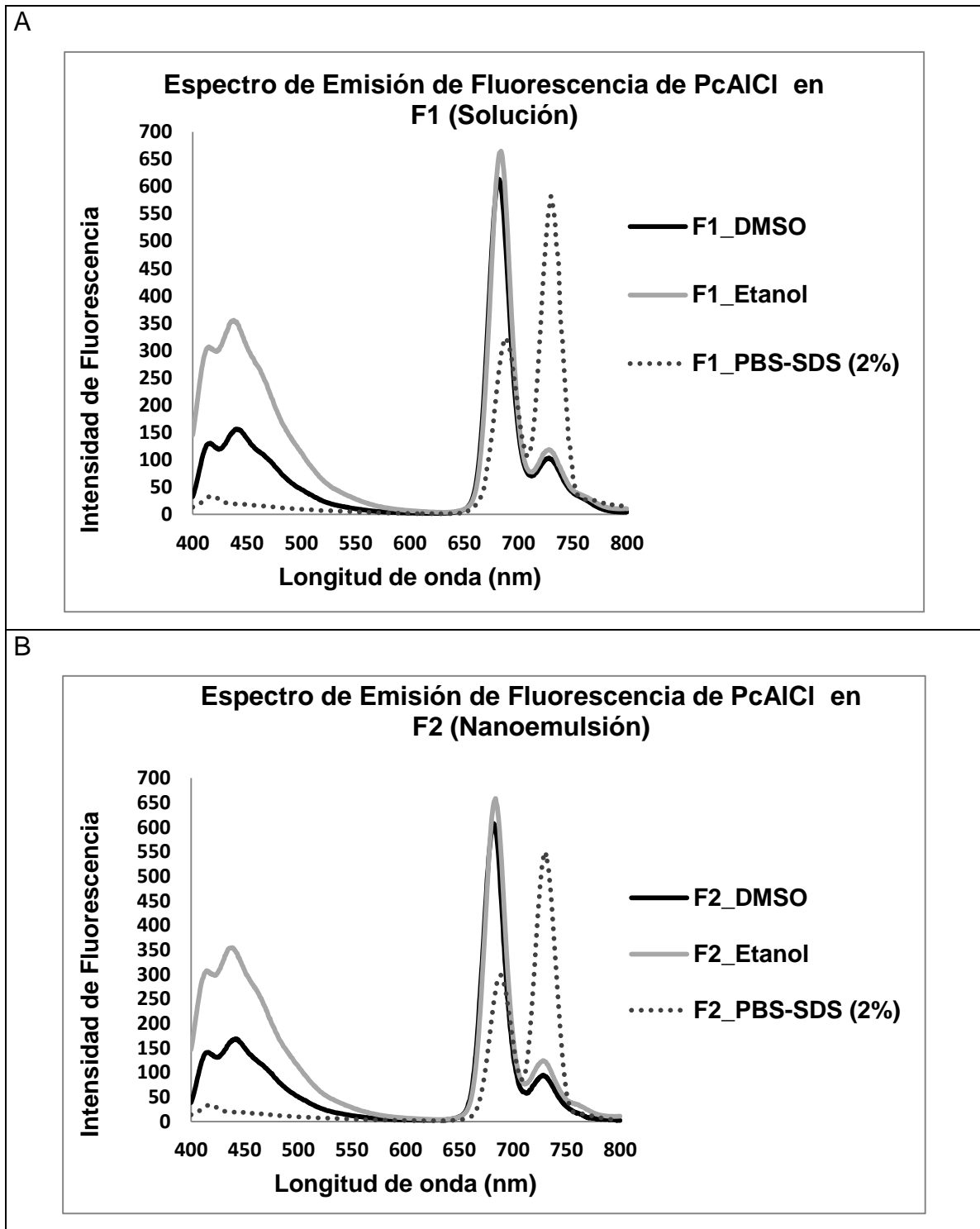
Comparando ambas formulaciones, se puede observar que la F1 mostró mayor absorbancia que la F2 en todos los solventes utilizados, el solvente que mostró menor absorbancia en las dos formulaciones, fue el PBS-SDS 2%.

El espectro de emisión de fluorescencia realizado a F1 y a F2 en los solventes, mostró comportamiento similar para las dos formulaciones, observándose su máxima emisión a una longitud de onda de 680 nm, para el DMSO y para el etanol. El espectro de emisión de las formulaciones en PBS 7,4 -SDS 2%, mostró dos picos, presentando su máxima emisión a 730 nm.

**Figura 8.** Espectro de absorción de la PcAlCl en los diferentes solventes. A. Formulación 1, B. Formulación 2.



**Figura 9.** Espectro de emisión de fluorescencia de la PcAlCl en los diferentes solventes. A. Formulación 1, B. Formulación 2.



**4.1.2 Concentración de PcAlCl en F1 y F2.** Al realizar estudios espectrofluorimetría a una longitud de onda de emisión de 686nm y excitación de 670nm, con cada una de las formulaciones en diferentes tiempos después de su preparación, se encontró que las concentraciones de PcAlCl obtenidas no presentaron modificaciones. Igualmente al extrapolar estas intensidades en la curva de calibración en DMSO, se observó que la concentración de PcAlCl en las formulaciones mantuvo valores muy próximos al inicial.

Esto demostró que las formulaciones F1 y F2 que se utilizaron durante el desarrollo del presente trabajo, tuvieron una concentración de PcAlCl estable, comparando la concentración obtenida el día de su preparación y en los días 3, 5, 10, 14, 20 posteriores a ésta. La Tabla 7 muestra las concentraciones de PcAlCl en las formulaciones en los diferentes días.

**Tabla 7.** Concentración de PcAlCl en las formulaciones. Se muestran las intensidades y concentraciones obtenidas al analizar la F1 y F2 por fluorometría (longitud de onda de excitación 670 nm, emisión 686 nm).

<b>FORMULACION</b>	<b>Día</b>	<b>Intensidad</b>	<b>Concentración</b>
<b>F 1</b>	1	270,46	109,21
	3	263,35	103,32
	5	272,81	113,93
	10	266,94	107,49
	14	259,01	101,50
	20	269,31	109,01
<b>F2 a</b>	1	290,93	168,02
	3	294,65	169,24
	5	288,97	161,02
	10	289,71	155,14
	14	292,87	167,07
	20	288,15	156,93
<b>F 2 9</b>	1	301,54	187,33
	3	305,94	193,31
	5	311,32	202,92
	10	309,56	201,65
	14	300,02	186,92
	20	300,26	188,59

#### **4.2. PIEL ABDOMINAL OBTENIDA PARA SER UTILIZADA EN LOS ENSAYOS CON CELDAS DE FRANZ.**

El procedimiento realizado para la obtención y procesamiento de los fragmentos de piel que se utilizó como membrana en los ensayos de permeación y retención, mostró a nivel macro y microscópico, que la piel se encontraba en condiciones adecuadas para ser utilizada en este tipo de ensayos.

Se obtuvieron fragmentos de piel procedentes de mujeres sanas, entre 25 y 45 años de edad, que no presentaran afecciones dermatológicas y que se sometieron

a cirugía estética o de corrección de eventraciones. Desde el punto de vista macroscópico, la piel presentó un color normal. Durante el desarrollo del trabajo se obtuvo la piel de tres pacientes, la piel código 0, no se utilizó en los experimentos debido a que se obtuvo con mucha anticipación al inicio de la fase experimental, por lo que se decidió realizar los ensayos con la piel 1 y 2, recolectadas al inicio de los experimentos.

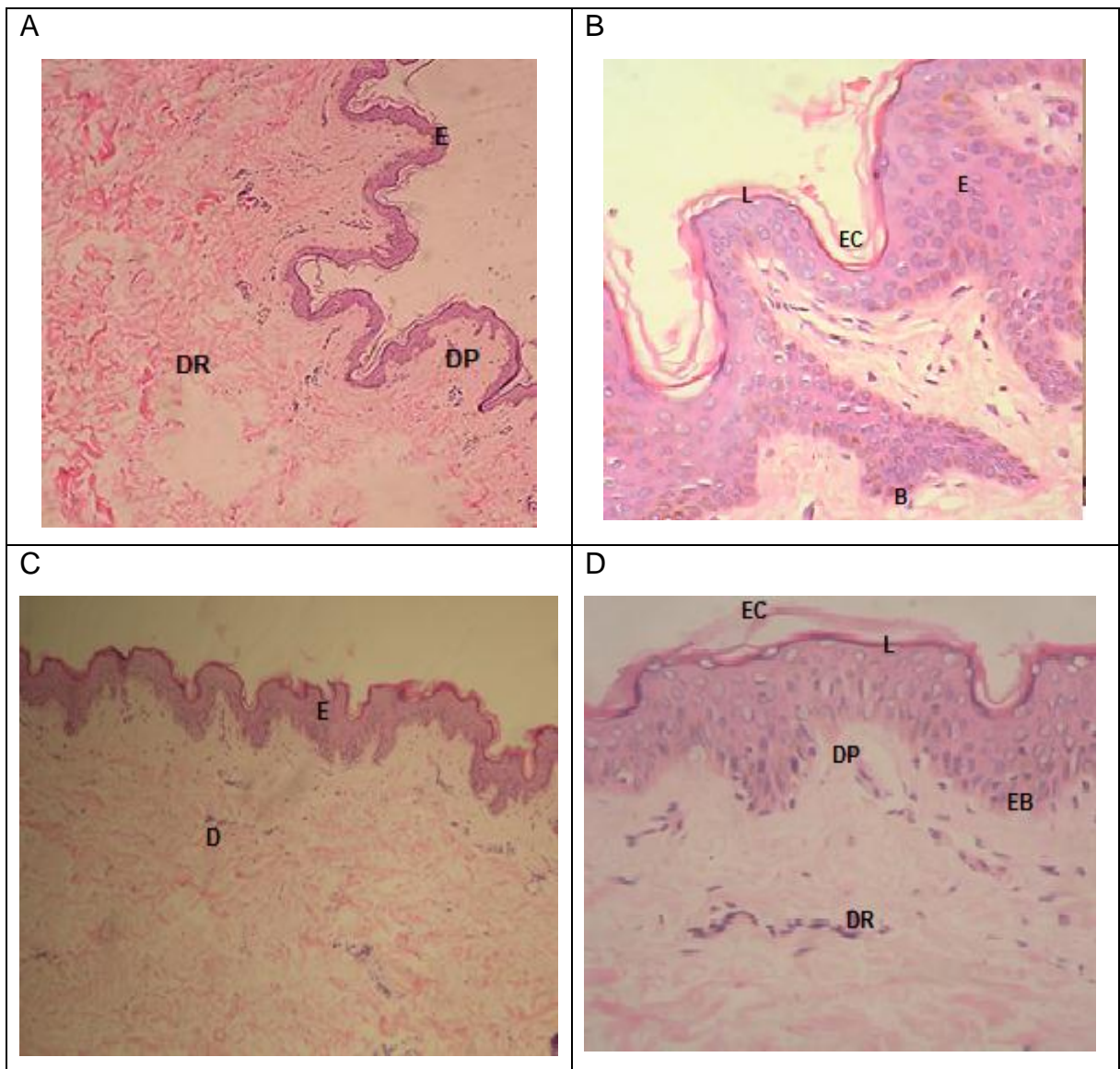
A nivel microscópico, la piel obtenida evidenció un patrón histológico normal, esto fue corroborado mediante la lectura de las biopsias de piel recién resecada y luego de hasta 3 meses de su congelación a  $-40^{\circ}\text{C}$  (envuelta directamente en parafilm y este cubierto con papel aluminio, dentro de una bolsa con cierre hermético). Las biopsias fueron coloreadas con H-E, se consideró un patrón histológico normal cuando se observó que las diferentes capas de la piel presentan una disposición normal, en sus aspectos celular y estructural, como se muestra en la Figura 10.

En epidermis, desde su capa más profunda, se observó el estrato basal o germinativo, donde se encontraron las células cilíndricas dispuestas generalmente en una hilera, teñidas intensamente con la hematoxilina, seguidamente, en el estrato espinoso, se observaron células ligeramente aplanadas, estas células se tiñeron de forma muy tenue con la hematoxilina, observándose de color rosa pálido. En el estrato granuloso, se evidenciaron células con un citoplasma que contiene gránulos basófilos gruesos, estas células se tiñeron de forma intensa con la hematoxilina, observándose de color pardo negruzco a azul intenso. Luego se encontró el estrato lúcido compuesto de una fina capa de células, con alta afinidad por la eosina. Por último, el estrato córneo, que se tiñó únicamente por la eosina, dado que está conformado por células que no tienen núcleo.

En la dermis se reconocieron dos capas: la superficial o capa papilar, que es laxa y pueden apreciarse en esta capa los entrantes correspondientes a la epidermis, que se conocen como papilas dérmicas; y la capa reticular, más profunda y densa.

Las características anteriormente descritas para la piel normal, se muestran en la Figura 10

**Figura 10.** Microfotografías de biopsias de piel obtenida para ensayos de permeación y retención. **(A y B).** Piel abdominal recién resecada, aumento 10x y 40x respectivamente. **(C y D).** Piel abdominal luego de 3 meses de congelación, aumento 10x y 40x respectivamente.



E: Epidermis; D: Dermis, DP: Dermis papilar, DR: Dermis reticular, EC: Estrato córneo, L: Estrato lúcido, EB: Estrato basal.

Teniendo en cuenta lo descrito como patrón histológico normal, podemos decir que no se evidencian cambios microscópicos ni macroscópicos relevantes en las pieles congeladas durante 3 meses, comparado con las características que estas presentaban el día de su procesamiento.

#### **4.3. PERMEACIÓN DE LA PcAICI EN PIEL HUMANA**

El tratamiento *ex vivo* de membranas humanas con las formulaciones F1 y F2, en el sistema de celdas de difusión de Franz, no evidenció la presencia de PcAICI en el medio receptor, al realizar los muestreos a las horas 0, 4, 8, 10 y 12 de los ensayos de permeación. Como se describió en materiales y métodos, en cada experimento se utilizaron seis celdas, de las cuales cinco contenían la formulación a evaluar y una fue utilizada como control (vehículo de la formulación). El resultado fue el mismo para todas las formulaciones de PcAICI evaluadas, tanto en la solución (F1) como en nanoemulsión, F2; indicando que en ninguna de estas formulaciones la PcAICI pudo atravesar completamente la piel. Estos ensayos fueron realizados en un tiempo de 12 horas, utilizando la piel de dos donantes diferentes. Con la solución F1 se realizaron 4 ensayos por 12 horas, con la nanoemulsión F2 (código F2-9) se realizaron 3 ensayos y con la nanoemulsión F2 (código F2a) se realizaron 3 ensayos, por 12 horas, como se muestra en la Tabla 8.

Dado que no hubo permeación de PcAICI al medio receptor en los experimentos a 12 horas, se realizaron ensayos que incluían tiempos de hasta 24 horas con el fin de observar si en este tiempo había permeación al medio receptor. Los resultados encontrados mostraron el mismo resultado de no permeación encontrados en los ensayos a 12 horas.

Algunas variables fueron estandarizadas en este trabajo, como el tiempo de duración de los ensayos con celdas de Franz; la temperatura, que fue siempre de 32°C ya que ésta es la temperatura de la piel; y las formulaciones a evaluar, que fueron la solución (F1) y la nanoemulsión, (F2a y F2-9).

**Tabla 8.** Total de ensayos de permeación y retención realizados en el presente trabajo.

<b>FORMULACIONES</b>	<b>12 HORAS</b>	<b>24 HORAS</b>	<b>TOTAL</b>
<b>Formulación 1</b>	4	1	5
<b>Formulación 2-9</b>	3	1	4
<b>Formulación 2-a</b>	3	0	3
<b>TOTAL</b>	10	2	12

Se realizaron biopsias de la piel utilizada como membrana en los ensayos de permeación a las 12 y a las 24 horas, con el fin de observar sus características histológicas luego de los experimentos.

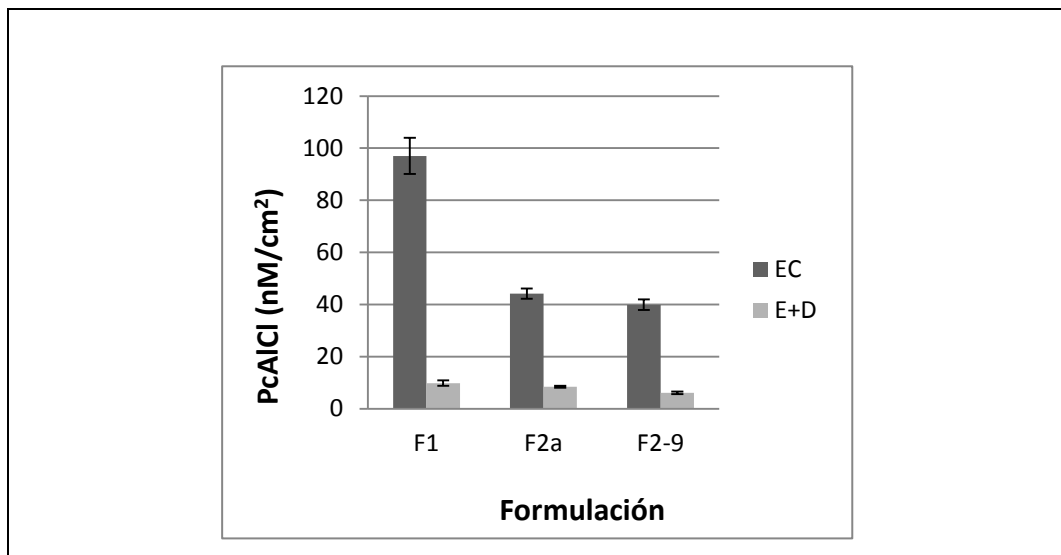
#### **4.4. RETENCIÓN DE LA PcAICI EN LAS CAPAS DE LA PIEL HUMANA**

Dado el resultado anterior, donde se demostró que la PcAICI no pudo permear al medio receptor, se realizaron experimentos para establecer en que capa de la piel fue retenida la PcAICI. El ensayo de retención demostraría si la PcAICI se retuvo en el EC o si pudo llegar hasta capas más profundas de piel: la epidermis o a la dermis. El total de repeticiones y las formulaciones utilizadas se presentaron en la Tabla 8.

Para mostrar estos resultados se realizaron los cálculos teniendo en cuenta el área de la celda de Franz (de 0,196349541cm<sup>2</sup>/mL), donde se obtuvieron resultados en nM/cm<sup>2</sup> (nanomolar de PcAICI/ cm<sup>2</sup>).

Al realizar la cuantificación de la PcAlCl, en los ensayos a 12 horas, se encontraron en el EC retenciones de 39,89 nM para F2-9, 44,17 nM para F2-a y 96,99 nM para F1. En E+D, se encontraron retenciones de 6,12 nM con F2-9, 8,48 nM para F2-a y 9,82 nM para F1. (Ver Figura 11)

**Figura 11.** Retención de PcAlCl en piel humana. Se presenta la retención de PcAlCl en estrato córneo (EC) y en epidermis + dermis (E+D), en nM /cm<sup>2</sup>., obtenida en 4 ensayos con F1, 3 con F2-9 y 3 con F2-a; a 12 horas.



EC: Estrato córneo, E+D: Epidermis + Dermis, F1: Formulación 1, F2: Formulación 2.

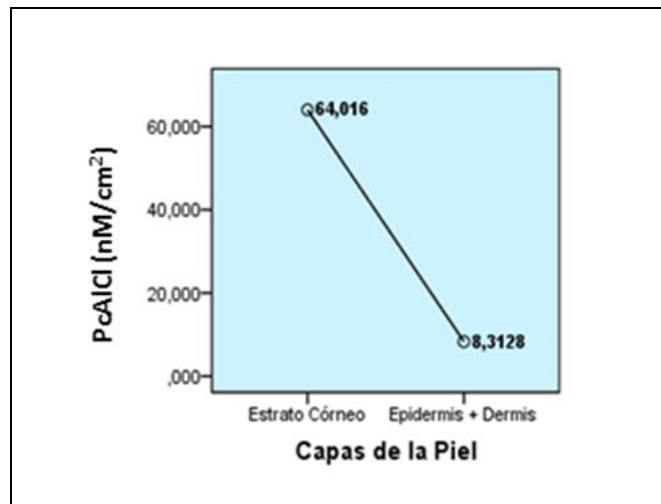
La Tabla 9 muestra los estadísticos de contraste para realizar la prueba de Kruskal-Wallis, para las variables capas de la piel (EC y E+D) y formulaciones (F1, F2a y F2-9). La prueba Kruskal Wallis indicó la presencia de diferencias significativas entre la retención de PcAlCl en EC y en E+D y entre los diferentes tipos de formulaciones ya que los valores de p (0,00) son inferiores al valor de significancia de la prueba ( $p < 0,05$ ).

**Tabla 9.** Estadísticos de contraste para capas de la piel. Prueba de Kruskal-Wallis, para las variables capas de la piel (EC y E+D) y formulación (F1 y F2).

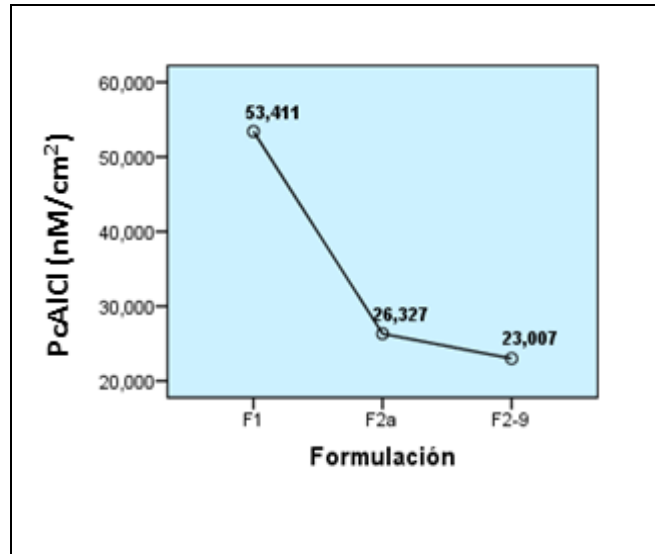
Prueba de Kruskal-Wallis		
Variable de agrupación	Chi-cuadrado	P
Capas de piel	74,25	0,00
Formulación	11,54	0,00

Como se muestra en la Figura 12, en el EC se detecta una mayor retención promedio de PcAICI, siendo ésta de 64,016 mientras que en E+D la concentración promedio es de 8,3128. La Figura 13 muestra la retención promedio de la PcAICI en piel, con las formulaciones utilizadas.

**Figura 12.** Diferencia en la concentración de PcAICI promedio en el EC y en E+D.

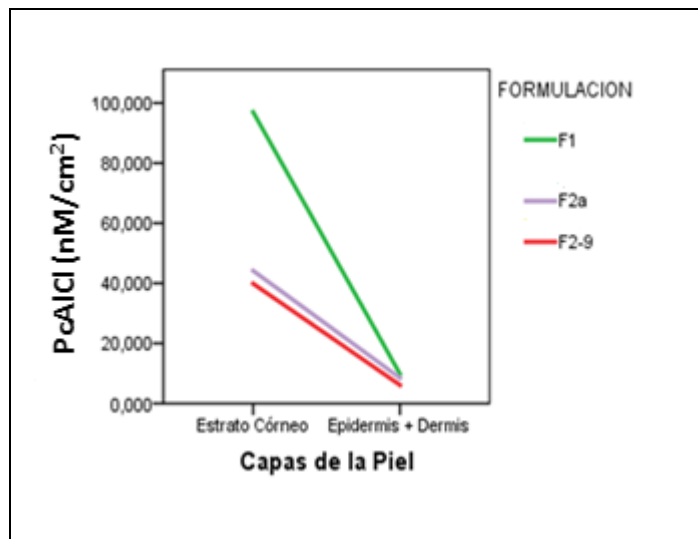


**Figura 13.** Retención promedio de la PcAlCl en piel, con las formulaciones utilizadas.



Al realizar las comparaciones múltiples (formulaciones y capas de piel, Ver Figura 14) mediante la prueba de Mann-Whitney se encuentra que existen diferencias significativas en los resultados obtenidos cuando se aplican las formulaciones F1 y F2a, también al aplicar las formulaciones F1 y F2-9 ya que en ambos casos los valores de p fueron inferiores al valor de significancia de la prueba ( $p < 0,05$ ); no se encontraron diferencias significativas en los resultados de las retención, al aplicar las formulaciones F2a y F2-9 ya que en este caso los valores de p fueron superiores al valor de significancia de la prueba ( $p < 0,05$ ).

**Figura 14.** Incidencia entre concentraciones, capas de la piel y la formulación utilizada.



F1: Formulación 1, 2a: Formulación 2a, F2-9: Formulación 2-9, EC: Estrato córneo, E+D: epidermis + dermis.

Con el anterior análisis podemos decir que: Las formulaciones F2 a y F2-9 tuvieron una similar retención en el EC y en E+D. La formulación que más se retuvo en el EC y en E+D fue la fue la F1.

#### **4.5. VALORACIÓN HISTOLÓGICA DE LA PIEL HUMANA DESPUÉS DE LOS EXPERIMENTOS.**

Para conocer el estado de la piel utilizada como membrana luego de los ensayos de permeación, se tomaron biopsias, a las 12 y a las 24 horas del ensayo (al finalizar experimentos), las cuales fueron procesadas y coloreadas con H-E, según

el manual de procedimientos del laboratorio del departamento de patología de la escuela de medicina UIS, como se describe en materiales y métodos.

En cada experimento se utilizaron seis celdas, en las cuales se usó como membrana piel humana. Una vez concluido el tiempo del ensayo, la piel se desmontó de las celdas y se conservó en frascos con formol buferado, hasta su procesamiento.

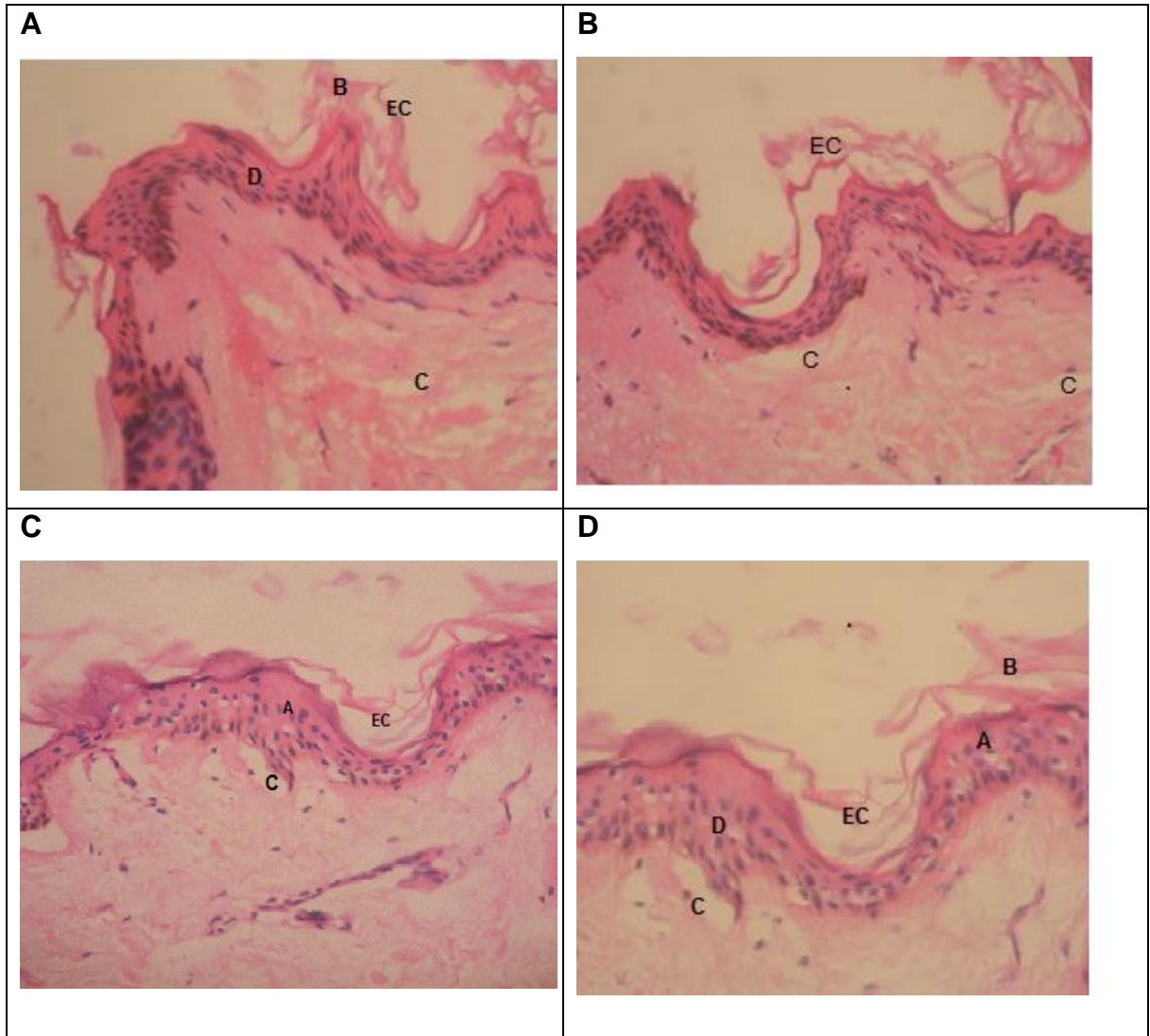
Las biopsias de piel luego de un experimento de 12 horas mostraron desprendimiento parcial del EC, y una leve fragmentación de colágeno, que se presenta como la disminución en la captación del colorante (Ver Figura 15A y 15B).

En las biopsias de piel luego de un ensayo a 24 horas, se observó el desprendimiento casi total del EC, se evidenció la presencia de espacios blancos a nivel de la epidermis, que pueden corresponder a edema intraepidérmico, se observó alteración en la disposición de la células en los diferentes estratos de la epidermis. Presentó marcada fragmentación de colágeno, que se evidencia por la disminución en la capacidad para captar el colorante (Ver Figura 15C y 15D).

La piel recién resecada, presentó una captación normal del colorante y mostró a nivel de la epidermis, que las células conservan su orden dentro del epitelio estratificado (Ver Figura 10). Podemos decir que luego de un ensayo a 12 horas se presentan los cambios antes mencionados, y a las 24 horas estos mismos cambios se muestran de manera más notoria, todos estos relacionados con el tiempo que la piel estuvo en la celda de Franz.

En la Figura 15 se muestran las microfotografías de la piel luego de los ensayos de permeación.

**Figura 15.** Microfotografías de la piel utilizada en los ensayos de permeación. (A y B) Luego de un ensayo de permeación de 12 horas. (C y D) Luego de un ensayo de permeación de 24 horas.



A: Edema intraepidérmico (espacios en blanco), B: EC desprendido C: Colágeno fragmentado, D: Cambios en el epitelio estratificado EC: Estrato córneo.

#### **4.6. ANÁLISIS HISTOLÓGICO EN PIEL CON ULCERACIONES.**

Este estudio se realizó como una parte complementaria a los ensayos en piel humana y con el propósito de dar respuesta al objetivo 3, que consistió en “Determinar las características histopatológicas de las ulceraciones cutáneas crónicas por leishmaniasis cutánea y por causas diferentes a ésta, como aproximación al comportamiento de las formulaciones tópicas en la ulceración crónica por leishmaniasis cutánea”.

Para realizar el análisis histológico de la piel humana con ulceraciones, fue necesario determinar las características histológicas de la piel normal, como se mostró anteriormente en la Figura 10. Con el fin de comparar las características histopatológicas de las lesiones de LC, con otros tipos de ulceraciones cutáneas crónicas no LC, se analizaron biopsias de piel coloreadas con H-E. En la Tabla 10 se muestra el origen de las biopsias analizadas así como el diagnóstico realizado por patología. Estas muestras fueron recolectadas como se describe en materiales y métodos en el numeral 3.6.1.

**Tabla 10.** Total de biopsias examinadas.

<b>BIOPSIA</b>	<b>PROCEDENCIA</b>	<b>DX MICROSCOPICO</b>
1	L1	Lesión en piel compatible con LC
2	L1	Lesión en piel compatible con LC
3	L1	Lesión en piel compatible con LC
4	L1	Lesión en piel compatible con LC
5	L1	Lesión en piel compatible con LC
6	L1	Lesión en piel compatible con LC
7	L1	Lesión en piel compatible con LC
8	L1	Lesión en piel compatible con LC
9	L1	Lesión en piel compatible con LC
10	L1	Lesión en piel compatible con LC
11	L2	Ulceración crónica
12	L2	Lesión en piel compatible con LC
13	L2	Ulceración crónica
14	L2	Ulceración crónica
15	L2	Ulceración crónica
16	L2	Ulceración crónica
17	L2	Ulceración crónica
18	L2	Ulceración crónica
19	L2	Lesión en piel compatible con LC
20	L2	Ulceración crónica
21	L2	Ulceración crónica
22	L2	Ulceración crónica

L1: Laboratorio de Histocitopatología Dr. Alfredo Acevedo, L2. Laboratorio de Patología Dr. Julio Cesar Mantilla.

Para el análisis histológico de cada una de las biopsias, se realizó la observación detallada de las características presentes en las tres capas de la piel: epidermis, dermis e hipodermis. En el formato para la lectura de las biopsias, se identificó el número de cada biopsia. Se relacionaron de forma detallada, cada capa de la piel, con las variables que posiblemente se pudieran encontrar en una ulceración crónica, como se describe en materiales y métodos. Los resultados obtenidos de las tres lecturas se procesaron en el software Stata 10.0, de cuyo análisis se obtuvo el índice *Kappa* corregido (*K*) para cada una de las variables estudiadas. El índice

$K$  midió el grado de concordancia entre los tres observadores, según la valoración indicada en la Tabla 11.

En las Tablas 12, 13 y 14, se expone el índice  $K$  corregido, obtenido para cada una de las variables estudiadas en epidermis, dermis e hipodermis respectivamente. Dada la baja concordancia entre los tres observadores demostrada por el insignificante a mediano valor de  $K$  para la mayoría de las variables ( $K = 0,2$  a  $0,4$ ), se realizó el análisis nuevamente en el software Stata 10.0, contemplando el resultado de los observadores de forma dicotómica, es decir teniendo en cuenta presencia o ausencia de la característica a evaluar, y no por cruces como se planteó en la metodología (Ver Materiales y Métodos numeral 3.6.3). Solo en algunos casos, se obtuvo un mejor índice  $K$  utilizando la forma dicotómica, en epidermis este índice mostro un grado de acuerdo mayor entre los observadores para las variables: Acantosis, hiperqueratosis y paraqueratosis. Para espongiosis, el valor de  $K$  disminuyó. (Ver Tabla 12)

En dermis, el índice  $K$  dicotómico mostró un grado de acuerdo mayor entre observadores para las variables: Infiltrado granulomatoso, histiocitos, plasmocitos, células gigantes, fibrosis, vasos sanguíneos proliferativos y con endotelio prominente.

En hipodermis, el  $K$  dicotómico mostró mayor grado de acuerdo entre los observadores para las variables: Linfocitos, plasmocitos y vasos sanguíneos con endotelio prominente.

**Tabla 11.** Escala para valoración de *Kappa*.

<b>Kappa</b>	<b>Grado de acuerdo</b>
<0,00	Sin acuerdo
0,00 – 0,20	Insignificante
0,21 – 0,40	Mediano
0,41 – 0,60	Moderado
0,61 – 0,80	Sustancial
0,81 – 1,00	Casi perfecto

Tomado de Landis J.R., Koch G.G. (1977).

**Tabla 12.** Índice *Kappa* para las variables estudiadas en epidermis.

<b>EPIDERMIS</b>		
<b>VARIABLE</b>	<b><i>Kappa</i></b>	<b><i>Kappa</i> Dicotómico</b>
<b>Acantosis</b>	0,293	0,431
<b>Ulceración</b>	0,127	0,137
<b>Hiperqueratosis</b>	0,062	0,228
<b>Paraqueratosis</b>	0,287	0,575
<b>Atrofia</b>	0,467	0,467
<b>Espongiosis</b>	0,159	0,018

**Tabla 13.** Índice *Kappa* para las variables estudiadas en dermis.

<b>DERMIS</b>			
	<b>VARIABLE</b>	<b>Kappa</b>	<b>Kappa dicotómico</b>
	<b>Infiltrado granulomatoso</b>	0,126	0,236
<b>Composición</b>	<b>Linfocitos</b>	0,380	0,380
	<b>Histiocitos</b>	0,348	0,633
	<b>Plasmocitos</b>	0,175	0,422
	<b>PMN</b>	0,195	0,199
	<b>Eosinófilos</b>	0,399	0,389
	<b>Células gigantes</b>	0,05	0,111
		<b>Fibrosis</b>	0,150
	<b>Amastigotes</b>	0,749	0,749
<b>Vasos sanguíneos</b>	<b>Proliferativos</b>	0,209	0,309
	<b>Endotelio prominente</b>	0,331	0,505
	<b>Extravasación eritrocitos</b>	0,352	0,318
	<b>Dilatados</b>	1,0	1,0

**Tabla 14.** Índice *Kappa* para las variables estudiadas en hipodermis.

<b>HIPODERMIS</b>			
	<b>VARIABLE</b>	<b>Kappa</b>	<b>Kappa dicotómico</b>
	<b>Infiltrado granulomatoso</b>	1,0	1,0
<b>Composición</b>	<b>Linfocitos</b>	0,071	0,200
	<b>Histiocitos</b>	0,327	0,332
	<b>Plasmocitos</b>	0,405	0,555
	<b>PMN</b>	0,350	0,350
	<b>Eosinófilos</b>	0,484	0,484
	<b>Células gigantes</b>	0,308	0,301
	<b>Fibrosis</b>	0,294	0,200
	<b>Amastigotes</b>	0,99	0,99
<b>Vasos sanguíneos</b>	<b>Proliferativos</b>	0,483	0,476
	<b>Endotelio prominente</b>	0,364	0,476
	<b>Extravasación eritrocitos</b>	0,391	0,527
	<b>Dilatados</b>	0,366	0,205

Para algunas de las variables estudiadas, se observó un grado de acuerdo moderado entre los observadores. Por medio del análisis realizado, fue posible establecer ciertas características comunes entre ulceraciones por LC, en las cuales se observó una concordancia moderada. En epidermis, la paraqueratosis; en dermis, la presencia de histiocitos y plasmocitos, vasos sanguíneos dilatados y la presencia de amastigotes y en hipodermis, la presencia de amastigotes y el infiltrado granulomatoso, todas estas presentes en las lesiones compatibles con LC.

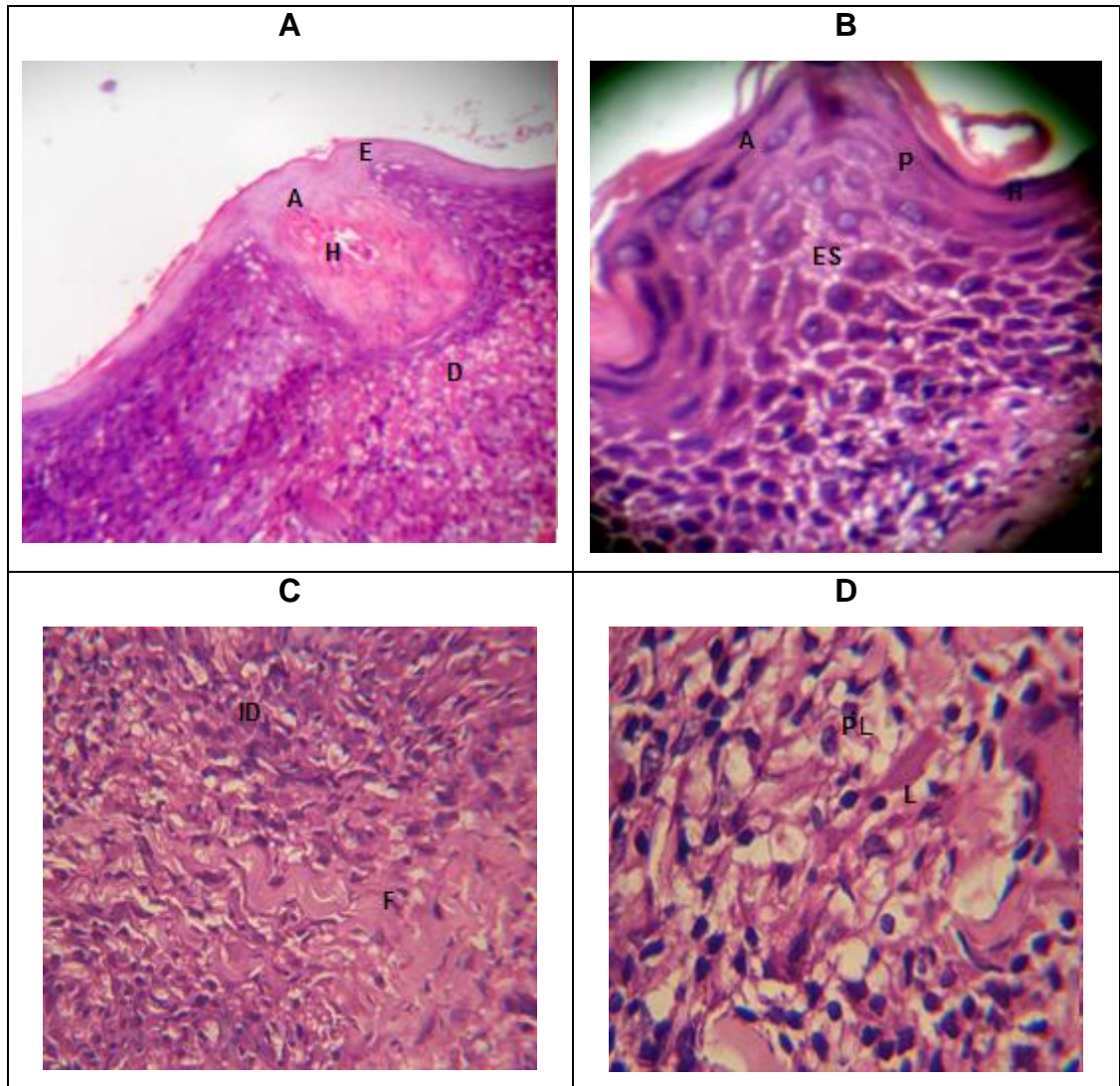
Debido a que no se obtuvo un grado de concordancia alto entre los observadores, se describen a continuación las características histológicas más relevantes observadas en las ulceraciones estudiadas.

**4.6.1 Características encontradas en la piel con ulceraciones crónicas compatibles con LC.** A nivel de la epidermis, se puede observar que la piel se encuentra parcial o totalmente recubierta por una costra, evidenciando un epitelio con extensos cambios por ulceración y acantosis irregular. No hay atipia de queratinocitos ni atrofia. En todos los casos se observó hiperqueratosis y paraqueratosis moderada. Ocasionalmente se presentó espongiosis.

La dermis e hipodermis mostraron inflamación crónica linfocitoplasmocitaria que va de moderada a severa, con formación de células gigantes multinucleadas y en algunos casos se observaron amastigotes al interior de los macrófagos. Se evidencia fibrosis y vasos sanguíneos dilatados, proliferativos y con un endotelio prominente.

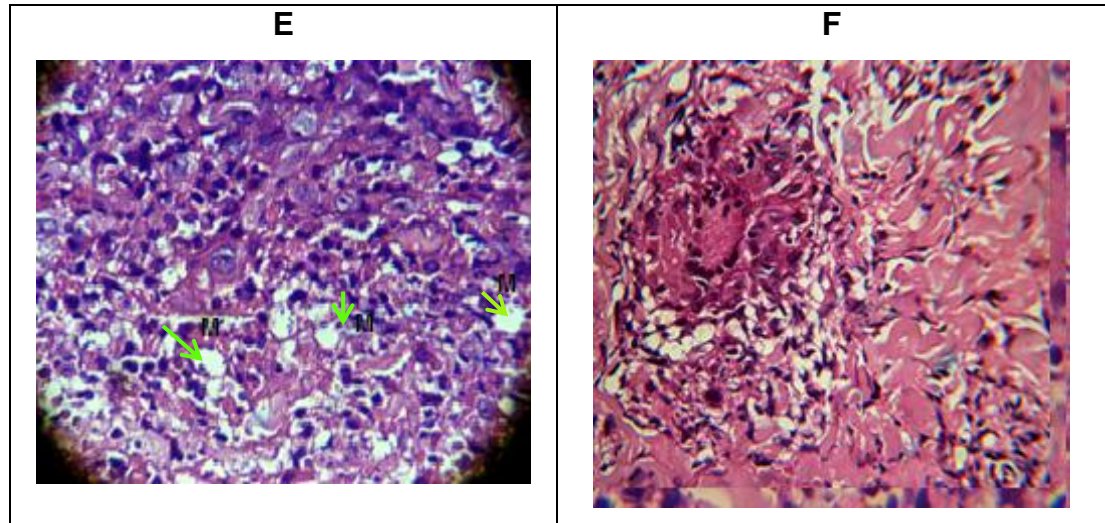
En la Figura 16 se presentan las características histológicas más relevantes de las lesiones compatibles con LC.

**Figura 16.** Microfotografías de piel con ulceración crónica compatible con LC. **(A y B)** Piel ulcerada, aumento de 10x y 40x respectivamente, hiperqueratosis, acantosis y espongiosis; **(C y D)** Infiltrado dérmico denso, presencia de histiocitos, linfocitos y plasmocitos. 10x y 40x respectivamente. **(E)** Amastigotes dentro de los macrófagos, infiltrado severo. Aumento 40X. **(F)** célula gigante multinucleada, tejido fibroso, abundante infiltrado liohistioplasmocitario. Aumento 40x.



A: Acanthosis; D: Dermis; E: Epidermis, ES: Espongiosis, F: Fibrosis, H: Hiperqueratosis; ID: Infiltrado dérmico; L: Linfocito, M: Macrófago; P: Paraqueratosis, PL: Plasmocito; las flechas indican el amastigote ubicado dentro del macrófago.

**Figura 16.** Microfotografías de piel con ulceración crónica compatible con LC. (Continuación)

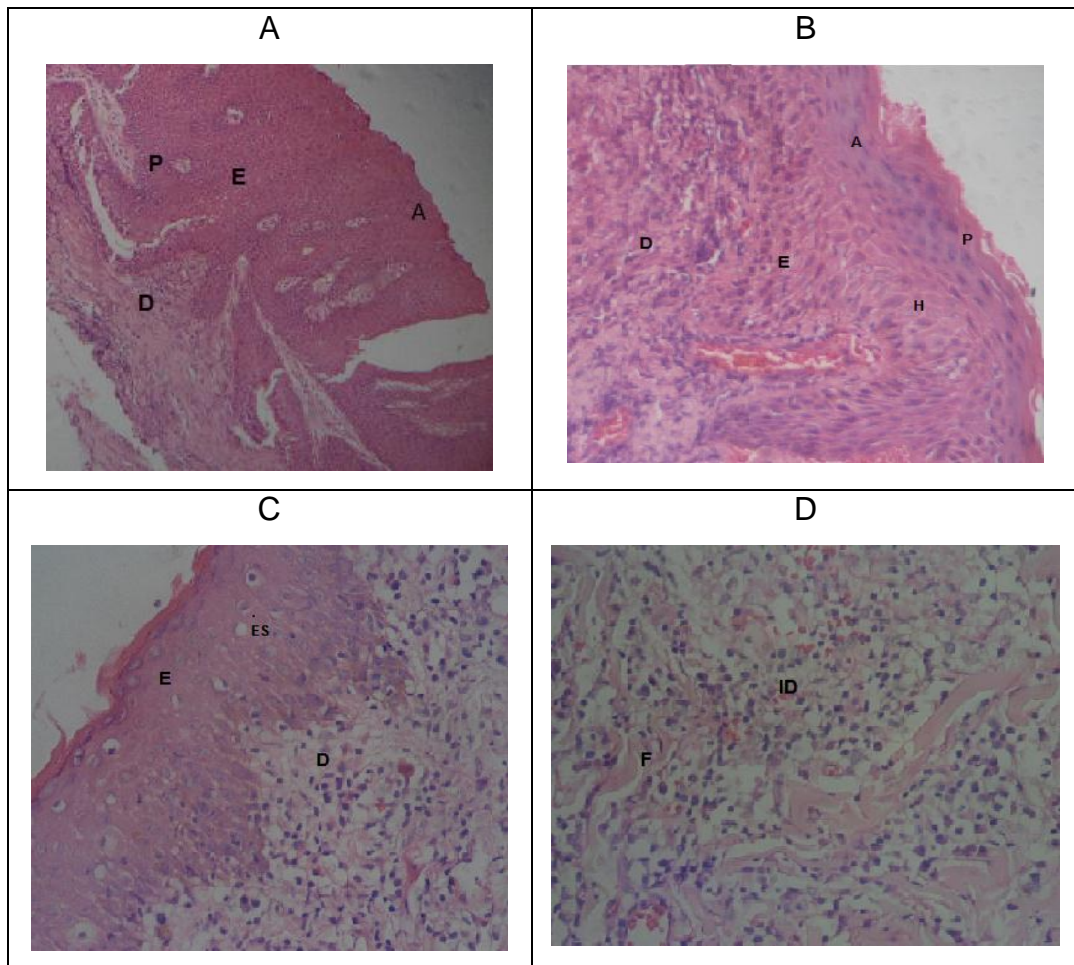


A: Acanthosis; D: Dermis; E: Epidermis, ES: Espongiosis, F: Fibrosis, H: Hiperqueratosis; ID: Infiltrado dérmico; L: Linfocito, M: Macrófago; P: Paraqueratosis, PL: Plasmocito; las flechas indican el amastigote ubicado dentro del macrófago.

**4.6.2 Características encontradas en la piel con ulceraciones crónicas por causa diferente a la LC.** La epidermis muestra ulceración e hiperqueratosis, en algunos casos acantosis, escasa espongiosis. La dermis presenta fibrosis que va desde leve hasta severa, no se evidencia infiltrado granulomatoso. Pueden observarse vasos sanguíneos dilatados, proliferativos y que muestran un endotelio prominente, con presencia de extravasación de eritrocitos. Los linfocitos e histiocitos se encuentran en poca cantidad.

En la Figura 17 se muestran las características histológicas más relevantes de las ulceraciones crónicas por causa diferente a la LC.

**Figura 17.** Microfotografías de piel con ulceración crónica por causa diferente a la LC. **(A y B)** Epidermis con evidente hiperparaqueratosis y acantosis. Aumento 10x y 40x respectivamente. **(C)** Epidermis con hiperqueratosis, acantosis y espongiosis, en dermis se observa un infiltrado moderado y fibrosis moderada. Aumento 40x. **(D)** Infiltrado dérmico moderado, fibrosis. Aumento 40x.



A: Acanthosis; D: Dermis; E: Epidermis, ES: Espongiosis, F: Fibrosis, H: Hiperqueratosis; ID: Infiltrado dérmico; P: Paraqueratosis.

La Tabla 15 muestra las características comunes encontradas en las biopsias estudiadas, así como aquellas características observadas solo en las ulceraciones compatibles con LC, todas estas dependientes en menor o mayor grado, del tiempo de evolución de la lesión.

**Tabla 15.** Características histológicas observadas en las biopsias examinadas.

<b>Características histológicas comunes a todas las ulceraciones</b>	<b>Características histológicas encontradas en las ulceraciones por LC</b>
Fibrosis	Infiltrado granulomatoso
Espongiosis	Células gigantes.
Ulceración	Granulomas
Vasos sanguíneos dilatados	Amastigotes
Linfocitos, plasmocitos, histiocitos.	

## 5. DISCUSION

Con el fin de obtener información acerca del comportamiento de la PcAlCl en cada una de las formulaciones utilizadas F1 y F2, se realizaron los espectros de emisión y absorción de este compuesto utilizando como solventes etanol, DMSO y PBS 7,4 -SDS 2%. Estos espectros de absorción y emisión proporcionaron información importante con respecto al estado agregado o monomérico en el que se encontraban las moléculas de PcAlCl en la formulación. Estudios publicados por Rossetti *et al.*, 2011 donde realizaron los espectros de emisión y de absorción de la ftalocianina de zinc (ZnPc) que fue preparada en una nanoemulsión con una fase acuosa (compuesta por polietilenglicol y agua) y una fase oleosa (compuesta por una mezcla de monoleato de sorbitán, polisorbato, aceite de canola y  $ZnPcSO_4$  disuelta en DMSO); compararon los espectros obtenidos cuando la nanoemulsión se diluyó con DMSO y cuando esta fue diluida con agua. En el trabajo mencionado se evidenció la formación de dímeros y de agregados de la ftalocianina en medio acuoso, demostrado por la presencia de bandas Q y soret amplias en el espectro de absorción y débil emisión de fluorescencia en el espectro de emisión; además se comprobó la no formación de estos dímeros o agregados cuando la nanoemulsión se diluyó en DMSO, observándose en los espectros, las bandas características de este Pc. Estas características, coinciden con lo descrito en la publicación de Howel *et al.*, 1998.

En nuestro trabajo, al comparar los espectros realizados con etanol y DMSO como diluentes, con los obtenidos cuando se utilizó como diluyente el PBS-SDS 2%, se evidenciaron diferencias importantes, las cuales pueden explicarse según lo enunciado por Dhami *et al.*, 1996, y Nunes *et al.*, 2004; donde sugieren que la PcAlCl presenta tendencia a la formación de dímeros cuando se encuentra en medios acuosos, como resultado de su esqueleto hidrofóbico, que evita el contacto con el agua.

Por lo tanto, podría considerarse que en PBS-SDS 2%, algunas de las moléculas de PcAlCl se encontraban en estado asociado, probablemente como dímeros apilados, lo que pudo dar origen a la formación de dos bandas en el espectro de emisión, y a que su máximo pico de fluorescencia se presentara a una longitud de onda de 730 nm, diferente al etanol y DMSO, que presentaron su máximo pico de fluorescencia a 680 nm.

En un estudio realizado por Rauf *et al.*, 2012, donde se probó el efecto de diferentes solventes en los espectros de emisión y de absorción de la ftalocianina de cobre (PcCu), encontraron que estos espectros mostraron cambios cuando fueron realizados con los diferentes solventes. Cuando el espectro de emisión se realizó con solventes orgánicos, estos conservaron sus máximos picos de emisión de fluorescencia a una misma longitud de onda. Cuando el espectro se realizó con agua, se observaron dos picos de emisión, donde el más alto correspondía al estado monomérico y el más bajo a un estado agregado del FS; éste espectro realizado en agua, presentó el pico máximo de intensidad de fluorescencia a una longitud de onda mayor que los espectros en los solventes orgánicos.

En nuestro estudio, al comparar el espectro de absorción de la F1 y de la F2, pueden evidenciarse que los picos de absorbancia máxima fueron menores en la F2, lo que estaría relacionado con la concentración de PcAlCl en la formulación, dado que se trata de dos formulaciones de PcAlCl diferentes.

El espectro de absorción obtenido con PBS-SDS 2% mostró un pico de máxima absorbancia menor que el observado con etanol y DMSO, lo que podría también explicarse como se mencionó anteriormente, por la formación de agregados de PcAlCl en este solvente.

Al determinar la concentración de la PcAlCl el día de su preparación y en los días posteriores, se pudo establecer que las concentraciones de PcAlCl obtenidas no

presentaron modificaciones importantes. Esto nos sugiere que los componentes de las formulaciones tanto en F1 como en F2 pudieron mantener la estabilidad química de la PcAlCl.

A nivel macroscópico, no se evidenció precipitación de los componentes de las formulaciones, ni formación de sobrenadantes, así como tampoco se observó separación de las fases de la nanoemulsión, indicando también un adecuado almacenamiento.

Los fragmentos de piel obtenidos para la realización de los ensayos con celdas de Franz, presentaron características histológicas propias de la piel abdominal normal el día de su obtención y tiempo después de su conservación.

Según la directriz de la Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico del año 2004, (OCDE 2004), en su aparte de métodos *in vitro* para la absorción en piel, las propiedades de permeabilidad de la piel se conservan luego de la resección, debido a que quien confiere esta permeabilidad es el EC, compuesto por células muertas, es decir, hace parte de la epidermis no viable. La OECD 2004, es una guía que ha sido diseñada para proporcionar información al respecto de la absorción de sustancias aplicadas a la piel reseçada. Esta directriz internacional es muy citada en diversas publicaciones en el campo de los ensayos de absorción cutánea, ya que orienta en el diseño y selección de procedimientos apropiados en este tipo de estudios, para garantizar la fiabilidad de los resultados obtenidos.

Otra directriz internacional consultada fue la guía del Centro Europeo para la validación de Métodos Alternativos, "ECVAM 13: *percutaneous absorption*", donde también especifican que la piel una vez preparada (desprovista del tejido adiposo) puede conservarse a -20°C envuelta en papel aluminio.

Seguidas estas recomendaciones y con el análisis histológico de la piel obtenida para los ensayos, podemos decir que la piel utilizada en los ensayos realizados

conservó sus características para ser utilizada como membrana en los ensayos con celdas de Franz.

En la metodología propuesta para este trabajo, se consideró realizar los ensayos de permeación y retención a 12 horas dado que este tipo de experimentos no se habían realizado previamente en el laboratorio, por lo cual se quiso iniciar con tiempos cortos para observar el comportamiento de la piel de forma gradual. Otra razón para realizar los ensayos en su mayoría a 12 horas, fue la poca posibilidad de obtener suficiente piel para aumentar el número de experimentos. Esto debido a que no siempre las pacientes estaban dispuestas a donar la piel reseca durante la cirugía. Por otra parte, en las cirugías de corrección de eventraciones, en algunos casos se obtenían tejidos con cicatriz previa, lo que obligaba a descartar estos fragmentos de piel.

El hecho de que no se presentara permeación al medio receptor con las formulaciones evaluadas, es de gran importancia ya que la idea de la formulación tópica con PcAlCl, es que la ftalocianina pueda llegar hasta la dermis y retenerse allí, dado que es en ésta capa de la piel donde se alojan los macrófagos parasitados por *Leishmania* (Moraes & Silveira, 1994) pudiendo de esta manera ejercer su efecto fototóxico de forma localizada.

La no detección de PcAlCl en el medio receptor, se considera un punto positivo con respecto a los sistemas de liberación empleados para la PcAlCl en este trabajo, debido a que el objetivo de la TFD tópica es aumentar la penetración de PS a través del EC en las capas de la piel, evitando su absorción sistémica que puede causar una fotosensibilización generalizada del paciente (Rossetti *et al.*, 2011).

Teóricamente, la ausencia de permeación al medio receptor, puede explicarse, en primer lugar, según el postulado de Osborne *et al.*, 1991, donde se afirma que el bajo contenido fase oleosa en una formulación, hace que esta sea insuficiente

para que el fármaco pueda difundir libremente a través de la piel; en segundo lugar, y según Godin & Touitou., 2006, la falta de la microcirculación cutánea en el experimento *in vitro* puede hacer difícil la difusión del fármaco a través de las capas más profundas hacia el medio receptor.

A pesar de no haber obtenido permeación al medio receptor en los tiempos de 12 y 24 horas, es importante establecer cuáles fueron los factores que pudieron intervenir en que la PcAlCl no se detectara en el medio receptor. La PcAlCl es un compuesto lipofílico, con un peso molecular de 574,96 g/mol y un coeficiente de partición octanol agua calculado de 7,3 (Valdivieso 2010), dadas estas características, al entrar en contacto con la piel, presenta tendencia a permanecer en el estrato córneo y no penetrar de forma suficiente en medios más hidrófilos como la dermis inferior o el mismo medio receptor. Por tal motivo, para ser utilizada como PS en TFD, se requiere que esta sea administrada en sistemas de liberación de fármacos que permitan su penetración a la piel, dentro de estos sistemas se encuentran las nanoemulsiones (F2) y las soluciones (F1) que emplean promotores de la permeación transdérmica, como el ácido oleico y Tween 20 utilizados en F2 y DMSO y Tween 80 utilizados en F1.

Por otra parte, dada la tendencia de la PcAlCl a formar agregados en medios acuosos, al entrar en contacto con el medio receptor podría haber originado la formación de éstos y no fuera posible hacer su detección en el fluorómetro. Sin embargo esta posibilidad tiene poco peso, dado que las curvas de calibración de PcAlCl en PBS-SDS 2% sobre las que se realizaron las determinaciones de los experimentos de permeación, tuvieron un rango de detección mínimo de 0,730 nM y máximo de 139,955 nM, lo cual garantizó que concentraciones muy bajas de PcAlCl pudieran ser detectadas.

En estudios realizados por Aguzzi *et al.*, 2008, compararon el método de Saarbruecken, que es una técnica para determinar la penetración del fármaco en las capas de la piel después de diferentes tiempos de incubación; y las celdas de

Franz, para evaluar la penetración transdérmica de un compuesto, encontrando diferencias entre los dos métodos, las cuales fueron atribuidas a una notable penetración de agua en la piel desde el compartimiento receptor en los ensayos con celdas de Franz. Según el autor, esto probablemente se debe a que la piel actúa como "Sink" o sumidero para el medicamento, explicando así la ausencia del compuesto evaluado en el medio receptor. En las celdas de Franz, la presencia del medio receptor determina una hidratación no fisiológica del tejido, que resulta en un aumento del grosor de la piel comparado con el método de Saarbruecken, donde prolongados tiempos de incubación no afectan la hidratación de la piel. Afirman entonces que "No fue posible prolongar sus experimentos hasta 24 h debido a la sobrehidratación y la inflamación consiguiente de la piel".

Experimentos realizados por Wagner *et al.*, 2000 encontraron resultados similares en ensayos donde compararon la penetración en la piel utilizando el método de Saarbruecken y el de celdas de Franz. Usando ácido flufenámico como fármaco modelo, detectaron cantidades del compuesto en las capas de la piel después de largos tiempos de incubación y no detectaron el fármaco en la solución receptora, sugiriendo que la piel actúa como un lavadero evitando la penetración del fármaco.

Se encuentran en la literatura, informes de ensayos de permeación en piel humana y en otros modelos como piel de cerdo, piel de rata, entre otros, donde utilizando nanoemulsiones como sistemas de liberación de fármacos, se detectó permeación de algunos compuestos al medio receptor. Uno de estos ensayos es el reportado por Abu-Elyzaid *et al.*, 2011, donde se probó una nanoemulsión de tenoxicam, encontrando un perfil de liberación del fármaco al medio receptor después de dos horas de iniciado el ensayo. Así mismo, un estudio reportado por Primo *et al.*, en 2006, describe el uso de una nanoemulsión magnética de Foscan (un fotosensibilizador utilizado en TFD de cáncer de piel), que pudo penetrar la piel, mostrando un perfil de liberación al medio receptor, luego de 4 horas del ensayo.

Si bien no se detectó PcAlCl en el medio receptor, esta sí pudo retenerse en las capas de la piel. La retención de PcAlCl observada en el EC y en Epidermis + Dermis, con las diferentes formulaciones, nos da una idea de cómo fue la interacción entre los componentes de las formulaciones y el EC, es decir, si la formulación fue un buen sistema de liberación del fármaco para poder atravesar el EC y pasar a las capas más profundas de la piel.

Para discutir las razones por las cuales la PcAlCl se retuvo principalmente en el estrato córneo, es de gran importancia considerar la composición de las formulaciones utilizadas y el mecanismo por el cual un compuesto hidrofóbico puede ingresar a la piel, teniendo en cuenta las características histológicas, bioquímicas y estructurales de la organización del EC.

Los fármacos pueden penetrar el EC por la vía intercelular, transcelular, o por medio de los apéndices cutáneos. (Trommer *et al.*, 2006). Considerando las características del EC, el carácter hidrófobo de la PcAlCl y la composición de F1 y F2, podríamos decir que la ruta de penetración más probable para estas formulaciones fue la vía intercelular o vía de los lípidos. Los espacios intercelulares del EC consisten en una mezcla de lípidos; entre estos ceramidas, ácidos grasos libres y sus ésteres, y colesterol y sus sulfatos, que se estructuran como una bicapa. La mayoría de los fármacos lipófilos pasan a través de esta región, y se llama una vía de lípidos. La cabeza polar de los lípidos se enfrenta a una región acuosa, formando una ruta polar por la que los fármacos hidrofílicos pueden penetrar.

En cuanto a la composición de las formulaciones, la F1, es una solución de PcAlCl en agua tipo I, Tween 80 y DMSO. El DMSO, es un solvente orgánico que se ha utilizado como promotor de la permeación transdérmica en otras formulaciones con paramomicina (El On *et al* 1984), algunos de sus mecanismos de acción se han expuesto en diversas publicaciones, entre estos se encuentran la extracción

de lípidos, la denaturación de las proteínas del EC, distorsión del EC como resultado de las altas tensiones osmóticas, todas estas inducidas por el transporte de agua y DMSO dentro del tejido. (Anigbogu *et al.*, 1995). El Tween 80 es un surfactante no iónico, considerado no tóxico y no irritante, que promueve la permeación cutánea, ha sido aprobado como un excipiente farmacéutico por la FDA. La formulación (F1) utilizada en nuestro trabajo, fue probada en un estudio realizado por Kyriazi *et al.*, 2007, en un modelo murino, donde se evidenciaron los buenos resultados obtenidos con el uso de DMSO y Tween 80, como potenciadores de la permeación, aumentando la profundidad de penetración de la PcAlCl en la piel tumoral de ratones.

La F2 es una nanoemulsión, con una fase oleosa compuesta por fosfatidilcolina, cloroformo y ácido oleico, en la cual se encuentra disuelta la PcAlCl; y una fase acuosa compuesta de agua tipo I, glicerol y Tween 20.

La PcAlCl disuelta en la fase oleosa de la nanoemulsión, podría penetrar los lípidos del EC, inestabilizando su estructura de bicapa incrementando así la permeabilidad. Un fármaco lipofílico como la PcAlCl, puede entonces permear más fácilmente a través de la vía de lípidos del estrato córneo. Cuando los componentes de la fase acuosa de la nanoemulsión entran en la vía polar, se incrementa el volumen interlamelar de los lípidos del estrato córneo, lo que resulta en una alteración de su estructura al interior de la bicapa; estos componentes, tienen la función de sobrehidratar el estrato córneo contribuyendo así la permeabilidad de este, como lo afirma también en su trabajo, Abu-Elyzaid *et al.*, 2011.

En las formulaciones tópicas, la función del vehículo es modificar la penetración del fármaco a través de la piel, muchos de los vehículos contienen potenciadores químicos de la permeación para alcanzar este objetivo (Kawakami, *et al.*, 2002). El uso de estos potenciadores químicos en algunas ocasiones puede ser perjudicial,

en especial en aplicaciones crónicas, ya que algunos de estos pueden ser irritantes.

La nanoemulsión es una buena estrategia para mejorar la permeación transdérmica de la PcAlCl. Las nanoemulsiones son dispersiones de aceite y agua estabilizados por una película interfacial de moléculas de tensioactivo, que idealmente deben tener un tamaño de partícula o gota inferior a 100 nm (Trotta *et al.*, 1996). Diversos estudios han demostrado que las nanoemulsiones poseen mejores propiedades para la entrega transdérmica y dérmica de compuestos *in vitro* (Delgado-Charro *et al.*, 1997; Lee *et al.*, 2003) e *in vivo* comparado con las emulsiones (Kreilgaard *et al.*, 2001) y geles (Gasco *et al.*, 1991; Kriwet *et al.*, 1995).

En el presente trabajo, los potenciadores de la permeación de la F1 (DMSO y Tween 80) y de F2 (Ácido oleico y Tween 20), hicieron que la PcAlCl tuviera mayor posibilidad de penetrar el EC, presentándose una mayor retención de PcAlCl en esta capa de la piel. Dado que la finalidad de la formulación es que la PcAlCl pudiera llegar hasta la dermis en mayor cantidad, es necesario analizar las razones por las que esta no tuvo mayor retención en la dermis, aquí podrían considerarse algunas condiciones de la formulación como su viscosidad, la concentración y proporción de los promotores de la permeación, ya que algunos potenciadores son dependientes de la concentración, por lo tanto es necesario revalorar la concentración óptima para que su funcionamiento como promotor de la permeación sea eficaz. Por otra parte, el tamaño de partícula de las nanoemulsiones, y su viscosidad también pudieron afectar a su eficacia; donde el tamaño de partícula pequeño y la baja viscosidad de la nanoemulsión lo convierten en un excelente vehículo para mejorar la absorción percutánea de PcAlCl, haciendo mayor el número de vesículas que pueden interactuar en un área fija de estrato córneo.

El análisis estadístico que comparó la retención de PcAlCl en EC y E+D, mostró diferencias significativas en estas capas de la piel, lo que nos confirma la

propiedad de barrera del EC y la dificultad para que las formulaciones F1 y F2, funcionen como un vehículo eficiente para llevar la PcAICI en suficiente cantidad hasta la dermis.

En nuestro trabajo, la nanoemulsión (F2a y F2-9), se retuvo en EC en menor cantidad que F1 y se retuvo en E+D en similar cantidad que F1, esto indica que la F2 ingresó a la piel en menor concentración comparado con F1.

Es de gran importancia considerar las condiciones de la piel después de los ensayos y lo que esto pudo afectar sus propiedades de barrera, como se mencionó anteriormente, y según los comentado por Wagner *et al.*, 2000 y Aguzzi *et al.*, 2008, con respecto a la hidratación no fisiología de la piel en los ensayos con celdas de Franz. Además puede considerarse en el caso del ensayo de retención, factores ya descritos en otros apartes de esta discusión, como la tendencia de la PcAICI a la formación de agregados, haciendo que al entrar en contacto con las capas hidrófilas de la piel, se promoviera la formación de éstos, alterando el perfil de liberación de los fármacos incorporados en los vehículos y limitando la difusión del fármaco dentro de la piel.

Los cambios histológicos observados en las biopsias de piel luego de los ensayos con celdas de Franz, correspondieron a alteraciones causadas por factores fisiológicos y mecánicos originados como resultado del tiempo que paso la piel ubicada en la celda de Franz. Como factor fisiológico nos referimos al efecto que pudo causar el medio receptor en contacto con la piel, y como factor mecánico, la presión que ejerció la pinza al mantener la piel en medio de las dos cámaras.

Todos estos cambios estuvieron ocasionados además por la duración de los ensayos, evidenciándose que a mayor tiempo, mayores alteraciones histológicas de la piel.

Conocidos estos resultados, sería conveniente que se realizaran futuros ensayos con piel desprovista de EC, evaluando la penetración en tiempos más cortos, lo

que evitaría el deterioro tan marcado de la piel y proporcionaría una mejor interpretación de los datos con respecto a que en la práctica, la formulación se aplicaría en una piel ulcerada, desprovista del EC y posiblemente de parte de la epidermis. En ausencia de EC, por ejemplo, cuando la piel está desnuda por una enfermedad o incluso después de repetidos *tappe stripping*, la absorción de los fármacos en la piel se incrementa. Con esto se lograría determinar la posibilidad real de aplicar la formulación en piel ulcerada ya que se conocería si esta se retiene en dermis en suficiente cantidad y se sabría si bajo de estas circunstancias podría haber permeación al medio receptor.

Existe gran diversidad de afecciones cutáneas que transcurren con ulceración crónica, como es el caso de la vasculitis, el carcinoma basocelular, carcinoma espinocelular, pie diabético; así como enfermedades infecciosas causadas por diferentes tipos de hongos, bacterias, micobacterias y parásitos. Según Zerpa *et al.*, 2002, en el caso puntual de la LC, las úlceras representan más del 90% de las manifestaciones clínicas. En un porcentaje menor de pacientes, otros tipos de manifestaciones cutáneas pueden presentarse, además de la lesión ulcerada. Se evidencian como lesiones verrugosas vegetativas, pápulas, nódulos, y otros infiltrados en la piel que en conjunto, conducen a considerar la LC como una enfermedad cutánea que presenta polimorfismo en su presentación clínica. (Silveira *et al.* 1997).

Estudios realizados por Venkataram *et al.*, 2001, en Oman, afirmaron que la LC presenta un variado espectro de manifestaciones clínicas e histológicas, mostrando diversos patrones de reacción, encontrados en un estudio donde se analizaron las características clínicas e histopatológicas de cuarenta casos de leishmaniasis cutánea, definiendo para su estudio cuatro patrones histológicos: 1) infiltración de macrófagos difusa sin necrosis, 2) la infiltración de macrófagos con necrosis. 3) inicio de granuloma reactivo y 4) granuloma epitelioides establecido. Las lesiones se agruparon de acuerdo a su tiempo de evolución en lesiones

agudas (menor de 3 meses de duración), lesiones tempranas subagudo (duración 3 a 12 meses) y lesiones tardías (duración de más de 12 meses). Estas lesiones se presentaron como nódulo, placa, placa incrustada, nódulo ulcerado y úlcera.

En un estudio realizado en la península de Yucatán, reportado por Andrade Narváez *et al.*, 2005, analizaron 73 biopsias de lesiones de LC causados por *Leishmania (Leishmania) mexicana* con el fin de analizar hallazgos histopatológicos y relacionarlos con la presentación clínica. El patrón histopatológico más frecuente se caracterizó por la presencia de granuloma desorganizado y ausencia de necrosis. Otro hallazgo importante a señalar fue la presencia del parásito en 50 de 73 de las biopsias estudiadas. Encontraron una relación directa entre el tamaño de la lesión y el tiempo de evolución; así como una relación inversa entre el tamaño de la lesión y la presencia de amastigotes. Los hallazgos histopatológicos tuvieron tal variabilidad, que fue difícil clasificar los resultados en un patrón significativo.

Mehregan *et al.*, 1999, afirman que existe similitud histológica entre las lesiones de LC del Viejo Mundo y las lesiones del Nuevo Mundo.

Los hallazgos histopatológicos de nuestro trabajo muestran que en las lesiones por LC, la reacción inflamatoria en la dermis presentó dos formas características: en la primera, la reacción fue densa y difusa con un severo infiltrado celular mixto, con predominio de macrófagos, linfocitos y plasmocitos, donde se observaron amastigotes dentro de los macrófagos y que posiblemente correspondían a lesiones de corto tiempo de evolución. En segundo lugar, se observó en dermis una respuesta de tipo granulomatosa, donde fue menor la posibilidad de demostrar la presencia de amastigotes y que posiblemente correspondía a lesiones con mayor tiempo de evolución. Esta posibilidad de evidenciar amastigotes en las lesiones, dependiendo del tiempo de evolución, fue descrita además por Mehregan *et al.*, 1999, Zerpa *et al.*, 2002 y García-Almagro, 2004.

En la variabilidad del espectro histológico observado en las lesiones de LC, pueden estar involucrados diversos factores tales como ubicación geográfica del paciente, tiempo de evolución de la lesión, cepa de *Leishmania* causante de la infección, carga parasitaria e inmunidad del hospedero. (Mehregan *et al.*, 1999, Venkataram *et al.*, 2001). La presentación histológica de la LC tiene gran similitud con diferentes lesiones cutáneas que muestran un patrón histológico y clínico similar, por tal motivo debe considerarse un diagnóstico diferencial con algunas entidades que producen lesiones ulcerosas (úlceras traumáticas, vasculares, piógenas, esporotricosis, paracoccidiodomicosis, TBC cutánea, úlceras por micobacterias atípicas, tumores malignos ulcerados); lesiones papulosas, nodulares o en placa (picaduras de insecto con formación de granuloma, lepra, sarcoidosis, psoriasis) y lesiones verrugosas (cromomicosis, tuberculosis verrugosa, histoplasmosis, lobomicosis, carcinomas espinocelulares). (Guía de atención de la leishmaniasis del Ministerio de la Protección Social, 2008).

Dado lo anterior, el estudio histológico de las ulceraciones crónicas representa un reto diagnóstico en patología, debido a que cuadros histológicos similares tienen diferentes etiologías y una causa única puede dar lugar a varios patrones histológicos.

En nuestro medio, el método diagnóstico más sensible para LC es el frotis directo de la lesión con valores de sensibilidad reportados en la Guía de atención de la leishmaniasis del Ministerio de la Protección Social (2008), de 85% a 90% en pacientes cuya enfermedad no supere los cuatro meses de evolución.

En un estudio realizado por Zerpa *et al*, 2002, en Venezuela, donde evaluaron diferentes métodos diagnósticos directos para LC, se demostró que el frotis directo de la lesión, fue más sensible para el diagnóstico de LC, comparado con otros métodos como la PCR y el estudio histopatológico. Según el autor, éste método tuvo una mayor positividad respecto a los otros, incrementando su sensibilidad al aumentar el número de muestras estudiadas por lesión de 1 hasta 4; y cuando el

frotis fue tomado del borde de la lesión. Al analizar la positividad en las muestras obtenidas de frotis, observaron que la sensibilidad fue mayor cuando la lesión tenía menos de tres meses de evolución (94%) y disminuyó notablemente después de los cuatro meses (57%).

La sensibilidad limitada de la histopatología en la identificación de las *Leishmanias* se debe en gran medida a la distorsión de la morfología de los amastigotes durante el proceso de fijación de las muestras con formol. Los hallazgos histológicos en esta patología corresponden en algunos casos a la formación de un granuloma indistinguible del que causan otros agentes vivos (Weigle *et al.*, 1987).

En las ulceraciones por causa diferente a la LC, no se evidenció la presencia de un infiltrado dérmico denso, en estas la reacción inflamatoria fue de menor intensidad, y aunque también estaba conformada por linfocitos y plasmocitos, estos siempre se encontraron en menor cantidad. En ninguna de estas biopsias examinadas, se observó la presencia de células gigantes multinucleadas ni de signos que sugirieran la formación de granulomas.

Las características observadas a nivel de la epidermis como la hiperqueratosis, espongirosis, acantosis y ulceración, fueron comunes en todas las ulceraciones analizadas, por lo tanto estas no hacen diferencia al comparar las lesiones estudiadas en este trabajo.

Se confirma entonces la necesidad de estandarizar métodos alternativos para el diagnóstico de la LC, entre los que se encuentran el análisis de isoenzimas, inmunohistoquímica, anticuerpos monoclonales, PCR, métodos inmunodiagnósticos que permitan identificar directamente anticuerpos o antígenos entre otros, donde sea posible demostrar la presencia del parásito o sus productos, mejorando la sensibilidad diagnóstica y contribuyendo así al inicio pronto del tratamiento.

La dificultad para poder establecer un patrón histológico propio de la LC en las biopsias analizadas en este trabajo, radica en que la solicitud del examen histopatológico a un paciente con sospecha de LC, se hace únicamente cuando el examen directo no ha arrojado un resultado positivo, o cuando el paciente ha recibido ya algún tratamiento y este no ha sido efectivo. Por esta razón, la biopsia es tomada en la mayoría de los casos, cuando la lesión lleva ya un largo tiempo de evolución, sin contar con el retraso que pueden ocasionar los trámites impuestos por un ineficaz sistema de salud.

Es importante anotar que en nuestro medio, la biopsia de piel no es el método diagnóstico más frecuente para la LC, como se mencionó antes, ésta se diagnostica principalmente por frotis directo de las lesiones. En el presente trabajo, se utilizaron biopsias de piel, con el fin de establecer algunas características histológicas propias de la LC y poder en cierto modo predecir como sería el comportamiento de una formulación tópica de PcAlCl en la piel ulcerada, desprovista del EC, que es la principal barrera para la entrada del fármaco a la piel.

Luego de este breve acercamiento a las características histológicas que pueden presentar las lesiones por LC, podría considerarse que una formulación tópica que se aplicara en la piel ulcerada (en ausencia de EC y parte de la epidermis), tendría la capacidad de llegar hasta la dermis de forma más efectiva que si esta se aplicara en la piel intacta. En un estudio reportado por Kim *et al.*, 1996, donde probaron la penetración de hidrocortisona en formulación liposomal-gel y en un ungüento convencional, en la piel de ratón, con EC y en piel sin EC (removido por *tappe stripping*), encontraron que cuando se removió el EC, las formulaciones penetraron rápidamente a capas más profundas de la piel. Observaron además que la formulación liposomal-gel, se retuvo en mayor cantidad en la dermis y se detectó en mínimas cantidades en sangre, y el ungüento convencional fue detectado en sangre y orina en mayores concentraciones, lo que indicó la

capacidad de la formulación liposomal-gel para mantener unas concentraciones sostenidas de hidrocortisona en la piel.

Es de gran importancia considerar que la formulación sería aplicada en piel ulcerada, la cual en la mayoría de los casos, no solo ha perdido el EC, sino que posiblemente se encontrará desprovista de parte de la epidermis o de la misma dermis; lo anterior podría facilitar una mayor permeación del FS a capas más profundas de la piel, haciendo que este pueda alcanzar la vía sistémica, provocando efectos indeseados. Por otra parte, la lesión puede haber ocasionado cambios importantes en la piel como engrosamiento epitelial, el cual podría presentar un obstáculo adicional a la permeación del FS.

Se trataría entonces de obtener una formulación que pueda aplicarse en la úlcera por LC, que tenga la posibilidad de retenerse en la dermis, y que luego de ejercer su efecto fotodinámico destruyendo el parásito, fuera capaz de promover la cicatrización de la lesión. Lo anterior se conseguiría con una adecuada interacción entre el FS y el vehículo y de estos con la piel lesionada, obteniendo un equilibrio que permitiría una adecuada absorción percutánea y retención o liberación del fármaco en los sitios de infección en la dermis. Con estas características, sería viable la implementación de una formulación tópica para el tratamiento localizado de las lesiones por LC.

## 6. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Los estudios espectroscópicos realizados en PcAlCl incorporada en los sistemas de entrega, así como en los solventes, demostraron que la ftalocianina se encuentra principalmente en forma monomérica, lo que es una condición ideal para un fotosensibilizador en TFD. Así mismo, las concentraciones de PcAlCl detectadas en las formulaciones el día de su preparación y en días posteriores demuestran que en conjunto, los componentes de las formulaciones y el adecuado almacenamiento proporcionaron condiciones estables a la PcAlCl.

La no detección de PcAlCl en el medio receptor es un punto positivo con respecto a los sistemas de liberación empleados para la PcAlCl en este trabajo, ya que la idea del tratamiento localizado de las lesiones por LC, es conseguir que la PcAlCl aplicada en una formulación tópica se retenga en la dermis sin llegar a la vía sistémica.

La mayor retención PcAlCl en el EC comparado con la retención en la Epidermis + Dermis indica que los sistemas de liberación empleados en este trabajo deben ser mejorados para proporcionar un mayor flujo del compuesto hacia capas más profundas de la piel, mejorando así la concentración de PcAlCl en la dermis.

Los sistemas de liberación empleados en este trabajo fueron eficientes proporcionando la retención de PcAlCl en la dermis sin llegar al medio receptor. La implementación de ensayos de permeación y retención con piel desprovista de EC, proporcionaría una aproximación al comportamiento de las formulaciones en la piel ulcerada por LC, además permitiría realizar ensayos más cortos evitando el deterioro de la piel causado por el tiempo prolongado de los experimentos.

La realización de ensayos *in vivo* con úlceras inducidas o con animales infectados, permitiría establecer las interacciones de las formulaciones con la piel ulcerada en un sistema vivo, contribuyendo así a mejorar las formulaciones y avanzar en el proceso de optimización de formulaciones tópicas para el tratamiento de la LC.

Se requiere continuar trabajando en la optimización la solución y la nanoemulsión de PcAlCl ya que estas son formulaciones de fácil preparación y bajo costo, lo que las convierte en importantes alternativas como sistemas de liberación de la PcAlCl para el tratamiento fotodinámico de las lesiones por leishmaniasis cutánea.

## 7. BLIOGRAFÍA

ABU-ELYZAID, D. K., A. A. Kassem, A. M, Samy, M. E. Gomaa, 2011: Evaluation of Skin Permeation and Pharmacological Effects of Tenoxicam Nanoemulsión in Topical Formulations. *Asian J. of Pharm. Hea. Sci.*, **1**, 99 -105.

AGUZZI, C., S. Rossi, M. Bagnasco, L. Lanata, G. Sandri, F. Bona, et al., 2008: Penetration and Distribution of Thiocolchicoside through Human Skin: Comparison Between a Commercial Foam (Miotens®) and a Drug Solution. *AAPS Pharm Sci Tech*, **9**, 4 - 12.

AHMED, M., W. Ramadan, D. Rambhu & F. Shakeel, 2008: Potential of nanoemulsions for intravenous delivery of rifampicin, *Pharmazie*. **63**; 806–811.

AKILOV, O.E., S. Kosaka, K. O`Riordan, X. Song, M. Sherwood, T. J. Flotte, J. W. Foley & T. Hasan, 2006a: The role of photosensitizer molecular and charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites. *Chem Biol*, **13** ,839-847.

AKILOV, O.E., K. O`Riordan, S. Kosaka, & T. Hasan, 2006b: Photodynamic therapy against intracelular pathogens: Problems and potentials. *Medical Laser Aplication*, **21**, 251-260.

ALLEN, T.M & P.R. Cullis, 2004: Drug delivery systems: entering the mainstream. *Science*, **303**, 1818 - 1822.

ALLEVATO, M.A., 2007: Sistemas terapéuticos transdérmicos. *Act Terap Dermatol*. **30**, 154- 165

ALLISON, R. R. & C. H. Sibata, 2010: Oncologic photodynamic therapy photosensitizers: A clinical review. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **7**, 61-75.

AMEEN, M., 2010: Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Emerging therapies and progress in disease management. *Expert Opin Pharmacother*, **11**, 557-569.

ANDRADE, F.J.; S. Medina, A., Vargas, S.B., Canto & S. Estrada, 2005: The histopathology of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) mexicana* in the Yucatan peninsula.. *Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo*, **47**, 191-194.

ANIGBOGU, A. N, A.C. Williams, B.W. Barry, H.G. Edwards, 1995: Fourier transform Raman spectroscopy of interactions between the penetration enhancer dimethylsulfoxide and human stratum corneum, *Int. J. Pharm.* **125**, 265–282.

ASILIAN, A., A., Sadeghinia, G. Faghihi, A. Momeini & H.A., Amini, 2003: The efficacy of treatment with intralesional meglumineantimoniate alone, compared with that of cryotherapy combined with themeglumineantimoniate or intralesional sodium stibogluconate, in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol.* **97**, 493–498.

ASILIAN, A. & M. Davami, 2006: Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paramomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clin Exp Dermatol*, **31**, 634-637.

BABOOTA, S., F. Shakeel, A. Ahuja, J. Ali, S. Sheik, 2007: Design development and evaluation of novel nanoemulsion formulations for transdermal potential of celecoxib, *Acta Pharm.* **57**, 315-332.

BASKETTER, D. A., Y. Michael, J.P. Mcfadden & M. K. Robinson, 2004: etermination of skin irritation potential in the human 4-h patch test. *Contact Dermatitis*, **51**, 1–4

BETLLOCH, I., & J. F. Silvestre, 2002: Aspectos cutáneos de los sistemas terapéuticos transdérmicos. *Piel*. **17**, 18-26.

BLUM, J., P. Desjeux, E. Schwartz, B. Beck & C. Hatz, 2004: Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J. Antimicrob Chemother*, **53**, 158-166.

BOADA, J. N., 2004: Farmacología dermatológica. FLÓREZ, J., J. A. Armijo & A. Mediavilla, Farmacología Humana. 5ª edición. (pp 1403 - 1422). Elsevier Masson España.

BOTELLO, A. J. & M. J. Garcia, 2004: Manual de Farmacia, Temario General Módulo II. pp 181-202

BOTERO, D., & M, Restrepo, 2005: Leishmaniasis, en Parasitosis Humanas. 4ª Ed. pp 238 -261. Medellín, Ediciones CIB., Medellín.

CASTANO, A. P., T. N. Demidova & M. R. Hamblin, 2004: Mechanisms in photodynamic therapy: part one – photosensitier, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **1**, 279-293.

CLAVIJO D., G. A García., C. A., Casadiego, 2008: Nanotecnología en el diagnóstico y tratamiento médico. *Universitas Médica*, **49**, , pp. 388-398

CHATTERJEE, D.K., L. S. Fong, Y. Zhang, 2008: Nanoparticles in photodynamic therapy. *Adv Drug Delivery*. **60**, 1627-1637.

Comisión Europea, 2005: European Technology Platform on Nanomedicine, Nanotechnology for Health. Vision Paper and Basis for a Strategic Research Agenda for Nanomedicine.

CONSTANTINIDES, P.P., M.V. Chaubal & R. Shorr, 2008: Advances in lipid nanodispersions for parenteral drug delivery and targeting. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **60**; 757–767.

COSTANTINO, L., G. Tosi, B. Ruozi, L. Bondioli, M.A. Vandelli & F. Forni, 2009: Colloidal systems for CNS drug delivery, in: H.S. Sharma, *Prog. Brain Res.*, **180**, pp. 35–69.

COURRET, N. , C. Fréhel, N. Gouhier, M. Pouchelet, E. Prina, P. Roux & J.C. Antoine. 2002: Biogenesis of *Leishmania*- harbouring pharasitophorous vacuoles following phagocytosis of the metacyclic promastigote or amastigote stages of the parasites. *J. C Sci.* **115**, 2303-2316.

CROFT, S. L., K. Seifert & V. Yardley 2006: Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res*, **123**, 399-410.

DELGADO-CHARRO, M.B., G. Iglesias-Vilas, J. Blanco-Mendez, M. J. Lopez-Quintela, M. A. Marty & J. P. Guy, 1997: Delivery of a hydrophilic solute through the skin from novel microemulsion systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **43**, 7–42.

DESJEUX, P., 2004: Leishmaniasis: current situation and new Perspectives. *Comp Immunol, Microbiol Infect Dis*, **27**, 305–318.

DETTY, M. R., S. L. Gibson & S. J. Wagner, 2004: Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*, **47**, 3897-3915.

DEVARAJAN, V & V. Ravichandran, 2010: Nanoemulsions: as modified drug delivery tool. Review Article. *Int. J. Com. Phar.* **2**, 4-12.

DHAMI, S.; & Phillips, D. 1996: Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminum phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles. *J. Photochem. Photobiol. A*, **100**, 77-84.

DUTTA, S., D. Ray, B. K. Kolli & K. P. Chang, 2005: Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminium phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 4474-4484.

DUTTA, S., B.G. Ongarora, L., Hairong, M.G.H., Vicente, B. K. Kolli, K. P. Chang, 2011: Intracellular Targeting Specificity of Novel Phthalocyanines Assessed in a Host-Parasite. Model for Developing Potential Photodynamic Medicine. *PLoS One* 6(6): e20786. doi:10.1371/journal.pone.0020786

EL MAGHRABY, G. M., B.W., Barry & A.C. Williams, 2008: Liposomes and skin: From drug delivery to model membranes. *European journal of pharmaceutical sciences* **3**, 203–222

EL MAGHRABY., G.M., A.C, Williams & B.W, Barry, 2006: Can drug bearing liposomes penetrate intact skin?. *J. Pharm. Pharmacol.* **58**, 415–429.

EL-ON, J. & A: D. Hamburger, 1987: Topical treatment of New and Old World cutaneous leishmaniasis in experimental animals. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **81**, 734-737.

EL-ON, J., G. P. Jacobs, E. Witztum & C. L. Greenblatt, 1984: Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major* in experimental animals. *Antimicrob Agents Chemother*, **26**, 745-751.

ESCOBAR, P., I.P. Hernandez, C. M. Rueda, F. Martínez & E. Paez, 2006: Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania promastigotes*. *Biomedica*, **26**, 49-56.

EWERT, K., H. M. Evans, A. Ahmad, N.L. Slack, A. J. Lin, A. & Martin-Herranz, 2005: Lipoplex structures and their distinct cellular pathways. *Adv. Genet*, **53**;119-155.

FABRIS, C., M. Soncin, G. Miotto, L. Fanneti, G. Chiti, D. Dei, et al. Zn (III) – phthalocyanines as phototherapeutic agents for cutaneous diseases. Photosensitization of fibroblasts and keratinocytes. *Journal of photochemistry and photobiology*, **83**, 48-54.

FALABELLA, R. & J. Victoria, 2009: Terapéutica Dermatológica, en: VELEZ, H., W. Rojas, J. Borrero, J. Restrepo, L. Dominguez, Fundamentos de Medicina, Dermatología. 6ª Edición, pp 590 – 606. Ediciones CIB., Medellín.

FERREIRA, L., G.A. Ramaldes, E.A. Nunan & L.A.M. Ferreira. 2004: In vitro skin permeation and retention of paramomycin from liposomes for topical treatment of the cutaneous leishmaniasis. *Drug Dev Ind Pharm*, **30**, 289-296.

FINARDI, U., 2011. Que son las nanotecnologías?. Valencia, España. Editorial Intangible.

FLORENCE, A.T. & D. Attwood. Physicochemical Principles of Pharmacy. Third Ed. New England Book Company. USA, 2003.

FOX, L. T., M. Gerber, J. Du Plessis, J. H. Hamman, 2011: Transdermal Drug Delivery Enhancement by Compounds of Natural Origin. Review. *Molecules*, **16**, 10507-10540.

Fundación COTEC 2006. Biotecnología en la medicina del futuro. Informe COTEC de innovación. Madrid.

GARCIA ALMAGRO, D. 2005: Leishmaniasis cutánea. *Actas Dermos*, **96**, 2-24.

GARNIER, T. & S.L. Croft 2002: Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. *Curr Opin Investig Drugs*, **3**, 538-544.

GARNIER, T., A. Mantila, T. Jarvinen, M. J. Laurence, M. B. Brown, S. L. Croft, 2006: Topical buparvaquone formulations for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Pharmacy and pharmacology*, **59**, 41-49.

GARTNER, L. P. & J. Hiatt, 2004. Histología. Texto y Atlas. México: Mc Graw Hill Interamericana.

GASCO, M. R., M. Gallarate & F. Pattarino, 1991: *In-vitro* permeation of zelaic acid from viscosized microemulsions, *Int. J. Pharm.* **69**, 193–196

GODIN, B., & E. Touitou, 2007: Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models, *Adv. Drug Deliv. Rev.* **59**, 1152–1161.

GONZALEZ, J.M., M. Lopez & G. Ruiz, 2006: informe de vigilancia tecnológica: Nanomedicina. pp 23-26, España.

HART, SL., 2005: Lipid carriers for gene therapy. *Curr Drug Deliv*, **2**, 423- 428.

HERNANDEZ, I. P. 2010: Actividad fototóxica in vivo e in vitro de la Ftalocianina de Aluminio clorada contra *Leishmania amazonensis*. Tesis de maestría no publicada. Universidad Industrial de Santander, Colombia.

HERWALDT, B. L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet*, **354**, 1191-1199.

HOWEL, L., & J. Zhang, 1998: The effect of biological substrates on the ultrafast excited-state dynamics of zinc phthalocyanine tetrasulfonate in solution. *Photochem. Photobiol.* **67**, 90–96

HOWES, D., R. Guy, J. Hadgraft, J. Heylings, U. Hoeck, F. Kemper, *et al.*, 1996: Methods for assessing percutaneous absorption. The report and recommendations of ECVAM workshop 13. *ATLA*, **24**, 81-106.

JACOBIA, U., H. Taubea, U.F. Schferb, W. Sterrya, J. Lademann, 2005: Comparison of four different in vitro systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. *J. Control. Release*, **103**, 61–71.

JAMOULLE, J.C. & H. Schaefer, 1993: Topical modalities. In: Fitzpatrick, T. B., A. Z. Eisen, K. Wolff, I. M. Freedberg & K. F. Austen, *Dermatology in general medicine*. Fourth edition. (Vol. II, pp.: 2830-2845). New York: McGraw Hill.

JUNQUEIRA, L. C. & J. Carneiro, 2000. Histología básica. Texto y Atlas. Barcelona (España): Editorial MASSON.

KASSAB, K., C. Fabris, M. P. Defilippis, D. Dei, L. Fantetti, G. Roncucci, E. Reddi & G. Jori, 2000: Skin-photosensitizing properties of Zn (II)-2(3), 9 (10), 16 (17), 23 (24)- tetrakis – (4-oxy-N-methylpiperidiny) phtalocyanine topically administered to mice. *J Photochem Photobiol B*, **55**, 128-137.

KALKA, K., H. Merk & H. Mukhtar, 2000: Photodynamic therapy in dermatology. *J Am Acad Dermatol*, **42**, 389-413.

KARANDE, P., A., Jain, K., Ergun, V., Kispersky & S., Mitragotri, 2005: Design principles of chemical penetration enhancers for transdermal drug delivery. *Proc Natl Acad Sci*. **102**, 4688–4693.

KAWAKAMI, K., T. Yoshikawa, Y. Moroto, E. Kanaoka, K. Takahashi, Y. Nishihara & K. Masuda, 2002: Microemulsion formulation for enhanced absorption of poorly soluble drugs I. Prescription design. *J. Control. Rel*, **81**, 65–74

KIM, M.K., S.J. Chung, M.H. Lee, A. R. Cho, C.K. Shim, 1997: Targeted and sustained delivery of hydrocortisone to normal and stratum corneum-removed skin without enhanced skin absorption using a liposome gel. *J. Control. Release*, **46**, 243–251

KOGAN A. & N. Garti, 2006: Microemulsions as transdermal drug delivery vehicles. *Adv Colloid Interface Sci*, **123-126**, 369-385.

KONAN Y. N., R. Gurny & E. Allemann, 2001: State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, **66**, 89-106.

KRIWET, K & C. C. Muller-Goymann, 1995: Diclofenac release from phospholipids drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *Int. J. Pharm.* **125**, 231–242

KREILGAARD, M., 2001: Dermal pharmacokinetics of microemulsion formulations determined by *in-vitro* microdialysis, *Pharm. Res.* **18**, 367–373

KREILGAARD, M., 2002: Influence of microemulsions on cutaneous drug delivery. *Adv. Drug Del Rev.* **54**, 77– 98

KREILGAARD, M., M. J. B. Kemme, J. Burggraaf, R. C. Schoemaker & A. F. Cohen, 2001: Influence of a microemulsion vehicle on cutaneous bioequivalence of a lipophilic model drug assessed by microdialysis and pharmacodynamics. *Pharm. Res.* **18**, 593–599.

KYRIAZI, M., E. Alexandratou, D. Yova, M. Rallis & T. Trebst, 2007: Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminium phtalocyanine chloridre and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **24**, 84-97.

Laboratorio de Patología, 2010: Manual de procesos y procedimientos. Hospital Universitario de Santander.

LANDIS, J.R. & G.G. Koch, 1977: The measurement of observer agreement for categorical data. *33*, 159-174.

LECOEUR, H., P. A. Buffet, G. Milon, & T. Lang, 2010: Early Curative Applications of the Aminoglycoside WR279396 on an Experimental *Leishmania major*-Loaded Cutaneous Site Do Not Impair the Acquisition of Immunity. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 984–990

LEE, P. J., R. Langer & V. P. Shastri, 2003: Novel microemulsion enhancer formulation for simultaneous transdermal delivery of hydrophilic and hydrophobic drugs, *Pharm. Res.* **20**, 264–269.

LIO. P & E. Kaye. Topical antibacterial agents. *Infect Dis Clin N Am*, **18**, 717-733

MAEDA, H., J. Wu, T. Sawa, Y. Matsumura & K. Hori, 2000: Tumor vascular permeability and the EPR effect in macromolecular therapeutics: a review. *J Control Release*, **65**; 271- 84.

MATSUMURA, Y. & H. Maeda, 1986: A new concept for macromolecular therapeutics in cancer chemotherapy: mechanism of tumoritropic accumulation of proteins and the antitumor agent smancs. *Cancer Res*,**46**, 6387- 92.

MEHREGAN, D. R., A. Mehregan, D. Mehregan, 1999: Histologic Diagnosis of Cutaneous Leishmaniasis. *Clinics in Dermatology*, **17**, 297–304.

MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL, 2008: Programa de apoyo a la reforma de salud (PARS). Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública: Guía 21: Guía de atención de la Leishmaniasis (pp.: 176- 213)

MINISTERIO DE LA PROTECCION SOCIAL, 2010. Dirección General de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Sub-dirección de vigilancia y control en salud pública. SIVIGILA. Boletín Epidemiológico Semanal. Semana epidemiológica No. 50: Enfermedades transmitidas por Vectores.

MINODIER, P., & P. Parola, 2006: Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel medicine and infectious disease*, **5**, 150-158.

MONTANARI, J., C. Maidana, M. I. Esteva, C. Salomon, M. J. Morilla, E. L. Romero, 2010: Sunlight triggered photodynamic ultradeformable liposomes against *Leishmania braziliensis* are also leishmanicidal in the dark. *J Control Release*, **3**, 368-373.

MORAES, M.A.P. & F.T. Silveira, 1994: Histopatologia da forma localizada de leishmaniose cutânea por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, **36**, 459-463.

NAVIN, T. R., B.A. Arana, F. E. Arana, A. M. De Merida, A. L. Castillo, & J.L. Pozuelos, 1990: Placebo-controlled clinical trial of meglumine antimonite (glucantime) vs. localized controlled heat in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg.* **42**, 43–50.

NEVA F. A, C. Ponce, E. Ponce, R. Kreutzer, F. Modaber, P. Olliaro, 2006: Non – ulcerative Cutaneous Leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paramomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **91**, 473-475.

NUNES, S.M., F. Sguilla., & C Tedesco,2004: Photophysical studies of zinc phthalocyanine and chloroaluminum phthalocyanine incorporated into liposomes in the presence of additives. *Braz. J. Med. Biol. Res.* **37**, 273-284.

OECD (2004). Guidance Document for the Conduct of Skin Absorption Studies. Organization for Economic Cooperation and Development, Environment Directorate, (p.p.: 1-31). Paris.

OLIVEIRA- CARDOSO. F, C. da Silva, V. Gonçalves, A.L. Abreu-Silva, S.C. Gonçalves da Costa & K. da Silva Calabrese, 2010: Inmunopathological studies of leishmania amazonensis infection in resistant and in susceptible mice. *J Infect Dis.* **12**, 1933-1940.

OMS, 2006: Control de leishmaniasis. *Resolucion No EB 118/4 del consejo ejecutivo de la OMS en sesión del 30 de mayo de 2006.*

OSBORNE, D.W., A.J. Ward, & K.J. O'Neill, 1991: Microemulsions topical drug delivery vehicles: in-vitro transdermal studies a model hydrophilic drug, *J. Pharm. Pharmacol.* **43**, 450–454.

PARISER, D. M., N. J. Lowe, D. M. Stewart, M. T. Jarratt, A. W. Lucky, R. J. pariser & P. S. Yamauchi, 2003: Phptodynamic therapy with topical methyl aminolevulinate for actinic keratosis: Results of a prospective randomized multicenter trial. *J Am Acad Dermatol*, **48**, 227-232

PEÑA, D.A. 2004: Terapéutica dermatológica en Atlas de dermatología del pie. Ed. Médica Panamericana. pp 39-41.

PRAUSNITZ, M. R, S. Mitragotri, & R. Langer, 2004: Current status and future potential of transdermal drug delivery. *Nat Rev Drug Discov.* **3**, 115–124.

PRAUSNITZ, M. R. &R. Langer, 2008a: Transdermal drug delivery. *Nat Biotechnol.* **26**, 1261–1268.

PRAUSNITZ, A.A. & M.R, Mitragotri, 2008b: Micro-scale devices for transdermal drug delivery. *Int J Pharm.* **364**, 227–236.

PRIMO, F. L., M. A, Rodriguez, A. R. Simioni, M. V. L Bentley, P. C. Morais, A. C. Tedesco, 2008: In vitro studies of cutaneous retention of magnetic nanoemulsión loaded with zinc phtalocyanine for synergic use in skin cancer treatment. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials*, **320**, 211-214.

RAMOS-E-SILVA, M. & C. Moura-Castro, 2012: Epidermal barrier function and systemic diseases. *Clinics in Dermatology*, **30**, 277–279.

RAUF, M. A., S. Hisaindee, J.P. Graham, & M. Nawaz, 2012: Solvent effects on the absorption and fluorescence spectra of Cu(II)-phthalocyanine and DFT calculations. *J. Mol, Liq.*, **168**, 102-109.

ROSSETTI, F. C., L. B. Lopes, A. R. Carollo, J. A. Thomazini, A. C. Tedesco & M. V. Bentley, 2011: A delivery system to avoid self-aggregation and to improve in vitro and in vivo skin delivery of a phthalocyanine derivative used in the photodynamic therapy. *J ControlRelease*, **155**, 400-408.

ROUGIER, A., C. Lotte., P. Corcuff, H. Maibach, 1988: Relationship between skin permeability and corneocyte size according to anatomic site, age and sex in man. *J Soc Cosmet Chem* **39**, 15-19.

REITHINGER, R., J.C. Dujardin, H. Louzir, C. Pirmez, B. Alexander & S. Brooker, 2007: Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis*, **7**, 581-596.

ROBERTSON, M.D & H. I. Maibach, 2010: Farmacología Dermatológica. En KATZUNG, B.G., S. B. Masters & A. J. Trevor, *Farmacología básica y clínica*. 11ª edición. (pp: 1047-1065). New York: McGraw Hill.

ROMERO, E. L., MORILLA, M. J. 2008. Drug delivery systems against leishmaniasis?,. Still an open question. *Expt Opin on Drug Delivery*, **5**, 805-823.

ROSSA, J. S. & J. C. Shaha, 2000: Reduction in skin permeation of *N,N*-diethyl-*m*-toluamide q (DEET) by altering the skin / vehicle partition coefficient. *J. Control. Release*, **67**, 211–221.

ROSENTHAL I., 1991: Phthalocyanine as photodynamic sensitizers. *J Photochem Photobiol B*, **53**, 859-870

SÁEZ., V., E. Hernáez, L. Sanz & I. Katime, 2004: Liberación controlada de fármacos. *Revista Iberoamericana de Polímeros*. **5**, 87-90.

SAHOO, S.K & V. Labhasetwar, 2003: Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug Discov Today*, **8**, 1112- 1120.

SAHOO, S.K., S. Parveen & J.J. Panda, 2007: The present and future of nanotechnology in human health care. *Nanomedicine*, **3**; 20– 31

SANTOS-MAGALHAÑES, N,S., A. Pontes, V.M.W. Pereira & M.N.P. Caetano, 2000: Colloidal carriers for benzathine penicillin G: Nanoemulsions and nanocapsules. *Int. J. Pharm.*, **208**, 71-80.

SANTOYO, S., E., Ga de Jalo'n, P. Ygartua, M.J. Renedo & M.J. Blanco-Prieto, 2001: Optimization of topical cidofovir penetration using microparticles. *Int Jour of Phar.* **242**, 107–113.

SEEBERGER, J., S. Daoud & J. Pammer, 2003: Transient effect of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with imiquimod. *Int Dermatol*, **42**, 576-579.

SEKI, J., S. Sonoke, A. Saheki, H. Fukui, H. Sasaki, & T. Mayumi, 2004: A nanometer lipid emulsion, lipid nano-sphere (LNS®), as a parenteral drug carrier for passive drug targeting. *Int. J. Pharm.* **273**; 75–83.

SHAKEEL, F., S., Shafiq,N., Haq, &I. A., Alsarra, 2012: Nanoemulsions as potential vehicles for transdermal and dermal delivery of hydrophobic compounds: an overview. *Expert Opinion Drug Delivery*. **9**, 953-974

SINGH, K.K. & S.K. Vingkar, Formulation, antimalarial activity and biodistribution of oral lipid nanoemulsion of primaquine, *Int. J. Pharm.* **347**; 136–143.

SIBATA., M.N., A.C. Tedesco & J.M. Marchettia, 2004: Photophysicals and photochemicals studies of zinc(II) phthalocyanine in long time circulation micelles for Photodynamic Therapy use. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **23**, 131–138.

SILVEIRA, F.T., R. Lainson, & E.P. Corbet, 2004: Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil - A Review. *Mem Ins Oswaldo Cruz*. **99**, 239-251

SOLANS, C., P. Izquierdo, J. Nolla, N. Azemar&M.J. Garcia-Celma, 2005: Nano-emulsions Currento opinión. *Colloid & interface Science*, **10**, 102-110.

SOMENCI, L., C. E., Guerino, E., Kimura, M. J., Politi, M., Valdrinez, C. Lonardoni, S. M., Alessi, R. C., Cunha, N., Hioka, T., Gomes, & V., Silveira, 2011: Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Experimental Parasitology*, **128**, 353-356.

SOTO, J., J. T. Toledo, P. Gutierrez, M. Arboleda, R. S. Nicholls, J. R. Padilla, *et al.*, 2002: Treatment of cutaneous leishmaniasis with a topical antileishmanial drug (wr279396): Phase 2 pilot study. *Am J Trop Med Hyg*, **66**, 147-151.

SOTO. J. & P. Soto, 2006. Estado actual y futuro de la terapia anti-leishmaniásica en Colombia. *Biomedica*, **26** supl 1, 194 -206.

SPESISER, P., 1991: Nanoparticles and liposomes: a state of the art. *Meth. Find. Clin. Pharmacol.* **13**, 337–342.

TABLER, S. W., V. H Fingar, C T Coots & T J Wieman 1998: Photodynamic therapy using mono-L-aspartyl chlorin e6 (Npe6) for the treatment of cutaneous disease: a Phase I clinical study. Current Issue. *Clin Cancer Res*, **4**; 2741-2476.

TAKEGAMI, S., K. Kitamura, H. Kawada, Y. Matsumoto, S. Yoshimura, T. Kitade, 2010: Distribution of chloroaluminium phthalocyanine in a lipid emulsion as studied by second derivate spectrophotometry. *Micro and Nanosystems*, **2**, 280-285.

TAMBORERO, S. & M. J, Vincent, 2006: Conjugados poliméricos y su utilización como Nanomedicinas anticancerígenas. Fuente: [www.biojournal.net](http://www.biojournal.net).

TAYLOR, V.M., D. Cedeño, D. L. Muñoz, M.A. Jones, T. D. Lash, A. M. Young, M. H. Constantino, N. Esposito, I. D. Velez, & S. M. Robledo, 2011: In Vitro and In Vivo Studies of the Utility of Dimethyl and Diethyl Carbaporphyrin Ketals in Treatment of Cutaneous Leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* **55**, 4755–4764.

THAKUR, R., P. Batheja, D. Kaushik & B. Michniak, 2008: Structural and biochemical changes in aging skin and their impact on skin permeability barrier. In: Dayan, N. (Ed), *Skin aging handbook: an integrated approach to biochemistry and product development*. (494 p). Norwich N. Y.: William Andrew.

THORNTON, C., S. Taylor & J. Weinberg, 2003: Topical antimicrobial agents in dermatology. *Clin in Dermatol*, **21**, 70-77.

TROMMER, H. & R.H.H. Neubert, 2006: Overcoming the stratum corneum: the modulation of skin penetration, *Skin Pharmacol.. Skin Physiol.* **19**, 106–121.

TROTTA, M., F. Pattarino & M. R. Gasco, 1996: Influence of counter ions on the skin permeation of methotrexate from water-oil microemulsions, *Pharm. Acta. Helv*, **71**, 135–140.

VASIR, J. K, & V. Labhasetwar, 2005a, Targeted drug delivery in cancer therapy. *Technol Cancer Res Treat.* **4**, 363- 374.

VALDIVIESO, W., I. P. Hernandez, F. Martínez, E. Páez & P. Escobar, 2008: Efecto fototóxico de la terapia fotodinámica en promastigotes de *Leishmania amazonensis*. *Salud UIS*, **40**, 13-19.

VALDIVIESO, W. 2010: Marcadores de apoptosis en *Leishmania panamensis* inducidos por la terapia fotodinámica con Ftalocianina de Aluminio Clorada como fotosensibilizador. Tesis de maestría no publicada. Universidad Industrial de Santander, Colombia.

VARGAS, A., M. Eid, M. Fanchaouy, R. Gurny, F. Delie, 2008: *In vivo* photodynamic activity of photosensitiser – loaded nanoparticles: Formulation properties, administration parameters and biological issues involved in PDT outcome. *Eur Jou of Pharm and Biopharm*, **69**, 43-53.

VASIR, J. K., M. K., Reddy & V. Labhasetwar, 2005b: Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges. *Curr Nanosci*, **1**:47 - 64.

VEIEN, N.K., 1998: The clinician's choice of antibiotics in the treatment of bacterial skin infection. *Br J Dermatol*, **139**, 30-36.

VELASCO-CASTREJON, O., B. C. Walton, B. Rivas-Sanchez, M. F. Garcia, G. J. Lazaro, O. Hobart, S. Roldan, J. Floriani-Verdugo, A. Munguia-Saldana & R. Berzaluze, 1997: Treatment of cutaneous leishmaniasis with localized current field (radio frequency) in Tabasco, México. *Am J Trop Med Hyg*, **57**, 309-312.

VENKATARAM, M. & D. L. Moosa. 2001: Histopathological spectrum in cutaneous leishmaniasis: A study in Oman. *Indian J. Dermatol Venereol Leprol*, **67**, 294-298

WAINWRIGHT, M., 1998: Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *J Antimicrob Chemoter*, **42**, 13-28.

WAGNER, H., K. H. Kostka, C. M. Lehr & U. F. Schaefer, 2000: Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. *Pharm. Res.* **17**, 1475–1481.

WAGNER, H., K. H. Kostka., C. M. Lehr & U. F. Schaefer, 2002: Human Skin Penetration of Flufenamic Acid: In Vivo/In Vitro Correlation (Deeper Skin Layers) for Skin Samples from the Same Subject. *J Invest Dermatol*, **118**, 540 – 544

WEIGLE., K. A., M., De Davalos, P., Heredia , R., Molineros, N. G., Saravia, A., D'Alessandro, 1987: Diagnosis of Cutaneous and Mucocutaneous *Leishmaniasis* in Colombia: A Comparison of Seven Methods. *Am J Trop Med Hyg.* **36**, 489-496.

WILLIAMS, A. C, & B. W., Barry, 2004: Penetration enhancers. *Adv Drug Deliv Rev.*; **56**, 603–618

World Health Organization (WHO), 2006: Environmental health criteria for dermal absorption. EHC 235, Dermal absorption. Switzerland.

YSLAS, E. I., C. Prucca, S. Romanini, E. N. Durantini, M. Bertuzzi & V. Rivarola, 2009: Biodistribution and phototherapeutic properties of Zinc (II) 2,9,16,23-tetrakis (methoxy) phthalocyanine *in vivo*. *Photodiagnosis Photodyn Ther*, **6**, 62-70.

ZEITOUNI, N. C., A. R. Oseroff & S. Shieh, 2003: Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancers. Current review and update. *Mol Immunol*, **39**, 1133-1136.

ZERPA, O., R. Borges, N. Loyo, W. Galindo, D. Belisario, N. Rodríguez, A. Sosa, J. Convit, 2002: Comparación de cinco métodos para el diagnóstico de Leishmaniasis Cutánea. *Dermatol. Venez.* **40**, (4) 106-110.