

MARCADORES DE APOPTOSIS EN *Leishmania panamensis* INDUCIDOS POR
LA TERAPIA FOTODINÁMICA UTILIZADO FTALOCIANINA DE ALUMINIO
CLORADA COMO FOTONSENSIBILIZADOR

WILFREDO VALDIVIESO QUINTERO

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2010

MARCADORES DE APOPTOSIS EN *Leishmania panamensis* INDUCIDOS POR
LA TERAPIA FOTODINÁMICA UTILIZADO FTALOCIANINA DE ALUMINIO
COMO FOTSENSIBILIZADOR

WILFREDO VALDIVIESO QUINERO

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

Directora de tesis
PATRICIA ESCOBAR RIVERO
Bacterióloga, M.Sc., Ph.D.

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2010

*Este trabajo está dedicado a
mis fuentes de inspiración,
a mis razones para no desfallecer...
A las cosas bellas que tiene esta
existencia...*

A Dios, a mi madre y a mis amigos.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora Patricia Escobar, por su dedicación, apoyo, enseñanzas; paciencia y excelente disposición en mi proceso de formación.

A mis amigos de trabajo y compañeros de maestría por hacer este trayecto más amable, en especial a Indira Hernández, Sergio Gómez, Sandra Leal y Mónica Flórez.

A OLYMPUS, a la Dra. Susana Fiorentino de la Universidad Javeriana, a la corporación MICROS y a G. Barco por facilitar la realización de los experimentos de microscopia confocal.

CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	18
1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE	22
1.1 LEISHMANIASIS	22
1.1.1 Definición y formas clínicas	22
1.1.2 Agente etiológico	25
1.2 TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS	27
1.2.1 Tratamientos sistémicos	27
1.2.2 Tratamientos localizados	29
1.2.3 Tratamiento fotodinámico (TFD)	30
1.2.3.1 El TFD: generalidades	30
1.2.3.2 Fuentes de luz	33
1.2.3.3 FS utilizados	33
1.2.3.4 Ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl)	33
1.2.3.5 TFD en leishmaniasis	35
1.3 MUERTE CELULAR PROGRAMADA (MCP)	36
1.3.1 La apoptosis	37
1.3.2 Necrosis	41
1.3.3 Otra formas de MCP.	42
1.3.4 Métodos de estudio del proceso apoptótico	42
1.3.5 Apoptosis en Leishmania	44
2. OBJETIVOS	46

2.1 OBJETIVO GENERAL	46
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
3. MATERIALES Y METODOS	47
3.1 REACTIVOS QUÍMICOS Y COMPUESTOS	47
3.2 PARÁSITOS Y CÉLULAS	48
3.3 REGISTRO FOTOGRÁFICO	49
3.4 INTERNALIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PcAICI	49
3.4.1 Internalización de la PcAICI	49
3.4.2 Localización mitocondrial	50
3.5 ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS	50
3.5.1 Tratamiento fotodinámico (TFD)	50
3.5.2 Actividad de los compuestos en promastigotes de <i>L. panamensis</i>	52
3.5.3 Actividad de los compuestos en células THP-1	52
3.5.4 Actividad de los compuestos en amastigotes intracelulares de <i>L. panamensis</i>	53
3.6 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE APOPTOSIS LUEGO DE LA TFD	54
3.6.1 Tratamiento de los parásitos	54
3.6.2 Cambios morfológicos	55
3.6.3 Expresión de fosfatidilserina (FSe)	55
3.6.4 Activación de caspasa 3	56
3.6.5 Potencial de membrana mitocondrial	56
3.6.6 Fragmentación de ADN	57
3.6.6.1 Electroforesis del ADN en gel de agarosa.	57

3.6.6.2 Marcaje de ADN in situ técnica de TUNEL.	57
3.7 ANÁLISIS DE RESULTADOS	59
4. RESULTADOS	60
4.1 EFECTOS DE LOS COMPUESTOS EN LOS PARÁSITOS Y CÉLULAS	60
4.1.1 La PcAICI fue internalizada por los parásitos y las células THP-1	60
4.1.2 Los promastigotes y las células THP-1 fueron fotosensibles al tratamiento con PcAICI	62
4.1.3 Los amastigotes intracelulares y su célula hospedera fueron fotosensibles a la PcAICI	63
4.1.4 La miltefosina y el peróxido de hidrógeno fueron activos contra parásitos y células THP-1	64
4.1.5. Criterios para el análisis de expresión de los marcadores de apoptosis en promastigotes y amastigotes intracelulares.	65
4.2 EFECTOS DEL TRATAMIENTO EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE APOPTOSIS	66
4.2.1 El tratamiento fotodinámico con los compuestos indujo cambios morfológicos en los parásitos	66
4.2.2 El tratamiento fotodinámico con los compuestos indujo la expresión de fosfatidilserina (FSe) en promastigotes	70
4.2.3 El tratamiento fotodinámico con los compuestos indujo alteraciones en la membrana plasmática de promastigotes	71
4.2.4 El tratamiento fotodinámico con los compuestos no indujo la actividad de caspasa 3 en promastigotes	72
4.2.5 El tratamiento fotodinámico con los compuestos inducen cambios en el potencial de la membrana mitocondrial de promastigotes	74
4.2.6 El tratamiento fotodinámico con los compuestos induce fragmentación progresiva del ADN en los parásitos.	75

4.2.7 La fragmentación del ADN de los promastigotes presenta un patrón nucleosomal	78
5. DISCUSION	79
6. CONCLUSIONES	88
BIBLIOGRAFIA	91

LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Distribución geográfica de la leishmaniasis en Colombia discriminado por agente etiológico.	23
Figura 2. Ciclo de vida del la <i>Leishmania</i>	26
Figura 3. Modelo de producción de ERO en el TFD	32
Figura 4. Eventos principales ocurridos en las vía de activación extrínseca e intrínseca de la apoptosis en células de mamífero	39
Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología llevada a cabo para el desarrollo de este estudio	48
Figura 6. Estructura de los compuestos utilizados en este estudio.	48
Figura 7. Sistema de irradiación	51
Figura 8. Internalización de la PcAlCl en promastigotes de <i>L. panamensis</i>	61
Figura 9. Internalización de la PcAlCl en células THP-1 y localización mitocondrial.	62
Figura 10. Efecto de la PcAlCl en células infectadas con <i>L. panamensis</i> después de irradiación.	64
Figura 11. Cambios morfológicos de promastigotes después del tratamiento fotodinámico con PcAlCl.	68
Figura 12. Cambios morfológicos de amastigotes intracelulares después del tratamiento fotodinámico con PcAlCl.	69
Figura 13. Efecto del tratamiento fotodinámico con PcAlCl en la expresión de FSe en promastigotes de <i>L. panamensis</i>	71
Figura 14. Efecto del tratamiento fotodinámico con PcAlCl en la alteración de la integridad de la membrana plasmática en promastigotes de <i>L. panamensis</i> .	72
Figura 15. Actividad de caspasa 3 en promastigotes de <i>L. panamensis</i> y células HeLa	73
Figura 16. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial en promastigotes	75

Figura 17. Fragmentación de ADN en promastigotes de <i>L. panamensis</i> .	76
Figura 18. Fragmentación de ADN de amastigotes intracelulares de <i>L. panamensis</i> .	77
Figura 19. Electroforesis de ADN de promastigotes de <i>L. panamensis</i> tratados con PcAlCl, miltefosina o peróxido de hidrógeno.	78
Figura 20. Comportamiento en el tiempo de la expresión de los diferentes marcadores de apoptosis en promastigotes de <i>L. panamensis</i> luego del TFD con PcAlCl.	85

LISTA DE TABLAS

	Pág.
Tabla 1. Relación entre las especies de Leishmania patógenas para el hombre y las clínicas de la enfermedad	24
Tabla 2. Clasificación de los principales FS utilizados en el TFD.	34
Tabla 3. Actividad de los compuestos en parásitos y células. Se muestra la actividad de la PcAlCl, miltefosina y peróxido de hidrógeno en promastigotes, macrófagos y amastigotes intracelulares de <i>L. panamensis</i> irradiados (5 J/cm ²) o no (0 J/cm ²).	65

ABREVIATURAS

AmB	Anfotericina B
Caspasas	<i>cysteine-aspartic proteases</i>
CC ₉₀	Concentración citotóxica 90
DIC	Microscopia diferencial de contraste de interferencia DIC
DMSO	Dimetil sulfóxido
DR	<i>Death receptor</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic acid</i>
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FS	Fotosensibilizadores
FSe	Fosfatidilserina
GM-CSF	Factor estimulante de colonias granulocíticas-monocíticas.
Hoechst 33342	bis benzimida (29-[4-etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,59-bi-1H-benzimidazol)
IF	Índice de fototóxicidad
IP	Ioduro de propidio
IS	Índice de selectividad
JC-1	5,5'6,6'-tetracloro- 1,1', 3,3'-tetraetil benzimidazolil-carbocianin yoduro
kDa	Kilo daltons
MCP	Muerte celular programada
MTT	3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio bromuro
PcAlCl	Ftalocianina de aluminio clorada
PBS	<i>Phosphaate buffer saline</i>
PMA	Forbol 12-miristato 13- acetato
PpIX	Protoporfirina IX
p.i.	post-irradiación
SBF	Suero bovino fetal
SBFi	Suero bovino fetal inactivado
Sb ^v	Antimoniales pentavalentes
Schneider	<i>Schneider's Insect Medium</i>
Smac	<i>Second mitochondria-derived activator of caspases</i>
TAE	Buffer Tris, Ácido acético y EDTA
TE	Solución de Tris-EDTA pH=8.0
TFD	Tratamiento fotodinámico
TNF _α	Factor de necrosis tumoral alfa
TNFR	Receptor específico del factor de necrosis tumoral
TRAIL	<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>
TUNEL	<i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase Biotin-dUTP Nick End Labeling</i>

RESUMEN

TÍTULO: MARCADORES DE APOPTOSIS EN *Leishmania panamensis* INDUCIDOS POR LA TERAPIA FOTODINÁMICA UTILIZANDO FTALOCIANINA DE ALUMINIO COMO FOTOSENSIBILIZADOR¹

AUTORES: VALDIVIESO QUINTERO, Wilfredo, ESCOBAR RIVERO, Patricia**

PALABRAS CLAVES: Apoptosis, terapia fotodinámica, muerte celular, *Leishmania*.

DESCRIPCIÓN:

La muerte celular programada es un proceso altamente regulado descrito en células de mamífero y organismos unicelulares. Diferentes compuestos con actividad anti-*Leishmania* inducen la expresión de marcadores de apoptosis. El tratamiento fotodinámico (TFD) utilizando ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) ha mostrado efectividad contra diferentes especies de *Leishmania*. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del TFD con PcAlCl en la expresión de marcadores de apoptosis en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis*.

Se determinó la internalización y localización intracelular de la PcAlCl por microscopía confocal y la actividad de los compuestos luego del TDF por microscopía luz y por MTT. Se determinaron la expresión de marcadores de muerte celular 0, 6, 12 y 24 horas post irradiación. Los cambios morfológicos se determinaron por microscopía luz, la actividad mitocondrial, expresión de fosfatidilserina y fragmentación del ADN por fluorescencia y/o electroforesis y la actividad de caspasa 3 por una prueba colorimétrica.

La PcAlCl fue internalizada en promastigotes y en células THP-1 y se encontró localización mitocondrial en las células THP-1. La susceptibilidad al TFD fue observada en los promastigotes con $CC_{90} = 0,14 \pm 0.02 \mu M$ y en los amastigotes la muerte se presentó a la par con la muerte de la célula hospedera en concentraciones superiores a $0,18 \mu M$. Se observaron cambios morfológicos asociados con apoptosis (diminución del tamaño celular y pérdida del núcleo y el kinetoplasto) y fragmentación del ADN luego del TFD en promastigotes y amastigote intracelulares. Adicionalmente en promastigotes se observaron otros marcadores como la expresión de fosfatidilserina y pérdida de la actividad mitocondrial, pero no se observó actividad de caspasa 3. La expresión de los marcadores de apoptosis observados aumentó con el paso del tiempo.

Este estudio muestra que promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* son susceptibles al TFD y que la muerte por este tratamiento induce la expresión de marcadores de apoptosis sin la activación de enzimas con actividad de caspasa 3.

* 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

TÍTULO: APOPTOSIS MARKERS IN *Leishmania panamensis* INDUCED BY PHOTODYNAMIC TREATMENT USING ALUMINUM CHLORIDE PHTHALOCYANINE AS PHOTOSENSITIZER*

AUTHORS: VALDIVIESO QUINTERO, Wilfredo, ESCOBAR RIVERO, Patricia**

KEYWORDS: Apoptosis, photodynamic therapy, cellular death, *Leishmania*

DESCRIPTION:

Programmed cell death is a highly regulated process described in mammalian cells and protozoa. Different compounds with anti-*Leishmania* activity induce the apoptosis markers expression. Photodynamic therapy (PDT) using aluminum phthalocyanine chloride (PcAlCl) has shown effectiveness against different species of *Leishmania*. The aim of this study was to determine the effect of PDT-PcAlCl in the expression of markers of apoptosis in promastigotes and intracellular amastigotes of *L. panamensis*.

We determined the internalization and intracellular localization of PcAlCl by confocal microscopy and the compounds activity after the PDT by light microscopy and MTT. We determined the expression of markers of cell death 0, 6, 12 and 24 hours post irradiation. Morphological changes were determined by light microscopy, mitochondrial activity, expression of phosphatidylserine and DNA fragmentation by fluorescence and / or electrophoresis and caspase 3 activity by a colorimetric test.

The PcAlCl was internalized in promastigotes and THP-1 cells and mitochondrial localization was found in THP-1 cells. The susceptibility to PDT was observed in promastigotes with $CC_{90} = 0.14 \pm 0.02 \mu\text{M}$ and the amastigotes death appeared with the host cell death at concentrations above $0.18 \mu\text{M}$. There were morphological changes associated with apoptosis (decrease in cell size and loss of nucleus and kinetoplast) and DNA fragmentation after PDT in promastigotes and intracellular amastigotes. Additionally, other apoptosis markers were observed in promastigotes as the expression of phosphatidylserine and loss of mitochondrial activity, but there was no caspase 3 activity. The expression of apoptosis observed increased with time.

This study shows that promastigotes and intracellular amastigotes of *L. panamensis* are susceptible to PDT and that death by this treatment induces the expression of apoptosis without the activation of enzymes with caspase 3.

* Thesis of degree of Master in Basic Biomedical Science

** Faculty of Health, Master in Basic Biomedical Science, Thesis director Patricia Escobar Rivero Bacterióloga, M.Sc., Ph.D

INTRODUCCIÓN

Las *Leishmanias* (Familia *Trypanosomatidae*) son parásitos flagelados que alterna como promastigotes en el mosquito vector y como amastigotes intracelulares en las células fagocíticas de sus hospederos mamíferos. Varias especies de *Leishmania* son consideradas como los agentes causales de la leishmaniasis. Esta enfermedad constituye un problema de salud pública en 88 países alrededor del mundo incluyendo a Colombia. En nuestro país, el número de casos reportados por año va en aumento según las cifras de los años entre 2000 y 2005; (Rincon et al., 2009; Saravia and Nicholls, 2006). Esta enfermedad es de gran impacto social dado a las diversas manifestaciones clínicas que van desde las formas cutáneas hasta formas más severas con compromiso de órganos internos. La manifestación clínica prevalente en nuestro país es la forma cutánea, siendo *L. panamensis* la especie responsable en la mayoría de los casos (Saravia and Nicholls, 2006; Saravia et al., 2002). Los esquemas de tratamiento utilizados son extensos e invasivos, pueden tener efectos secundarios o ser inefectivos (Soto et al., 2005; Velez et al., 2009).

Como aporte al desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de la leishmaniasis, en este caso para la leishmaniasis cutánea (LC), el laboratorio quimioterapia del CINTROP y el CICAT han venido estudiando la efectividad del tratamiento fotodinámico (TFD) (Escobar et al., 2006). Este se basa en la aplicación tópica o sistémica de compuestos llamados fotosensibilizadores (FS), los cuales al ser excitados con un a luz de longitud de onda (λ) específica interactúan con el oxígeno molecular presente en el medio generando especies reactivas de oxígeno (ERO) tóxicas para las células (Juzeniene et al., 2006).

Uno de los FS evaluados en nuestro laboratorio con gran efectividad sobre la *Leishmania* es la ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl). Hemos establecido un modelo *in vitro* orientado a determinar el efecto del sistema FS-LUZ sobre la

sobrevida de los parásitos y sus células hospederas. En este sistema los parásitos libres o intracelulares luego de ser tratados con el FS son iluminados y luego analizados por técnicas sencillas de laboratorio. Generalmente el efecto de los compuestos sobre el parasito se da en un tiempo final que en nuestro caso es de 24 horas post-irradiación (p.i.) similar a otros autores que trabajan con sistemas laser quienes realizan la evaluación a las 18 horas p.i. (Akilov et al., 2006).

Sin embargo no se tenían registros de los procesos desencadenados inmediatamente después de la irradiación y hasta 24 horas después. No se conoce en qué momento se mueren los parásitos?, cual es el mecanismo de muerte que está sucediendo?, es necrosis o es apoptosis? Era muy posible que en *Leishmania* se estuvieran presentando efectos similares a los que induce la TFD en el modelo de células tumorales donde el TFD induce la muerte de diferentes líneas celulares por apoptosis o necrosis dependiendo del tipo de FS utilizado, del sistema de iluminación y del tipo de célula en estudio (Huang et al., 2005; Huerta et al., 2007; Kessel et al., 2000; Klener et al., 2006; Plaetzer et al., 2005)(Kessel et al., 2000; Moor, 2000).

Los mecanismos de muerte desencadenados por diferentes estímulos físicos o químicos en las formas de promastigote y amastigote de *Leishmania* empiezan a dilucidarse aportando al conocimiento de la biología, de las vías de señalización que desencadenan la muerte celular y también en la búsqueda de nuevos blancos terapéuticos. Se sabe que la *Leishmania*, en presencia de diferentes compuestos o medicamentos como la novobiocina, miltefosina, pentamidina, como también ante la presencia de estímulos físicos o químicos tales como cambios de temperatura o peróxido de hidrógeno, puede expresar marcadores de muerte celular asociados con procesos apoptóticos como fragmentación de ADN, despolarización mitocondrial, cambios morfológicos específicos, expresión de fosfatidilserina entre otros (Das et al., 2001; Dutta et al., 2005; Paris et al., 2004; Verma and Dey, 2004).

No se tienen reportes sobre los mecanismos implicados en la muerte de promastigotes o amastigotes intracelulares de *L. panamensis* frente a cualquier estímulo incluyendo el TFD. Por esta razón se realizó el presente trabajo con el fin estudiar el efecto del TFD utilizando la PcAICI como FS en la expresión de marcadores de apoptosis en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* desde un tiempo 0 a un tiempo final (24-48 horas) post tratamiento

En este trabajo se presenta inicialmente una revisión sobre la leishmaniasis, su agente etiológico, los compuestos y tratamientos utilizados entre estos el TFD, del cual se menciona su fundamento e importancia como estrategia promisoriosa para la eliminación de la *Leishmania*. Adicionalmente se muestra el estado del arte sobre los procesos de muerte en células de mamífero y en parásitos, y los marcadores de apoptosis estudiados en *Leishmania*. Posteriormente, se muestran los objetivos planteados para este estudio y el diseño metodológico propuesto, el cual se basó en la evaluación de la internalización de la PcAICI por lo promastigotes y células THP-1 (utilizadas en este estudio para la producción de amastigotes intracelulares), la identificación por medio de la búsqueda de las condiciones que inducen la muerte del 90% de los parásitos (CC₉₀) luego del TFD y por último, la evaluación de la expresión de 5 marcadores de muerte relacionados con apoptosis.

El estudio de internalización de la PcAICI, basado en la utilización de la microscopia confocal se realizó para demostrar no solo si la PcAICI puede ingresar al interior de las células, también permite identificar si existe una preferencia del compuesto por acumularse en algún lugar específico u organela citoplasmática. Las condiciones como tiempo de incubación de la PcAICI e intensidad de luz (irradiación), necesarios para alcanzar la CC₉₀ en los promastigotes fueron definidas para posteriormente identificar la expresión de marcadores de apoptosis. Estas condiciones también fueron determinadas para la miltefosina y el peróxido de hidrógeno, dos compuestos utilizados como controles dado que se ha

reportado en la literatura, son capaces de inducir la expresión de marcadores de apoptosis en la *Leishmania*.

Se escogieron 5 marcadores de apoptosis, cambios morfológicos, expresión de fosfatidilserina (FSe), pérdida de la actividad mitocondrial, actividad de caspasa 3 y fragmentación nuclear, que de acuerdo a lo reportado en la literatura, se expresan en especies de *Leishmania* del Nuevo y Viejo mundo y que ofrecen información sobre las posibles rutas bioquímicas que podrían ser activadas luego del TFD. Adicionalmente, el estudio de estos marcadores permite establecer diferencias con otros procesos de muerte celular como la necrosis y la autofagia.

Los resultados obtenidos en este estudio aportan al conocimiento sobre la forma como la TFD-PcAICl induce la muerte en parásitos y en como los promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* pueden responder a un estímulo de muerte específico, dato del que no se tenían reportes previos. La utilización del TFD como inductor de muerte es otro dato importante derivado de este estudio, hecho que es de gran importancia dada la plasticidad y direccionamiento que puede obtenerse en el TFD.

1. MARCO TEÓRICO Y ESTADO DEL ARTE

En esta revisión se presenta inicialmente un panorama sobre la leishmaniasis, su agente etiológico, y los compuestos y metodologías utilizadas para su tratamiento, para posteriormente profundizar en el TFD y su utilidad en la eliminación de este parásito. Los diferentes procesos de muerte celular programada serán relatados a la luz de sus marcadores característicos e implicaciones fisiológicas en células de mamífero para luego adentrarse en lo que se conoce al respecto de procesos de muerte celular programada en Trypanosomátidos y específicamente en la *Leishmania*.

1.1 LEISHMANIASIS

1.1.1 Definición y formas clínicas. La leishmaniasis es una zoonosis que enmarca un conjunto de manifestaciones clínicas desencadenadas por la infección con diferentes especies del género *Leishmania*.

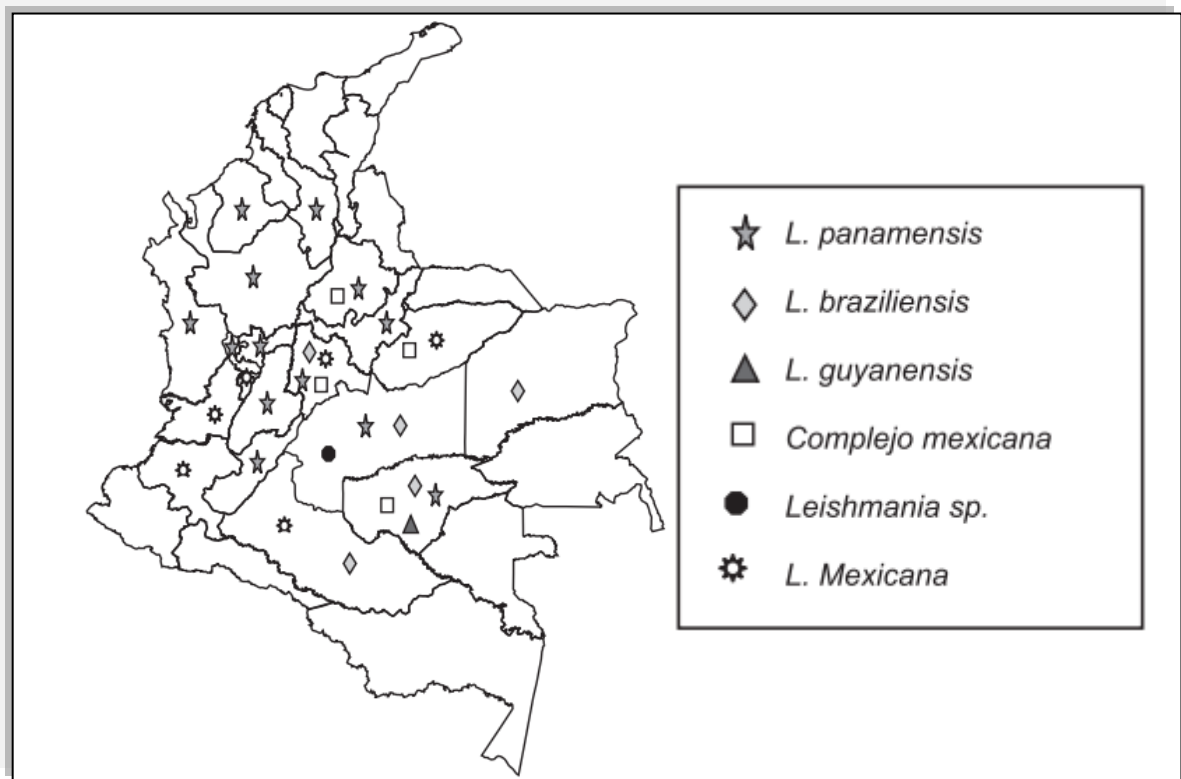
Esta enfermedad es endémica en al menos 88 países, estimándose alrededor de 350 millones de individuos expuestos, 12 millones de personas infectadas, y una incidencia anual de al menos 2 millones de casos de leishmaniasis cutánea (LC) y al menos medio millón de leishmaniasis visceral (LV) (Desjeux, 2004). En Colombia la enfermedad se encuentra distribuida en gran parte del territorio nacional y en menor proporción en la costa Caribe como se muestra en la Figura 1 (Ovalle et al., 2006; Saravia et al., 2002). El número de casos reportados ha venido en ascenso estimándose para el 2007 alrededor de 14.000 casos nuevos (King et al., 2004; Ministerio de la protección social, 2007). La forma clínica prevalente es la LC (95% de los casos reportados) siendo *L. panamensis* la especie más involucrada (Instituto Nacional de Salud, 2009; Ovalle et al., 2006).

El parásito es transmitido a los humanos a través de la picadura de insectos flebotomíneos de los géneros *Phlebotomus*, en el Viejo Mundo y *Lutzomyia* en países del Nuevo Mundo. En Colombia, se han reportado al menos 7 especies de *Lutzomyia* responsables de la trasmisión estableciéndose ciclos de trasmisión selvática y peridoméstica (Ministerio de la protección social, 2007).

Entre las manifestaciones clínicas se encuentra la LC, leishmaniasis mucocutánea (LMC), leishmaniasis cutánea difusa (LCD) y la leishmaniasis visceral (LV).

La LC se caracteriza por presentar lesiones ulceradas de tamaño variable, únicas o múltiples entre 2 semanas y 6 meses después de la infección. Algunas lesiones pueden no ulcerarse y permanecer como placas o nódulos (Bailey and Lockwood, 2007; Ministerio de la protección social, 2007; Reithinger et al., 2007).

Figura 1. Distribución geográfica de la leishmaniasis en Colombia discriminado por agente etiológico.



Tomado de Ovalle y colaboradores 2006 (Ovalle et al., 2006).

Las características intrínsecas del parásito como infectividad, patogenicidad y virulencia y el estado inmune del huésped determinan la expresión de las manifestaciones clínicas, encontrándose un espectro de enfermedad desde casos totalmente asintomáticos hasta casos con manifestaciones de tipo tegumentario o visceral (Murray et al., 2005). Existe una gran influencia de la especie parasitaria infectante tal como se muestra en la tabla 1.

La LMC ocurre como resultado de la diseminación por sangre, sistema linfático o por extensión afectando preferencialmente la mucosa nasal aunque también la mucosa de la faringe, boca, laringe, tráquea. El 50% de los casos se manifiesta durante dos años después a la aparición de la úlcera cutánea inicial (Ministerio de la protección social, 2007; Osorio et al., 1998). La LCD es rara (Ver tabla 1) y se caracteriza por la presencia de nódulos en diferentes áreas del cuerpo. A diferencia de la LC, el tratamiento es complicado y la evolución no tiende a la curación espontánea de las lesiones (Herwaldt, 1999; Reithinger et al., 2007).

Tabla 1. Relación entre las especies de *Leishmania* patógenas para el hombre y las clínicas de la enfermedad

Especie implicada	Forma clínica	Distribución geográfica
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LC, LMC	Sur América, Centro América
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LC, LMC	Norte de Sur América y Sur de Centro América
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LC	Perú
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LC	Sur América
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	LC	Norte de Sur América
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LC, LV, LCD	Sur América
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LC, LCD	Centro América, México, USA, Sur América
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	LC, LCD	Etiopia, Kenia
<i>L. (Leishmania) major</i>	LC	Centro y Sureste de Asia, Medio oriente y Norte de África
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LC	Centro y Sudeste de Asia, Medio oriente y Norte de

Especie implicada	Forma clínica	Distribución geográfica
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	LV, LC	África África, Centro y Sureste de Asia
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	LV, LC	Europa, Norte de África, Centro y Sur América.

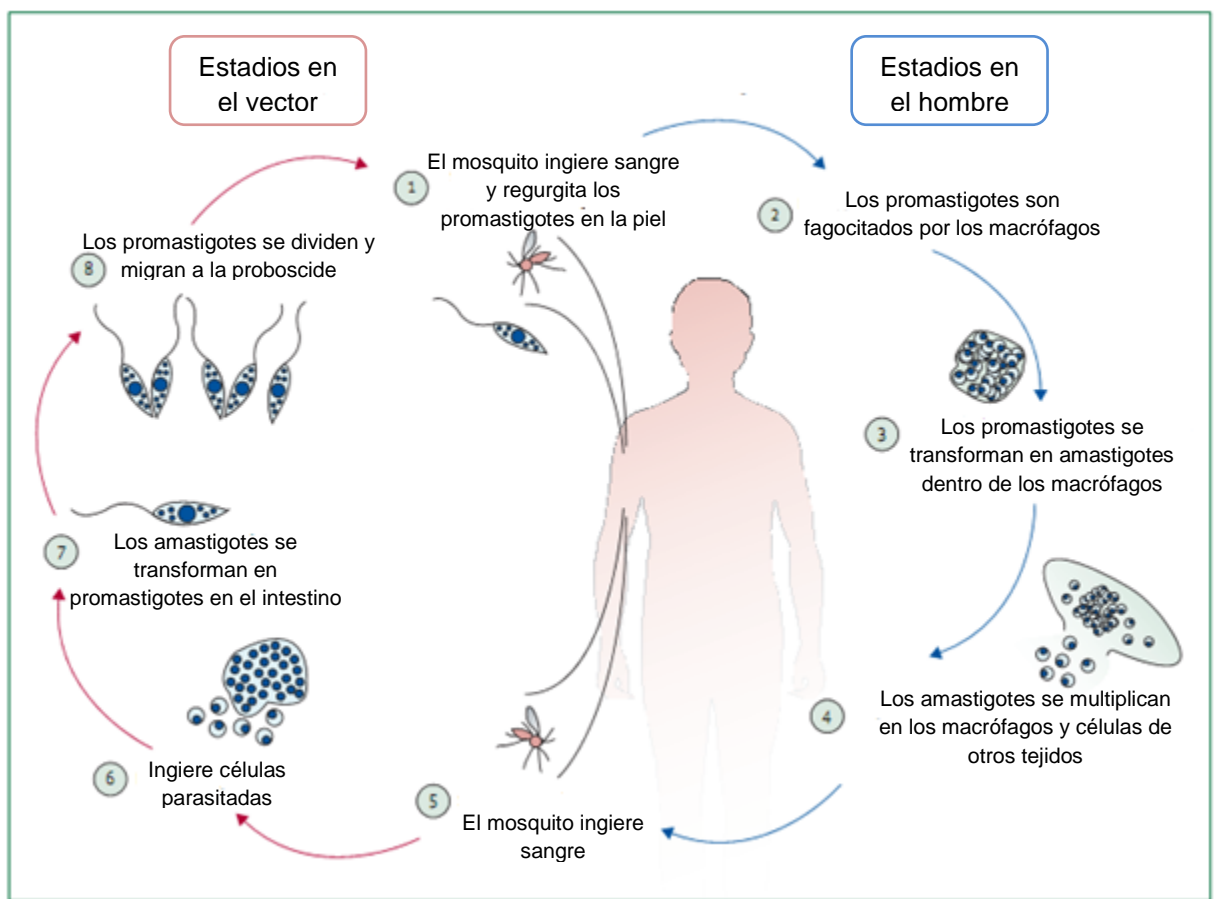
LC: leishmaniasis cutánea, LMC: leishmaniasis mucocutánea, LCD: leishmaniasis cutánea diseminada, LV: leishmaniasis visceral. Basado en la tabla publicada por Reithinger 2007.

La LV conocida también como Kala-azar es la forma más severa de la enfermedad y fatal si no se trata. El parásito se disemina hacia diferentes órganos del sistema retículo endotelial como nódulos linfáticos, bazo, hígado y médula ósea. La enfermedad sigue un curso crónico aunque pueden observarse casos fulminantes sobre todo en pacientes infectados con el virus del VIH (Neuber, 2008). Alrededor del 6-20% de los casos de LV tratados pueden presentar luego de 6 meses o 5 años la reactivación de la infección con presencia de máculas hipocrómicas, pápulas eritematosas faciales y nódulos (Salotra and Singh, 2006).

1.1.2 Agente etiológico. La *Leishmania* pertenece al orden *Kinetoplastida*, familia *Trypanosomatidae*, género *Leishmania*. Este a su vez se divide en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*, clasificación adoptada por Lainson y Shaw en 1987 (Correa et al., 2005). El primero está restringido al Nuevo Mundo, mientras que el subgénero *Leishmania* está distribuido en el Viejo y Nuevo Mundo (Kerr, 2000). Este parásito tiene un ciclo digenético dado que pasa por dos estadios morfológicamente diferentes. Primero está el promastigote que es una forma flagelada presente en el hospedero invertebrado desarrollándose en el intestino del vector y transformándose de una forma no infectiva de promastigote procíclico la cual se multiplica activamente a una forma infectiva para el hospedero mamífero conocida como promastigote metacíclico (da Silva and Sacks, 1987). Los promastigotes metacíclicos son introducidos al hospedero vertebrado donde acceden a las células del sistema fagocítico mononuclear como macrófagos por

mecanismos de reconocimiento receptor-ligando que involucran receptores de complemento, receptores barredores (scavenger receptors) y receptores de manosa y moléculas expresadas por el parásito como la gp63 y los LPG. Una vez en el macrófago los promastigotes se transforman en amastigotes, forma replicativa e intracelular presente en los fagolisosomas (Vannier-Santos et al., 2002).

Figura 2. Ciclo de vida del la *Leishmania*



Basado en el gráfico de Reithinger 2007 (Reithinger et al., 2007).

1.2 TRATAMIENTO DE LA LEISHMANIASIS

El esquema de tratamiento actual se basa en el uso de antimoniales pentavalentes (Sb^V) recomendado por la OMS como medicamentos de primera línea. Como segunda opción se utiliza la anfotericina B (AmB), la pentamidina y la miltefosina (Ministerio de la protección social, 2007; Soto and Soto, 2006a).

1.2.1 Tratamientos sistémicos. Los Sb^V utilizados son el estibogluconato de sodio (Pentostam®) y el antomoniato de meglumina (Glucantime®) (ver estructuras en la Figura 3). El tratamiento es parenteral utilizando dosis de 20mg/Kg de peso por 20-30 días dependiendo de la forma de la enfermedad. La efectividad puede ser hasta del 95% con excepción de la región de Bihar del Norte en la India en donde es del 65% en casos con LV (Berman, 1996; Ouellette et al., 2004; Sundar and Chatterjee, 2006). El uso de estos compuestos puede ocasionar elevación de enzimas cardíacas y afecciones gastrointestinales en un 30% de los casos, disminución de la onda T del electrocardiograma en un 10% de los casos. De manera ocasional se puede presentar trombocitopenia y neutropenia (Gontijo and de Carvalho Mde, 2003). La eficacia de los Sb^V es dependiente del estado inmunitario del paciente agravando el problema de tratamiento en pacientes infectados con VIH (Murray, 2001)

La AmB es un polieno derivado del hongo *Streptomyces nodosum* utilizada en leishmaniasis desde los años sesenta (Sundar et al., 2006). Su aplicación puede ser diaria o alternada por un periodo de tiempo no mayor de 43 días y debe ser monitoreada de forma intrahospitalaria y se utiliza una dosis de 0,75 a 1 mg/Kg de peso por día por 15 a 20 días para LV (Jha, 2006). La utilización de AmB puede producir inicialmente escalofríos y tromboflebitis y en casos de toxicidad severa puede presentarse un efecto nefrotóxico y cardiotoxico (Sundar et al., 2006). Se han preparado formulaciones liposomales de AmB (AmBisome®, Abelcet®, Amphocil®) las cuales disminuyen la toxicidad sin embargo son hasta 10

veces más costosas que la terapia con Sb^V (Gradoni et al., 2003). La dosis recomendada son de 3-5mg/Kg de peso al día por 3-5 días o una dosis única de 15 mg/kg de peso (Jha, 2006; Murray et al., 2005).

La miltefosina (hexadecilfosfolina) es un alquilfosfolípido utilizado inicialmente en cáncer. Su actividad leishmanicida fue descubierta a mediados de los ochenta y constituye el primer tratamiento oral efectivo contra leishmaniasis. Es utilizado en la India para el tratamiento de la LV y en Colombia es utilizado para el tratamiento de la LC. Se utilizan dosis de 2 a 5 mg/Kg de peso al día por 28 días. Se ha demostrado su teratogenicidad en ratones y se ha observado resistencia experimentalmente. Se han demostrado que su actividad depende del estadio y especie de *Leishmania* involucrada presentando una mayor eficiencia en pacientes con LC producida por *L. panamensis* que en pacientes con LC infectados con *L. braziliensis* y *L. mexicana* (Escobar et al., 2002). (Soto and Berman, 2006; Soto and Soto, 2006b).

La pentamidina (Pentacarinat[®]) puede utilizarse como isetionato o metanosulfato de pentamidina. Inicialmente fue utilizado para el tratamiento de la neumonía por *Pneumocystis carinii*, y actualmente utilizado para el tratamiento de la leishmaniasis. En LV se utilizan dosis de 3-4 mg/Kg de peso cada 48 horas hasta un máximo de 10 inyecciones aplicados intramuscularmente. Presenta contra indicaciones en pacientes insulino dependientes y en raros casos puede observarse shock y miocarditis (Olliaro et al., 2005).

Los azoles son compuestos pueden ser administrados oralmente con eficacia variable en leishmaniasis (Minodier and Parola, 2007). Los más utilizados son Fluconazol, Itraconazol, y el Triazol (SCH56592). El Fluconazol ha sido probado en LC con una eficacia del 79% en Arabia (Alrajhi et al., 2002) y el Itraconazol en LMC eficacia del 60% en Brasil (Amato et al., 2000). El Triazol ha sido probado in en ratones BALB/c infectados con *L. amazonensis* y *L. donovani* encontrándose

que una dosis de 60mg/Kg/día reduce las lesiones cutáneas o disminuye la carga parasitaria en bazo e hígado (Al-Abdely et al., 1999).

1.2.2 Tratamientos localizados. Hace referencia a la utilización de cremas, ungüentos, inyecciones u otros tratamientos en el sitio de las lesiones tegumentarias. En este grupo también se encuentran los tratamientos físicos como el TFD, la termoterapia, ultrasonido o la remoción de la lesión por curetaje.

La paramomicina (PM, Leshkutan[®]) es un antibiótico aminoglucósido con acción antibiótica producido por varios tipos de *Streptomyces* y utilizado para el tratamiento de enfermedades parasitarias como giardiasis, amebiasis o en infecciones por *Cryptosporidium*. Su uso tópico se remonta a 1960; sin embargo actualmente se llevan a cabo ensayos clínicos para evaluar la efectividad de su aplicación parenteral en LC y LV (Croft et al., 2006). Varias formulaciones de PM han sido producidas ya sea con cloruro de metil-benzoteniio o con urea con actividades reportadas de 69 y 85,7% de curación respectivamente (Arana et al., 2001; Shazad et al., 2005). Sin embargo algunos estudios muestran una baja actividad de este compuesto (Khatami et al., 2007; Neva et al., 1997).

El imiquimod (Aldara[®]) se utiliza en cremas de 5% de concentración. Es un inmunomodulador que permite que se active una respuesta celular Th1 con liberación del interferón α/β y las IL 1, IL6 y IL 8 y la expresión de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS) (Megyeri et al., 1995; Minodier and Parola, 2007) (Buates and Matlashewski, 1999). Ha sido probado en combinación con Glucantime obteniéndose tasas de curación del 90% luego de 6 meses de seguimiento (Arevalo et al., 2001). Su uso como monoterapia no es recomendado ya que se observa que es efectivo en las primeras dos semanas de tratamiento pero ocho semanas hay reactivación de las lesiones (Seeberger et al., 2003)

Los métodos físicos constituyen una alternativa en el tratamiento de la LC, sin embargo deben ser utilizados con precaución en los casos de LC en el nuevo mundo dado que podrían facilitar la diseminación del parásito a ganglios y mucosas (Bailey and Lockwood, 2007). La aplicación tópica de nitrógeno líquido sobre a las lesiones de LC por 20 o 30 segundos han mostrado curación del 100% de los casos tratados en pacientes de Egipto, Jordán e Israel y soldados estadounidenses (Blum et al., 2004; Willard et al., 2005). De otro lado, el aumento de la temperatura de las lesiones hasta 55°C por 5 minutos, inducida por o por laser infrarrojo, permitió la curación de 177 pacientes de 178 tratados en un periodo de 6 semanas, aunque tiene como desventaja la formación de vesículas cutáneas en las zonas de tratamiento (Blum et al., 2004). El aumento de la temperatura también ah sido probado utilizando radiofrecuencia por lapsos de 30 segundos permite la curación de las lesiones de pacientes con LC (Willard et al., 2005).

El curetaje es otra técnica aplicada para el tratamiento de lesiones locales por LC. Se basa en el raspado de la remoción de los bordes de la lesión previo tratamiento con lidocaína. El tratamiento fue efectivo en 73 de 78 pacientes de Pakistán (Currie, 1983).

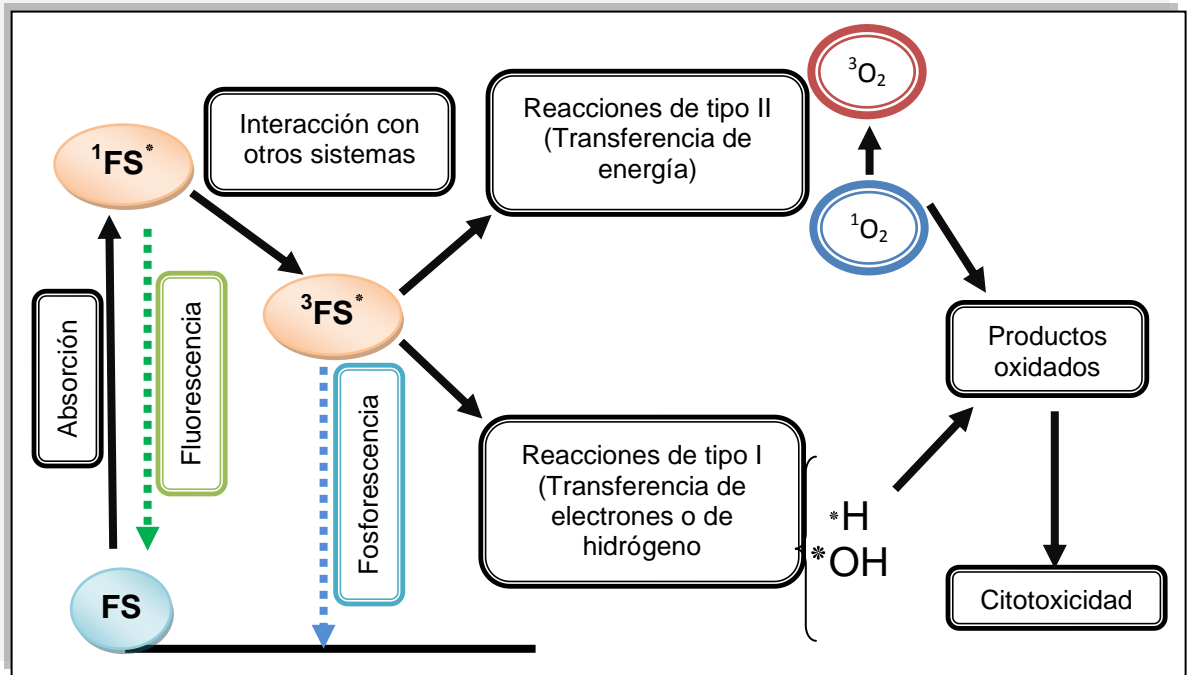
1.2.3 Tratamiento fotodinámico (TFD)

1.2.3.1 El TFD: generalidades. Sus inicios se remontan a los estudios de Raab quien observó muerte de cultivos bacterianos en presencia de acridina y luz. Luego en 1903 von Tapiener y Jesionek utilizó eosina tópica para el tratamiento de tumores (O’Riordan et al 2005). En 1960, Samuel Schwartz mostró que tejidos neoplásicos de pacientes tratados con una mezcla de porfirinas (hematoporfirina derivada o HpD) eran fluorescentes con luz ultravioleta. A comienzos de los años setenta, Dougherty y colaboradores establecieron un protocolo para la producción de HpD a gran escala al tiempo que se desarrollaban fuentes de luz apropiadas

que permitían acceder a órganos internos como vejiga, pulmón y esófago (Dougherty et al., 1998). Actualmente el TFD es ampliamente utilizado para el tratamiento de enfermedades tumorales (Schuitmaker et al., 1996) e infecciosas (Wainwright, 1998). Se han desarrollado diferentes sistemas de iluminación con tipos e intensidades de la luz regulada y se han sintetizado una gran variedad de compuestos fotosensibles llamados fotosensibilizadores (FS) (Gilaberte et al., 2006).

El TFD se basa en la capacidad que tienen los FS de excitarse en presencia de luz de longitud de onda (λ) específica e interactuar con el oxígeno molecular para producir especies reactivas de oxígeno (ERO) (Ochsner, 1997; Osiecka et al., 2003). El proceso involucra la absorción de un fotón de luz por parte del FS permitiendo que este pase de un estado basal a uno excitado altamente inestable conocido como singlete, cuya vida media es de 10^{-9} a 10^{-6} segundos. El FS en estado singlete puede volver a su estado basal emitiendo fluorescencia (luz de λ mayor) o puede realizar interacción intersistemas que le permite pasar a un estado triplete cuya vida media es de 10^{-3} segundos (Luksiene, 2003). El FS excitado en estado triplete puede llevar a cabo reacciones de Tipo I que involucran la transferencia de electrones o átomos de hidrógen a las moléculas orgánicas produciendo una forma radicalaria del FS que a su vez reacciona con el oxígeno para formar peróxido, iones superóxido y radicales hidroxilo, o reacciones de Tipo II en donde la energía se trasfiere directamente del FS excitado al oxígeno en estado basal generando singlete de oxígeno ($^3\text{O}_2$) y FS en estado basal (Ver Figura 3)(Konan et al., 2002)

Figura 3. Modelo de producción de ERO en el TFD



El FS en estado basal es excitado por un fotón de luz y pasa a un estado de singulete excitado, en este estado el FS puede volver al estado basal emitiendo luz o realizar un cruce intersistema y convertirse en una tripleta excitada. Esta última puede interactuar con moléculas orgánicas para formar radicales hidroxilo, peróxido y superóxido (Reacción tipo I) o directamente con el oxígeno para formar oxígeno singulete y FS en estado basal (Reacción tipo II). Basado en el diagrama presentado por Konan 2002 (Konan et al., 2002).

El tipo de respuesta celular de el TFD depende de del FS utilizado (estructura, solubilidad), de la cantidad de ERO generadas, del tipo de célula implicada, de la internalización y localización intracelular del FS y de las condiciones de iluminación empleadas. De tal suerte que la muerte celular bajo el TFD puede dirigir procesos de apoptosis o necrosis (Moor, 2000).

Algunas ventajas que tiene el TFD sobre otras terapias locales es que puede ser altamente selectivo dado que el FS puede ser dirigido específicamente al tejido afectado y la luz puede ser restringida únicamente a la zona que se encuentra en

tratamiento. Por otra parte se sabe que la utilización del TFD en lesiones de piel permite un resultado cosmético favorable (Gilaberte et al., 2006).

1.2.3.2 Fuentes de luz. Se han utilizado desde lámparas de gas de baja potencia (tubos fluorescentes) hasta la nueva generación de láser ajustables de estado sólido como el de neodimio (YAG). Los requerimientos que debe cumplir una fuente de luz ideal incluyen penetración de la luz a través de tejidos hasta su sitio de acción, las λ utilizadas deben estar entre 600 y 1200 nm que permite una penetración en piel de hasta 5 mm. La dosificación de la luz (J/cm^2) debe ajustarse a cada protocolo y FS en particular dado que dosis bajas pueden llevar a efectos sub-letales no efectivos o dosis muy altas pueden llevar a un rápido consumo del oxígeno molecular que disminuye la eficacia terapéutica. Lo recomendado es el fraccionamiento de la dosificación lo que permite la reoxigenación del tejido (Gilaberte et al., 2006).

1.2.3.3 FS utilizados. Los FS son moléculas generalmente heterocíclicas, que generalmente son sintetizadas u obtenidas de extractos naturales. Las características que definen una molécula para su uso en el TFD son: selectividad por el tejido o célula blanco, distribución homogénea en el tejido blanco, carácter lipofílico alto para que pueda difundir fácilmente a través de las membranas biológicas, rápida acumulación en los tejidos luego de su administración, vida media corta y rápida eliminación de los tejidos normales, activación a longitudes de onda de óptima penetración tisular (λ mayores a 630 nm), gran producción de especies reactivas de oxígeno en especial de oxígeno singlete (1O_2). Los diferentes FS utilizados en el TFD se pueden agrupar en 7 grupos como se muestra en la Tabla 2.

1.2.3.4 Ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl). La PcAlCl (ver estructura en la Figura #) es una molécula macrocíclica, hidrófoba con un log P (coeficiente de partición octanol/agua) calculado de 7,3 (<http://www.molinspiration.com/cgi->

[bin/properties](#)) y peso molecular de 574,96 g/mol. Aunque posee un peso molecular alto, su carácter hidrofóbico le permite interactuar fácilmente con bicapas lipídicas (Kasim et al., 2004). Esta característica fue documentada por Bonneau y colaboradores, donde se muestra que la interacción de la PcAlCl disulfonada con la lipoproteína de baja densidad (LDL) ocurre por la porción hidrófoba de la PcAlCl dejando los grupos sulfonados en contacto con el ambiente hidrofílico (Bonneau et al., 2004).

La PcAlCl presenta un alto rendimiento cuántico (0.88) en comparación con otras ftalocianinas (PcCu= 0.43, H₂Pc=0,56) permitiendo una mayor interacción con el oxígeno del medio circundante y por tanto una alta producción de ERO (Frackowiak et al., 2001). La PcAlCl y sus derivados han sido ampliamente utilizados en el TFD para la eliminación de células tumorales y menos activos en células normales (Daziano et al., 1998).

Tabla 2. Clasificación de los principales FS utilizados en el TFD.

Grupo	Nombre del FS
Porfirinas	Hematoporfirina derivado
	Dihemato porfirin éter/éster
	Porfímero sódico
Precursores de porfirinas	Ácido 5-aminolevulínico y sus derivados
Porfícenos	9-Acetoxi-2,7,12,17-tetra-N-propilporfíceno
	2-Hidroxietil-7,12,17-tris(metoxietil) porfíceno
	Bis-hidroxietil-7,12-di-N-propilporfíceno
Ftalocianinas	Ftalocianina de aluminio clorada y sus derivados
	Ftalocianina de Zinc y derivados
	Ftalocianina de Silicio
Clorinas	Clorin e ₆ y derivados
	Derivado del anillo A de la benzoporfirina
Feofórbidos	Feofórbido A
	Bacteriofeofórbido
Otros	Fluoreceinas
	Antracenos
	Hipericina
	Fenotiazinas
	Purpurinas

Basado en Lukšienė 2003 (Lukšienė, 2003).

Inactivando selectivamente células TF-1 (células de eritroleucemia) y la de linfocitos de sangre periférica (Daziano et al., 1998). La PcAlCl y sus derivados ha sido utilizada con éxito en la eliminación *in vitro* e *in vivo* de células tumorales y parásitos (Chan et al., 1986; Escobar et al., 2006; Kolarova et al., 2007).

1.2.3.5 TFD en leishmaniasis. Los estudios iniciales utilizaron promastigotes de *L. amazonensis* transfectados con las enzimas necesarias para la síntesis del grupo hemo. El propósito de esto fue lograr que los promastigotes, al ser incubados con ácido δ -aminolevulínico (ALA), pudiesen sintetizar uroporfirina como FS para posteriormente inducir la muerte del parásito utilizando luz ultravioleta (Sah et al., 2002). Posteriormente se utilizó el ALA para tratar lesiones de pacientes con LC observándose cura parasitológica y dermatológica en 5 lesiones tratadas al cabo de 12 semanas (Gardlo et al., 2003).

Los estudios utilizando precursores o derivados de porfirinas (carbaporfirinas, acenaftoporfirinas, ALA) son la gran mayoría del total de estudios de TFD en Leishmania. Estos estudios han mostrado una gran efectividad para la eliminación del parásito de las lesiones presentes en ratones infectados con *L. major* (Kosaka et al., 2007) aunque se ha observado que la muerte de los amastigotes en el tratamiento con ALA esta mediada por la muerte de la célula hospedera, dando cuenta de la poca selectividad del tratamiento (Akilov et al., 2007).

Estudios posteriores utilizaron las PcAlCl y PcZn para eliminar promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares de Leishmania, observándose una gran eficacia de la PcAlCl para inducir la muerte de promastigotes de *L. panamensis*, *L. chagasi* y *L. amazonensis* (Dutta et al., 2005; Escobar et al., 2006).

Los últimos estudios apuntan al estudio del direccionamiento de los diferentes FS utilizando biomoléculas como la LDL que aseguran la internalización del compuesto y la llegada al fagolisosoma de macrófagos infectados para así

eliminar los amastigotes intracelulares responsables del daño en la infección en el hospedero humano.

1.3 MUERTE CELULAR PROGRAMADA (MCP)

Las MCP es un proceso genéticamente regulado que interviene en la homeostasis y desarrollo de organismo multicelulares y recientemente se ha visto también en organismos unicelulares (Ameisen, 2002). Los primeros estudios se realizaron en 1963 con ayuda de microscopia de luz transmitida y electrónica en los cuales se observaron los cambios que presentaban las células musculares de las polillas (*Antheraea pernyi*) durante la pupación (Lockshin and Williams, 1965). Posteriormente, se publicaron los hallazgos encontrados por Kern et al en 1965 utilizando el modelo de muerte de hepatocitos por isquemia (Kerr, 1965), en donde observó que algunas células disminuían su tamaño, y condensaban su cromatina.

Hoy se conoce que la MCP es un proceso altamente organizado y regulado, diferentes estímulos como la privación de nutrientes o agentes físicos y químicos pueden inducir el bloqueo de una o varias vías metabólicas indispensables para la supervivencia celular (Schultz and Harrington, 2003). Diferentes tipos de muerte, cada uno con características específicas e implicaciones fisiológicas diferentes, pueden ser observados dependiendo de la vía metabólica afectada y del grado de inhibición de la misma (Daniel, 2000; Fink and Cookson, 2005). Dada la gran heterogeneidad entre las diferentes características de los procesos de muerte, en el año 2005 un panel de expertos en MCP se reunió para elaborar una propuesta sobre su clasificación y nomenclatura. A continuación se presenta una breve descripción de los procesos de muerte celular relacionados con un proceso de MCP: apoptosis, necrosis, autofagia y otros.

1.3.1 La apoptosis. Es un proceso de muerte fisiológica, no inflamatorio que implica la programación genética de la célula para promover cambios morfológicos y bioquímicos que conducen a su muerte y eliminación. El proceso de apoptosis se ha visto involucrado en la metamorfosis (perdida de la cola de los renacuajos), eliminación de membranas interdigitales en la formación de los dedos de los fetos humanos, eliminación del endometrio al iniciarse la menstruación y como repuesta fisiológica a células potencialmente dañinas como las células infectadas por virus, células tumorales y células con lesiones en el ADN (Cascales, 2003).

Dependiendo del tipo celular, el proceso de muerte puede desencadenarse por ausencia de señales para la supervivencia de la célula o por estímulos que induzcan el proceso de muerte. Ejemplos de los primeros son las células hematopoyéticas en donde se ha observado que la ausencia del factor estimulador de colonias granulocítico monocíticas (GM-CSF) favorece la apoptosis en neutrófilos (Moulding et al., 1999) y de en células BAF3 (línea celular linfoide derivada de ratón) donde la viabilidad y la capacidad de proliferación son dependientes de la presencia de este factor, caso contrario las células expresan marcadores de apoptosis (Liu et al., 2000). Los estímulos inductores de muerte son diversos entre los que se pueden describir niveles altos de agentes oxidantes al interior de la célula, lesión del ADN por luz ultravioleta; moléculas como el Fas y el factor de necrosis tumoral (TNF α) que se unen a sus receptores específicos ligando del FAS (FasL ó CD95) y TNFR respectivamente.

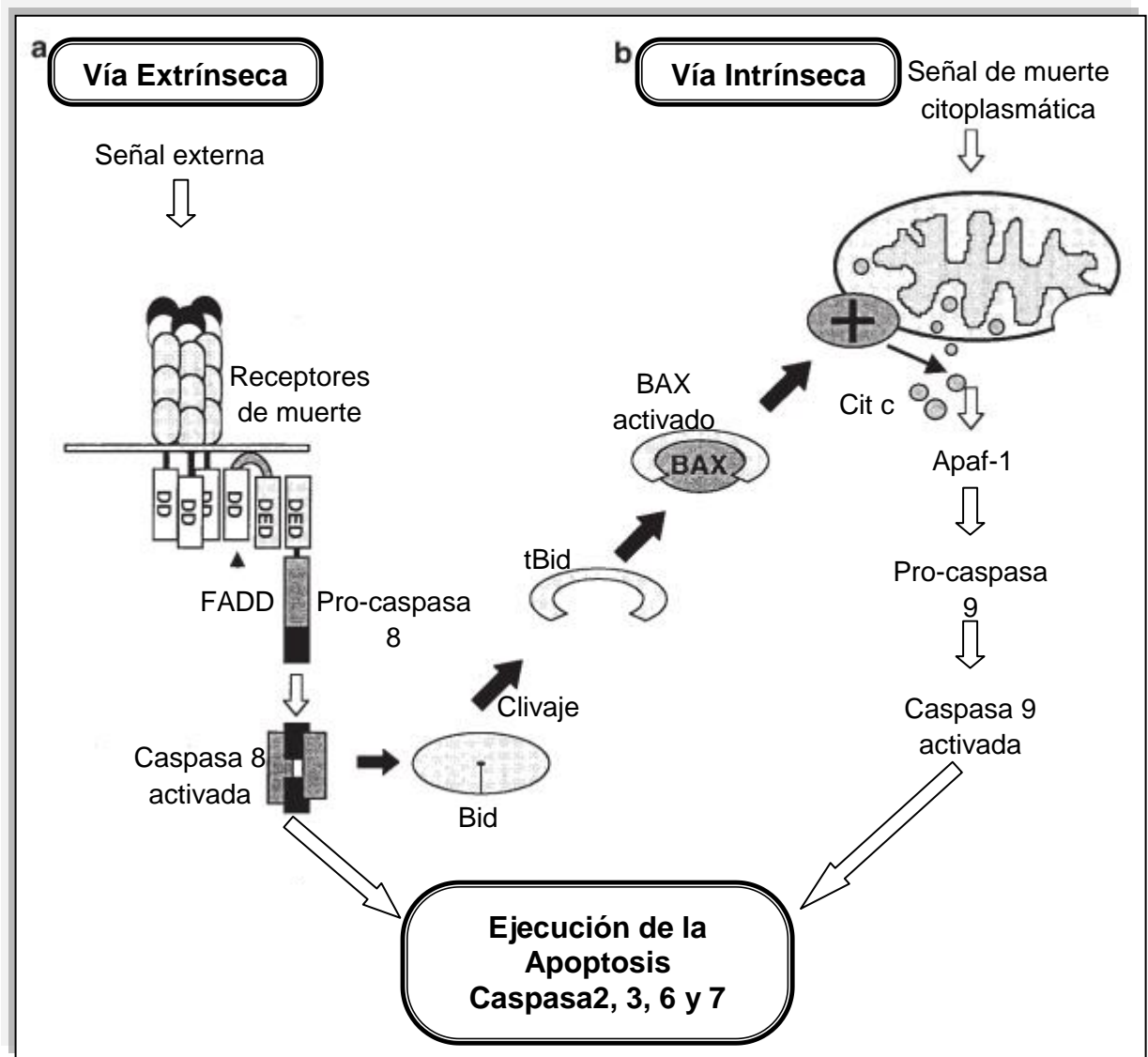
Pueden distinguirse dos grandes vías para la ejecución del proceso de apoptosis en células de mamífero llamadas vía extrínseca y vía intrínseca (Figura 4).

La vía de activación extrínseca inicia con la unión de la molécula mensajera con los receptores transmembrana conocidos como receptores de muerte (death receptors, DR) entre los cuales se conocen 6 tipos diferentes. Fas, TNFR1, DR3, DR6, ligandos inductores de apoptosis relacionados con el TNF (TRAIL) en donde

se identifican dos, el TRAIL-R1 ó DR4 y el TRAIL-R2 ó DR5. Estos receptores poseen una porción intracelular que se denominada dominios de muerte (DD) ubicada en la porción C terminal. La activación de los receptores permite la oligomerización de este y el reclutamiento de proteínas como el FADD y otras proteínas efectoras de muerte que llevan finalmente a la activación de las caspasas (del inglés cysteine-aspartic proteases) 8 y 10 quienes activan a su vez otra serie de caspasas, llamadas efectoras, (caspasa 2, 3 y 6 y 7) (Van Cruchten and Van Den Broeck, 2002).

Las caspasas 3 y 7 median el clivaje de la poli(ADP-ribosa) polimerasa involucrada en la fragmentación del ADN y degradación de las lamininas permitiendo la pérdida de la integridad de la membrana nuclear (Timmer and Salvesen, 2007). Se conoce que estas enzimas también son responsables de los cambios morfológicos observados en la célula bajo apoptosis como la pérdida de la adherencia, formación de globulaciones en la membrana plasmática y alteraciones del citoesqueleto dado que caspasa 3 y 6 pueden interactuar con quinasas como la quinasa activada p21 (Pak2) y la quinasa relacionada con la Ste20 (SLK) que intervienen en el remodelamiento de la actina y la miosina en células de mamífero (Hacker, 2000).

Figura 4. Eventos principales ocurridos en las vía de activación extrínseca e intrínseca de la apoptosis en células de mamífero.



La apoptosis puede iniciarse por la activación de **a.**, vía extrínseca o **b.**, vía intrínseca que desencadena la activación de caspasas que finalmente llevan a la ejecución del proceso de apoptosis. La vía extrínseca e intrínseca se coenctan a través de la activación de la proteína Bid. Modificada de Daniel 2000 (Daniel, 2000).

La vía intrínseca o también llamada vía de activación mitocondrial es iniciada tras la salida del citocromo c desde el espacio intermembrana de la mitocondria hacia el citoplasma. La salida del citocromo c esta mediada por moléculas como el tBid quien permite la formación de un poro en la mitocondria y la posterior salida del citocromo c. La formación del poro también permite la salida de una molécula llamada segundo activador mitocondrial de caspasas (Smac)/DIABLO (Schultz and Harrington, 2003).

Con la salida del citocromo C se induce la polimerización del factor de apoptosis activador de proteasas (Apaf)-1 quien a su vez activa la caspasa 9 y esta la caspasa 3. Adicionalmente la Apaf contribuye también a la fragmentación del ADN en el núcleo (Li et al., 1997).

El citocromo c, es entonces una molécula importante en el desenlace del proceso de muerte a través de la vía intrínseca. Existen diferentes vías por las cuales la mitocondria puede permitir la salida del citocromo c. Una es el clivaje de la proteína Bid, por parte de la caspasa 8, quien interactúa con las proteínas Bax/Bak permitiendo la formación del poro en la mitocondria y la subsecuente salida del citocromo C. Por otro lado, el daño en el retículo endoplasmático permite la salida de grandes cantidades de calcio hacia el citoplasma permitiendo su acumulación en la mitocondria y seguidamente la salida del citocromo c. Esta vía es redundante ya que el citocromo c fuera de la mitocondria puede interactuar con los receptores de inositol-1,4,5-trifosfato (InsP3) permitiendo la salida de mas calcio desde dentro del RE (Mattson and Chan, 2003) y permitiendo la expresión de la fosfatidilserina (FSe) en la cara externa de la membrana plasmática.

La expresión de fosfatidilserina (FSe) en la cara externa de la membrana plasmática se debe a la activación de un proceso conocido como "lipid scrambling" regulado por la proteína escramblasa que es sensible a los cambios en los niveles intracelulares de calcio (Ca²⁺) y a su vez a la inhibición de otra

proteína llamada trasnlocasa encargada de realizar el movimiento de los fosfolípidos como la FSe hacia la cara interna de la membrana plasmática (Pittoni and Valesini, 2002).

1.3.2 Necrosis. Se define como el tipo de muerte celular que incluye la ruptura de la membrana plasmática, dilatación de las organelas citoplasmáticas (Kroemer et al., 2005). Hasta hace unos años la definición de necrosis era negativa, pensándose como el procesos de muerte celular que está presente cuando no hay apoptosis o autofagia, sin embargo, desde hace algunos años está tomando fuerza la idea de que la necrosis también podría ser un proceso de muerte organizado dirigida también por una maquinaria bioquímica altamente regulada similar al proceso de apoptosis.(Proskuryakov et al., 2002). Otra definición dice que la necrosis es realmente una etapa final en los eventos de muerte celular, así cuando es ejecutado el proceso de apoptosis y los cuerpos apoptóticos no son fagocitados, estos podrían estallar finalizando el proceso como una necrosis (Majno and Joris, 1995).

La necrosis se ha reportado como un evento frecuente en las células de tejidos expuestos a isquemia prolongada, a cambios bruscos de temperatura y exposición a ácidos. Se ha propuesto que la necrosis, de la misma forma que la apoptosis podría estar mediada por estímulos fisiológicos. Algunos ejemplos reportados son las neuronas corticales expuestas a glutamato o linfocitos T expuestos a TNF y la activación de canales de calcio (Proskuryakov et al., 2002).

También se ha postulado una vía de activación del proceso de necrosis en la que se concibe que los estímulos desencadenantes de la necrosis podrían desestabilizar de alguna forma los lisosomas, liberando en el citoplasma las calpainas que resultarían como las enzimas efectoras de este proceso (Syntichaki and Tavernarakis, 2002).

1.3.3 Otra formas de MCP. La Autofagia Es un proceso altamente conservado en la evolución que ocurre en todas las células eucariotas. Se diferencia de otros procesos de por qué el citoplasma y otros organelos son secuestrados en grandes vesículas que se unen posteriormente a lisosomas para llevar a cabo la degradación. Se ha visto autofagia en cáncer, cardiomiopatías, enfermedades neurodegenerativas y se especula sea un mecanismo de defensa contra patógenos intracelulares. El desarrollo de este procesos lleva consigo 7 pasos: inducción, selección carga y embalaje, nucleación y formación de la vesícula, expansión de la vesícula y maduración, direccionamiento, contacto y fusión de la vesícula con el lisosoma y quiebre de la vesícula intraluminal con formación del cuerpo autofágico.

La oncosis se define como un proceso anterior a la muerte celular en el cual se presenta hinchamiento celular con pérdida de la permeabilidad de la membrana plasmática. El proceso finalmente lleva al consumo de los recursos de energía celulares y falla de las bombas iónicas ubicadas en la membrana plasmática. Puede ser debido agentes que intervengan en la formación de ATP en la mitocondria. El calcio puede inducir una muerte por oncosis ya que podría activar enzimas como la calpains que media el clivaje de proteínas del citoesqueleto y proteínas de la membrana plasmática.

La piroptosis es una vía proinflamatoria que termina en la activación de caspasa que procesan las proformas de citoquinas inflamatorias como IL-1B e IL-18 con características morfológicas similares a la apoptosis

1.3.4 Métodos de estudio del proceso apoptótico. Se ha desarrollado diferentes técnicas para el estudio de los marcadores de de apoptosis dado que la evaluación de un único marcador puede no ser suficiente para definir el procesos de muerte involucrado tras un estímulo determinado.

Los cambios morfológicos pueden ser evaluados por microscopia de luz transmitida utilizando coloraciones de contraste, sin embargo la técnica de referencia es la microscopia electrónica con la que se realizaron los primeros reportes de las diferencias entre los cambios morfológicos de las células apoptóticas y necróticas. La desventaja de la utilización de la microscopia electrónica reside en la utilización de protocolos y equipos especializados lo que dificulta su utilización para la evaluación de un gran número de muestras (Huerta et al., 2007).

Uno de los marcadores de muerte más estudiados es la fragmentación del ADN el cual puede determinarse observando el patrón de distribución del ADN luego de realizarse la electroforesis del ADN de las células expuestas al estímulo de muerte. La fragmentación se determina por observación de un patrón de bandeo escalonado (patrón en escalera) correspondiente al corte del ADN a nivel de los nucleosomas lo que permite obtener fragmentos de ADN de diferentes tamaños en múltiplos de 200 pb. En 1992 el grupo de Gavrieli reportó una técnica que permite identificar la fragmentación en el ADN sin desintegración de la célula. Esta técnica se basa en el marcaje enzimático de los extremos libre del ADN producto de la degradación y su posterior visualización con compuestos coloreados o fluorescentes. La ventaja de este sistema es que puede identificarse y cuantificarse el número de células que presentan la fragmentación y estimarse que tan fragmentado está el ADN (Gavrieli et al., 1992; Huerta et al., 2007).

Los ensayos que determinan la expresión de la FSe en la cara externa de la membrana plasmática se basan en la utilización de la anexina V, una proteína de 35 kDa dependiente de calcio que muestra una alta afinidad por la FSe. La anexina V ha sido conjugada con diferentes tintes para su uso en microscopia de luz transmitida o de fluorescencia permitiendo la evaluación de este marcador en células vivas y tratadas con fijadores. La introducción de marcadores fluorescentes ha permitido la lectura de este marcador utilizando citometría de flujo, una técnica

versátil que permite cuantificar la expresión del marcador en cada célula individualmente y estudiar simultáneamente la presencia de otros marcadores como la fragmentación del ADN evaluado por TUNEL. (Huerta et al., 2007).

La actividad de diferentes enzimas involucradas en el proceso de apoptosis como las caspasas son evaluadas por la utilización de métodos colorimétricos en los cuales un sustrato específico de la enzima en estudio, es marcado con una molécula incolora, pero que luego de la actividad de la caspasa produce un cambio de color que puede ser cuantificado. También se ha reportado la utilización de anticuerpos como el CM-1 quien reconoce específicamente la forma activa de la caspasa 3 (Huerta et al., 2007; Willingham, 1999).

Se ha propuesto que el primer evento en la activación de la apoptosis por daño mitocondrial involucra la pérdida del potencial de membrana mitocondrial con la subsecuente liberación del citocromo c al citoplasma. Se han utilizados tintes vitales fluorescentes para la estimación del potencial de membrana mitocondrial entre ellos la rodamina 123, el mitotracker y recientemente se ha introducido la utilización del JC-1, un compuesto fluorescente que tiene la capacidad de emitir fluorescencia de dos longitudes de onda diferentes dependiendo si existe o no presencia de potencial de membrana. Como se ha referido anteriormente, la utilización de compuestos fluorescentes para la medición de este marcador trae consigo la ventaja de evaluar varios marcadores simultáneamente (Huerta et al., 2007; Willingham, 1999)

1.3.5 Apoptosis en Leishmania. En organismos unicelulares como la *Leishmania* spp, quien es un parásito los marcadores de apoptosis en presencia de diferentes estímulos, no se conocen las vías moleculares que podrían activar o inhibir un proceso de muerte organizado.

Publicaciones recientes han mostrado que promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* y otros trypanosomátidos expresan marcadores de apoptosis, pero no todos los marcadores son expresados bajo un mismo estímulo (Bruchhaus et al., 2007; Duszenko et al., 2006). Dado que este parásito es el agente causal de la leishmaniasis, se cuenta con una gran variedad de agentes físicos y químicos que inducen la muerte de promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares, producto de los estudios encaminados a la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas para el tratamiento de esta enfermedad.

Recientemente se ha demostrado la efectividad del TFD para la eliminación de promastigotes y amastigotes de *Leishmania* spp y también se ha descrito que el TFD utilizando diferentes FS puede inducir apoptosis en células de mamífero (Almeida et al., 2004; Moor, 2000), por este motivo se realizó el presente estudio.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar la presencia de marcadores de apoptosis en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* luego de la TFD con PcAICI.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Evaluar el efecto fototóxico de la PcAICI en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis*

Identificar el comportamiento a través del tiempo de los marcadores de apoptosis evaluados en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* luego de la TFD con PcAICI.

3. MATERIALES Y METODOS

El presente estudio se dividió en dos fases (ver Figura 5). En la primera los métodos se orientaron a determinar la internalización, localización subcelular y actividad de los compuestos con o sin TFD y en la segunda fase a evaluar la expresión de los marcadores de apoptosis en los promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* luego del TFD.

3.1 REACTIVOS QUÍMICOS Y COMPUESTOS

Como reactivos se utilizaron: PMA, Hoechst 33342, MTT, la sonda JC-1, yoduro de propidio, medio de cultivo Schneider (adquiridos todos de Sigma-Aldrich, St Louis, USA), el DMSO (Carlo Erba Reagenti, Rodano, Italia), el medio de cultivo RPMI 1640 y el SFB (obtenidos de Gibco, Grand Island, NT, USA).

La ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) fue adquirida de Sigma-Aldrich, el peróxido de hidrogeno fue adquirido de MERK, Darmstadt, Germany y la miltefosina fue adquirida de Cayman Chemicals, Michigan, USA. Ver estructuras Figura 6.

Se prepararon soluciones madres de los compuestos en DMSO para la PcAlCl y en medio de cultivo RPMI 1640 sin SBF para la miltefosina y el peróxido de hidrógeno. Las soluciones de trabajo fueron preparadas en medio RPMI 1640 sin SBF inmediatamente antes de los experimentos. Para la PcAlCl se procuró que la concentración de DMSO en contacto con las células fuese inferior al 1%.

Figura 5. Diagrama de flujo de la metodología llevada a cabo para el desarrollo de este estudio

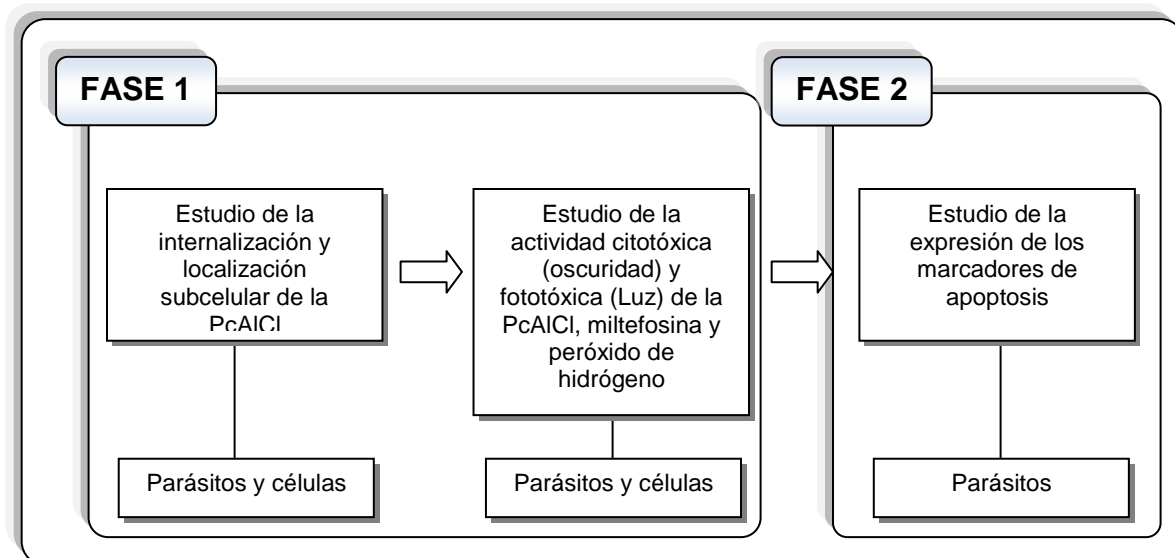
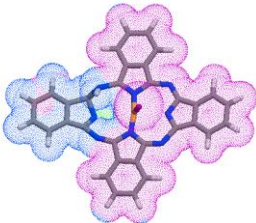
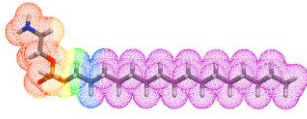
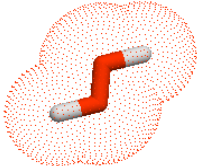


Figura 6. Estructura de los compuestos utilizados en este estudio.

Nombre	PcAlCl	Miltefosina	Peróxido de hidrógeno
Estructura*			
Peso molecular	574,96	407,6	34,02
Fórmula	$C_{32}H_{16}AlClN_8$	$C_{21}H_{46}NO_4P$	H_2O_2

*Estructuras realizadas con el programa Molinspiration (<http://www.molinspiration.com/cgi-bin/properties>).

3.2 PARÁSITOS Y CÉLULAS

Se utilizaron promastigotes de *L. panamensis* (MHOM/PA/71/LS94) los cuales fueron mantenidos en medio Schneider con 10% de SBF inactivado (SBFi) a 25°C.

Se les realizó una curva de crecimiento y los parásitos fueron utilizados en fase de crecimiento exponencial en todos los experimentos.

Se utilizaron las células humanas de leucemia monocítica aguda (THP-1, ATCC TIB 202) las cuales fueron cultivadas en el medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SBFi a 37°C, 5% de CO₂, 95% de humedad relativa. Las células se transformaron a su fenotipo adherente con 80 ng/mL de PMA por 72 horas.

Los amastigotes intracelulares se obtuvieron infectando las células THP-1 transformadas con promastigotes utilizando un radio de infección célula: parásito de 1: 10 durante 48 horas a 32°C, 5% de CO₂, 95% de humedad relativa. El porcentaje de infección fue determinado contando el número de células infectadas por cada 300 células observadas.

3.3 REGISTRO FOTOGRÁFICO

El registro fotográfico fue realizado utilizando la cámara Nikon Coolpix 5100 en modo automático. Para cada caso se tomaron por lo menos 10 fotos de campos microscópicos independientes para lo experimento en los que se utilizó el microscopio de fluorescencia o de luz transmitida. Las fotos posteriormente fueron procesadas con el Software ADOBE Photoshop CS4 (Adobe Systems Incorporated, San José, USA).

3.4 INTERNALIZACIÓN Y LOCALIZACIÓN SUBCELULAR DE LA PcAICI

3.4.1 Internalización de la PcAICI. Se determinó en parásitos y en células THP-1 utilizando microscopía confocal.

Los promastigotes (1×10^6 parásitos/mL) fueron cultivados en cajas de 24 pozos con 5 μ M de PcAICI por 24 horas a 25°C. Las células THP-1 (3×10^5 células/mL)

fueron transformadas sobre laminillas de vidrio en placas de 24 pozos y se incubaron con 5 μ M de PcAlCl por 24 horas a 37°C, 5 % de CO₂, 95% de humedad relativa.

Los parásitos y las células se lavaron dos veces con PBS pH 7,2 y se observaron en el microscopio confocal (Olympus FluoView 1000) utilizando tanto DIC para observar la estructura y morfología de los parásitos como un laser de argón multilínea (457nm, 488nm y 515nm) para excitar los compuestos fluorescentes. La presencia de PcAlCl se observó añadiendo a las imágenes un pseudocolor rojo. Al menos 3 campos fueron registrados. Se realizó reconstrucción en tres dimensiones de los promastigotes tomando al menos 10 planos focales (Anexo 1).

3.4.2 Localización mitocondrial. Se determinó en células THP-1 por microscopía confocal.

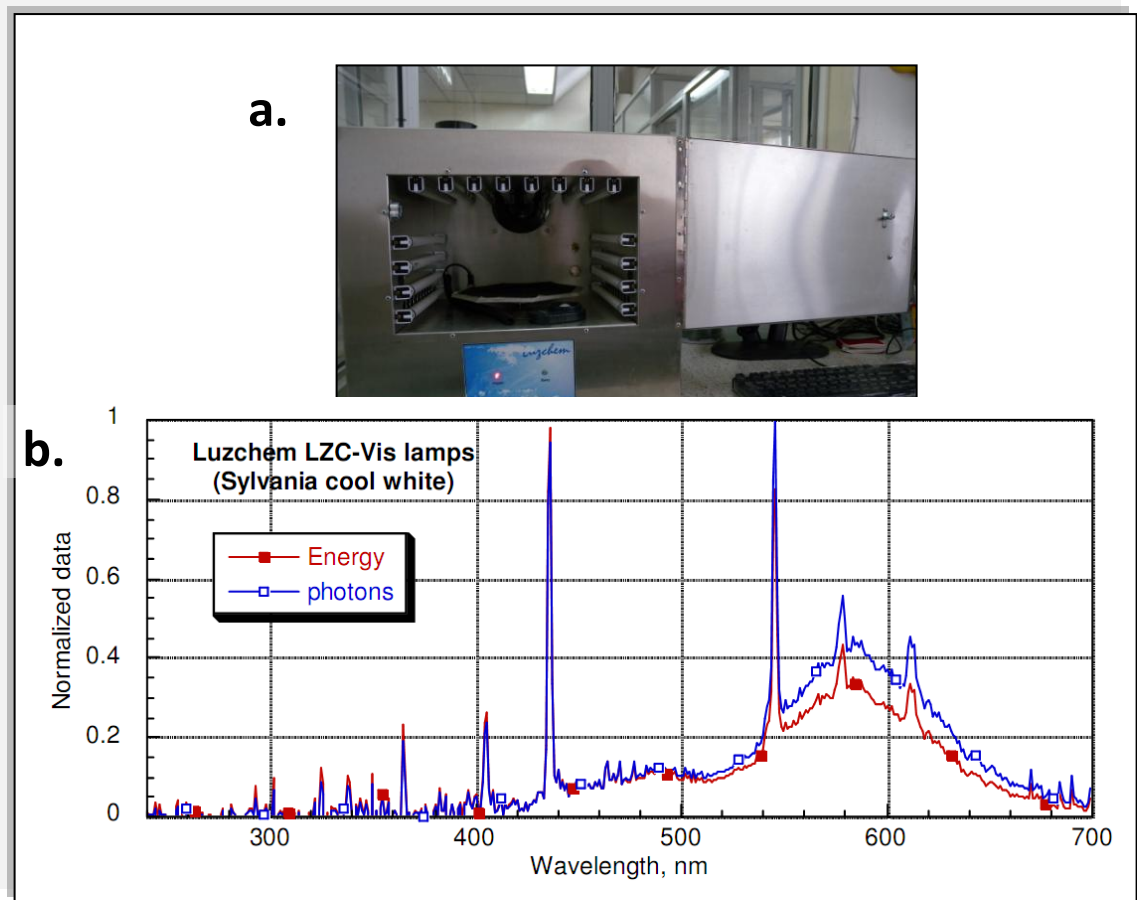
Las células THP-1 transformadas e incubadas con 5 μ M de PcAlCl por 24 horas fueron tratadas con la sonda JC-1 por 15 minutos a 37°C. Las láminas fueron lavadas dos veces con PBS y luego observadas con el microscopio confocal utilizando DIC y un laser de argón multilínea (457nm, 488nm y 515nm) y el filtro predeterminado para Alexa fluor 488 para PcAlCl y el JC-1. La presencia de PcAlCl se observó añadiendo a las imágenes un pseudocolor rojo y la presencia del JC-1 añadiendo un pseudocolor verde. La co-localización de la PcAlCl y del JC-1 se observó por la presencia de un pseudocolor amarillo al superponer las imágenes de la PcAlCl y JC-1. Se tomó registro de por lo menos 3 campos diferentes.

3.5 ACTIVIDAD DE LOS COMPUESTOS

3.5.1 Tratamiento fotodinámico (TFD). El TFD se realizó utilizando un fotorreactor biológico marca Luzchem (Luzchem Research Inc, Ontario, Canada)

(Figura 7a) el cual permite una rotación constante de las placas, un control de la temperatura y una emisión de luz en el espectro visible (400-700 nm, figura 7b). Las células fueron irradiadas por 32 minutos utilizando una fluencia de 12000 lux (5 julios/cm²). La temperatura se ajustó dependiendo de la célula a tratar siendo de 37°C para las células THP-1, de 32°C para los amastigotes intracelulares y de 25°C para los promastigotes. Previamente parásitos y células fueron expuestos a la irradiación por 35 minutos para determinar el TFD sin compuesto induce algún tipo de alteración en la morfología o viabilidad celular.

Figura 7. Sistema de irradiación



a. Equipo utilizado, fotorreactor biológico Luzchem. **b.** Espectro de luz visible emitido por el equipo (tomado del “General Manual for Luzchem Photoreactors”, sección 3 Lamp emission spectra).

3.5.2 Actividad de los compuestos en promastigotes de *L. panamensis*. Los promastigotes (1×10^6 parásitos/mL) en cajas de 96 pozos fueron tratados con diferentes concentraciones de PcAlCl (0,02-1,66 μ M), miltefosina (1,66 μ M-135 μ M) y peróxido de hidrógeno (187,5-3000 μ M) por 24 horas a 25°C. Parásitos controles fueron mantenidos sin compuesto. Posteriormente se realizó el TFD y 24 horas después los parásitos fueron suspendidos en PBS-formalina al 3,7% para ser contados microscópicamente utilizando una cámara de Neubauer. Se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento comparando el crecimiento de los parásitos tratados con los compuestos con los parásitos control no tratados. Para todos los experimentos se realizaron controles donde los parásitos no fueron sometidos al TFD.

La actividad de los compuestos fue expresada como concentración capaz de inhibir el 90% de los parásitos (CI_{90}) calculadas por análisis de regresión sigmoideal utilizando el software MSXIfit™, ID Bussines solutions, Guildford UK.

Se realizaron dos experimentos independientes en los cuales se probaron los compuestos por triplicado (n=6).

Teniendo en cuenta la actividad de los compuestos al TFD y los no expuestos se calculó el índice fototóxico (IF) que establece la relación entre la actividad del compuesto en oscuridad y la actividad del compuesto luego del TFD, utilizando la fórmula: CC_{90} oscuridad / CC_{90} irradiado. Se considero fotoactivo aquel compuesto con $IF \geq 3$ (Lock and Friend, 1986).

3.5.3 Actividad de los compuestos en células THP-1. Las células THP-1 (1×10^6 células/mL) fueron transformadas en placas de 96 pozos y tratadas con diferentes concentraciones de PcAlCl (0,02-1,66 μ M) por 24 horas a 37°C, 5% de CO_2 , 95% de humedad relativa, pasado este tiempo se adicionó la miltefosina (1,66 μ M-135 μ M) y peróxido de hidrógeno (187,5-3000 μ M) e inmediatamente se

realizó el TFD. Células controles fueron mantenidas sin compuesto. La muerte celular fue evaluada 24 horas pi utilizando la prueba de reducción de MTT (Young et al., 2005). Brevemente, las células fueron incubadas con MTT (5 mg/ml) y después de 4 horas los cristales de formazán fueron solubilizados con DMSO. Las placas se llevaron a lectura en un lector de microplacas (Anthos 2020) y se leyeron con una λ de 580 nm. El porcentaje de muerte celular fue calculado utilizando la fórmula: % de muerte celular = $(1 - \text{DO de las células tratadas} / \text{promedio de las DO de las células control}) \times 100$. En todos los experimentos se realizaron controles donde las células no fueron sometidas al TFD.

La actividad de los compuestos fue expresada como la concentración citotóxica para el 90% de las células (CC_{90}) calculadas por análisis de regresión sigmoideal. Los datos mostrados fueron obtenidos de dos experimentos independientes en los cuales se analizaron las variables por triplicado ($n=6$).

Se calculó el IF como se describió anteriormente. Se calculó el índice de selectividad (IS) que establece la relación entre la actividad del compuesto en parásitos y en células de mamífero. Se calculó siguiendo la fórmula $IS = CC_{90} \text{ de las células THP-1} / CC_{90} \text{ parásitos sean promastigotes o amastigotes}$.

3.5.4 Actividad de los compuestos en amastigotes intracelulares de *L. panamensis*. Las células THP-1 infectadas con promastigotes de *L. panamensis* (fase estacionaria de crecimiento) en láminas para inmunofluorescencia (Cel-Line) fueron tratadas con diferentes concentraciones de PcAlCl ($0,02 \mu\text{M}$ - $1,66 \mu\text{M}$), por 24 horas. La miltefosina ($0,06 \mu\text{M}$ - $5 \mu\text{M}$) fue adicionada inmediatamente antes del TFD. Células infectadas controles fueron mantenidas sin compuesto. Se realizó el TFD. Luego de 72 horas las láminas fueron fijadas con una solución de formaldehído al 10% y metanol por 10 minutos y coloreadas con Giemsa. El porcentaje de infección fue determinando microscópicamente por conteo directo contando el número de células infectadas en 300 células. La actividad de los

compuestos fue determinada comparando el número de células infectadas para cada compuesto con el número de células infectadas en las células control. La actividad de los compuestos fue expresada como la concentración citotóxica para el 90% de las células (CC_{90}) calculadas por análisis de regresión sigmoideal utilizando el software MSXIfit™, ID Bussines solutions, Guildford UK. Los datos mostrados fueron obtenidos de dos experimentos independientes en los cuales se analizaron las variables por triplicado ($n=6$). Se calculó el IF como se describió anteriormente. Se calculó el índice de selectividad (IS) como se describió anteriormente

3.6 DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE APOPTOSIS LUEGO DE LA TFD

3.6.1 Tratamiento de los parásitos. Los promastigotes (1×10^6 promastigotes/mL) fueron tratados con PcAlCl ($CC_{90}= 0,14 \pm 0,02 \mu\text{M}$, por 24 horas), miltefosina ($CC_{90}= 5,37 \pm 0,14 \mu\text{M}$, por 5 minutos) y peróxido de hidrógeno ($CC_{90}= 720,28 \pm 150,27 \mu\text{M}$, por 5 minutos). Parásitos controles fueron mantenidos sin tratamiento. Después se aplicó el TFD y se determinaron los marcadores de apoptosis 0, 6, 12 y 24 horas p.i. En todos los experimentos se realizaron controles donde los promastigotes no fueron sometidos al TFD.

Los amastigotes intracelulares fueron tratados con PcAlCl ($1,6 \mu\text{M}$) por 24 horas y posteriormente se realizaron dos lavados con PBS. La miltefosina ($5 \mu\text{M}$) se adicionó inmediatamente antes del TFD. Parásitos controles fueron mantenidos sin tratamiento. Después se aplicó la TDF y se determinó los cambios morfológicos, expresión de FSe, activación de caspasa 3, actividad mitocondrial y fragmentación de ADN. Luego de la adición de compuestos y el TFD, las células fueron lavadas con PBS $\text{pH}=7,2$ a las 0, 24, 48 y 72 horas post irradiación y posteriormente fijadas utilizando formol 2% en PBS $\text{pH}=7,2$. En todos los

experimentos se realizaron controles donde los amastigotes intracelulares no fueron sometidos al TFD.

3.6.2 Cambios morfológicos. Luego del TFD los promastigotes fueron lavados con PBS a 10.000 rpm por 1 minuto y se trataron con 50 μ L de formalina 3,7% en PBS. Se colocaron sobre láminas de vidrio las cuales se dejaron secar a temperatura ambiente. Las células THP-1 infectadas con amastigotes intracelulares fueron lavadas dos veces con PBS y luego fijadas con formalina 3,7% por 10 minutos y con metanol absoluto por 1 minuto. El metanol se dejó evaporar a temperatura ambiente.

Las láminas de promastigotes y de amastigotes intracelulares fueron coloreadas con Giemsa y fotografiadas con magnificación de 1000 aumentos en microscopio de luz transmitida. Se realizó el registro fotográfico de al menos 10 campos para condición evaluada. Se registraron los cambios en el tamaño y la forma celular, conformación de la cromatina, presencia o ausencia de núcleo, kinetoplasto y flagelo.

3.6.3 Expresión de fosfatidilserina (FSe). Se utilizó la prueba comercial de Annexin-V-Fluos staining (Roche Diagnostics, Penzberg, Germany). Se preparó una solución Annexin-V y ioduro de propidio (solución de marcaje) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Veinticuatro horas después del TFD los promastigotes fueron tratados con la solución de marcaje por 10 minutos a temperatura ambiente y colocados entre láminas y laminilla para ser observados en un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400) utilizando el filtro B2A (Excitación= 450-490, filtro dicróico= 500, Emisión=515). La expresión de FSe fue observada como presencia de color verde. Se contaron los parásitos de color verde (FSe+) en 300 células contadas.

Los resultados se expresaron como el porcentaje de promastigotes positivos para FSe (FSe +).

3.6.4 Activación de caspasa 3. Se utilizó la prueba comercial de ApoAlert Colorimetric Assay Kit (BD Bioscience). Luego del TFD los promastigotes fueron lisados con solución de lisis de células (Lysis buffer™) y posteriormente tratados con DEVD-pNA, sustrato incoloro pero que al ser clivado por caspasa 3 se libera el pNA produciendo color amarillo. El cambio de color se cuantificó midiendo la absorbancia en un lector de microplacas (Anthos 2020) utilizando el filtro de 405 nm. Los resultados se expresarán como el promedio \pm la desviación estándar de nmoles de pNA producidos. Como control positivo de la prueba se utilizaron células HeLa expuestas previamente a 100 μ M de etopósido durante 48 horas. Como controles negativos se utilizaron promastigotes sin compuesto y sin el TFD.

3.6.5 Potencial de membrana mitocondrial. Luego del TFD los promastigotes fueron lavados dos veces con PBS centrifugando a 10.000 rpm por 1 minuto. Los parásitos fueron tratados con la sonda JC-1 (20 μ M) diluida en PBS por 10 minutos a 37°C, 5% de CO₂. Los parásitos fueron lavados dos veces y colocados entre láminas y laminilla para ser observados en un microscopio de fluorescencia con el filtro B2A (Excitación= 450-490, filtro dicrómico= 500, Emisión= 515). La presencia de potencial de membrana mitocondrial se observó como presencia de color amarillo-naranja en el cuerpo de los promastigotes producto de la dimerización del JC-1 al interior de las mitocondrias activas. La pérdida del potencial de membrana se observó como ausencia de color amarillo o naranja en el cuerpo del parásito. El fue cuantificado por conteo directo de los parásitos con potencial de membrana en 300 células. Los resultados se expresaron como el porcentaje de promastigotes con potencial de membrana.

3.6.6 Fragmentación de ADN

3.6.6.1 Electroforesis del ADN en gel de agarosa. Luego del TFD los promastigotes fueron lavados dos veces con PBS. El ADN fue extraído por el método de “Salting-Out” utilizando la solución de lisis (10mM Tris-HCl, 10mMEDTA pH 8.0, 50mM NaCl), proteinasa K (20 mg/mL) y SDS (10%) y agitación fuerte con vortex para permitir la lisis celular y la liberación del ADN. Las proteínas fueron retiradas de la solución por precipitación al añadir acetato de sodio (5 M) e incubando posteriormente en hielo por 5 minutos. La suspensión fue centrifugada a 14.000 rpm por 10 minutos. El ADN fue precipitado con isopropanol frío (2:1, v/v) y lavado dos veces con etanol 70% frío, para retirar el exceso de sales. El ADN se dejó secar por 30 minutos para eliminar el etanol y se suspendió en 20 µL de TE 1X. El ADN obtenido fue almacenado a -20°C hasta su corrido por electroforesis.

Para la electroforesis en gel de agarosa, el ADN fue descongelado a TA y calentado a 60°C por 30 minutos. El ADN se mezcló con buffer de carga (10 mM Tris-HCl (pH=7,6), 0,03% de azul de bromofenol, 0,03% de xileno cianol, 60% de glicerol y 60 mM de EDTA) y servido en un gel de agarosa 1,2% en buffer TAE 1X. La electroforesis se realizó durante 1 hora a 75 voltios. El ADN fue visualizado sumergiéndolo en una solución de bromuro de etidio 1 µg/mL por 10 minutos.

La fragmentación del ADN fue evaluada por la presencia de patrón oligonucleosomal como el reportado por Sagata y colaboradores (Nagata et al., 2003).

3.6.6.2 Marcaje de ADN in situ técnica de TUNEL. Se utilizó la prueba comercial de TACS™ 2 TdT-Fluor In Situ Apoptosis Detection Kit (Trevigen, Inc) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Luego del TFD los promastigotes o amastigotes intracelulares fueron fijados con formaldehído y deshidratados por pases sucesivos en etanol 70%, 95% y 100% por 5 minutos cada vez. Las muestras fueron permeabilizadas con una solución de lisis de células (Cytonin™) por 30 minutos, lavadas con agua destilada, sumergidas en buffer de marcaje (1X TdT buffer labeling) por 5 minutos y tratadas con la solución de marcaje que contiene (Labelling reaction mix) por 1 hora en cámara húmeda. Esta solución contiene la enzima que pega los dNTPs marcados a los extremos libres presentes en el ADN fragmentado. El revelado de la prueba se realizó adicionando la solución de revelado (Strep-Fluor solution) que contenía un compuesto fluorescente que puede unirse específicamente a los dNTPs adicionados por la enzima. Las muestras fueron leídas utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon eclipse E 400) equipado con el filtro B2A (Excitación= 450-490, filtro dicróico=500, Emisión=515). Se realizó un segundo marcado adicionando Hoechst 33342 (1 µg/mL) por 5 minutos a TA para visualizar la presencia de ADN total en todas las células.

La presencia de fragmentación en el ADN se observó de color verde cuando las láminas se observaron con microscopía de fluorescencia utilizando el filtro B2A (Excitación= 450-490, filtro dicróico= 500, emisión= 515). La presencia de todo el ADN se observó de color azul utilizando el filtro UV2A (Excitación= 330, filtro dicróico=400, emisión=420). Para los promastigotes se contaron los parásitos con fragmentación del ADN en 300 células observadas.

Los resultados se expresaron para los promastigotes como porcentaje de promastigotes TUNEL+ y para los amastigotes intracelulares como presencia o ausencia de fragmentación de ADN.

3.7 ANÁLISIS DE RESULTADOS

Las diferencias estadísticamente significantes en la actividad de cada compuesto en oscuridad y luego del TFD fueron determinadas utilizando la prueba t de Student.

Las diferencias entre las actividades de los 3 compuestos en los promastigotes o en los amastigotes intracelulares se determinaron utilizando el test de análisis de varianza de una vía (ANOVA, por sus siglas en inglés) y utilizando la prueba de múltiples comparaciones de Tukey`s como post-test.

Las diferencias en el comportamiento en el tiempo de cada compuesto, con respecto a un marcador de apoptosis específico se analizaron obteniendo el área bajo la curva para cada compuesto y posteriormente comparando estos datos con ayuda de ANOVA de una vía. Para todos los análisis se consideró un valor de p menor de 0,05 ($p < 0,05$) como estadísticamente significativo. Los análisis se realizaron utilizando el software GraphPad Prism versión 5.03

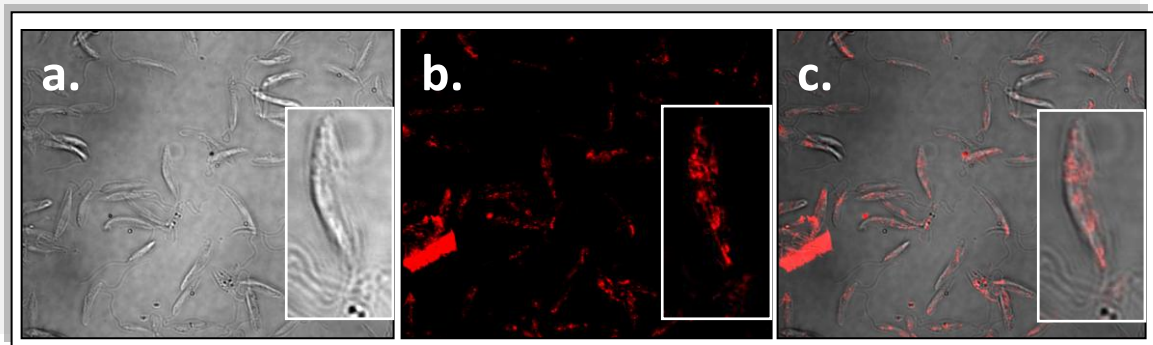
4. RESULTADOS

Los resultados muestran inicialmente los efectos de la PcAlCl en los parásitos y células en términos de internalización y del efecto inhibitorio que inducen cuando son sometidos a irradiaciones o cuando son mantenidos en oscuridad. Posteriormente basados en estos resultados se muestran los efectos del tratamiento fotodinámico en los marcadores de apoptosis en los parásitos desde el momento en que se termina la irradiación hasta 24-72 horas después. Se muestra el efecto sobre los cambios morfológicos, la expresión de FSe, la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, la actividad de caspasa 3, los cambios en la actividad mitocondrial y la fragmentación del ADN todos estos conocidos como marcadores de apoptosis. Paralelamente se estarán mostrando los resultados encontrados con compuestos de referencia como la miltefosina y el peróxido de hidrógeno.

4.1 EFECTOS DE LOS COMPUESTOS EN LOS PARÁSITOS Y CÉLULAS

4.1.1 La PcAlCl fue internalizada por los parásitos y las células THP-1. La PcAlCl fue internalizada por los promastigotes de *L. panamensis* luego de 24 horas de tratamiento, ubicándose en el citoplasma con un patrón de distribución granular a lo largo del cuerpo del parásito (Figura 8b). No se observó fluorescencia rodeando el citoplasma y tampoco el flagelo. La internalización fue confirmada por superposición de las imágenes de los parásitos tomadas con microscopia diferencial de contraste de interferencia (DIC) y con fluorescencia (Figura 8c).

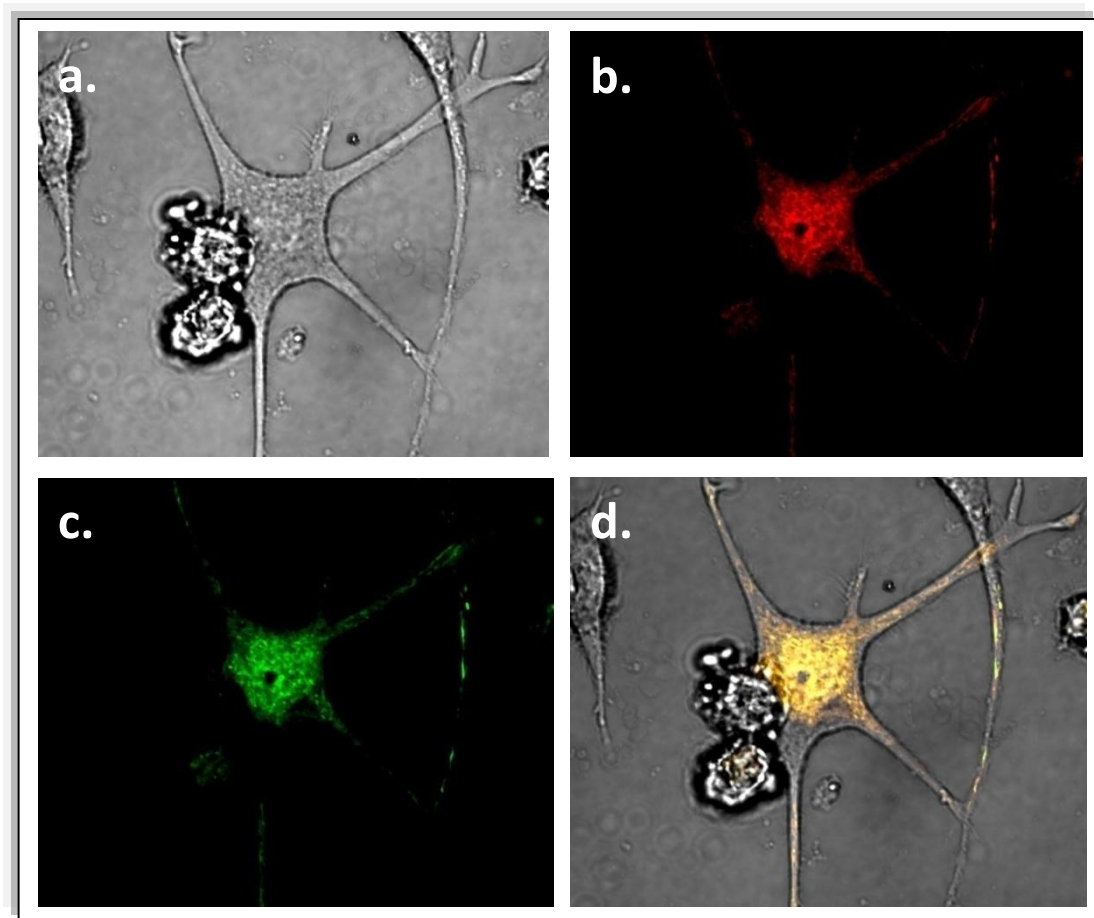
Figura 8. Internalización de la PcAICI en promastigotes de *L. panamensis*



Microfotografías de promastigotes de *L. panamensis* expuestos a 5 μ M de PcAICI tomadas con el microscopio confocal Olympus FV1000 utilizando un aumento de 1000X. **a.** Promastigotes captados con DIC. **b.** La PcAICI se observa en color rojo. **c.** Superposición de las imágenes **a** y **b**. En el extremo inferior derecho se muestra para cada fotografía, la ampliación digital de un solo promastigote.

La PcAICI fue internalizada por las células THP-1 transformadas luego de 24 horas de tratamiento observándose en el citoplasma y en menor proporción en las prolongaciones citoplasmáticas (Figura 9b, color rojo). La PcAICI se co-localizó en las mitocondrias observándose un color amarillo en la Figura 9d resultante de la superposición de las imágenes de las células tratadas con PcAICI (color rojo) y con la sonda mitocondrial (color verde).

Figura 9. Internalización de la PcAICI en células THP-1 y localización mitocondrial.



Microfotografías de una célula THP-1 expuesta a 5 μ M de PcAICI tomadas con aumento de 1000X. **a.** Célula THP-1 observada con DIC. **b.** Distribución de la PcAICI al interior de la célula (color rojo), **c.** Distribución de las mitocondrias marcadas con la sonda JC-1 (color verde), **d.** Co-localización de la PcAICI y las mitocondrias (color amarillo).

4.1.2 Los promastigotes y las células THP-1 fueron fotosensibles al tratamiento con PcAICI. La PcAICI inhibió el crecimiento de los promastigotes de *L. panamensis* y fue tóxica para las células THP-1, 24 horas después de la irradiación.

La PcAlCl mostró una actividad de CC_{50} $0,06 \pm 0,01 \mu\text{M}$ y CC_{90} de $0,14 \pm 0,02 \mu\text{M}$ en los promastigotes y de CC_{50} $0,37 \pm 0,14 \mu\text{M}$ y CC_{90} $4,66 \pm 2,26 \mu\text{M}$ en las células THP-1 (Tabla 1).

La PcAlCl en las concentraciones ensayadas no fue tóxica para los parásitos ni las células en condiciones de oscuridad (células no irradiadas, $0\text{J}/\text{cm}^2$).

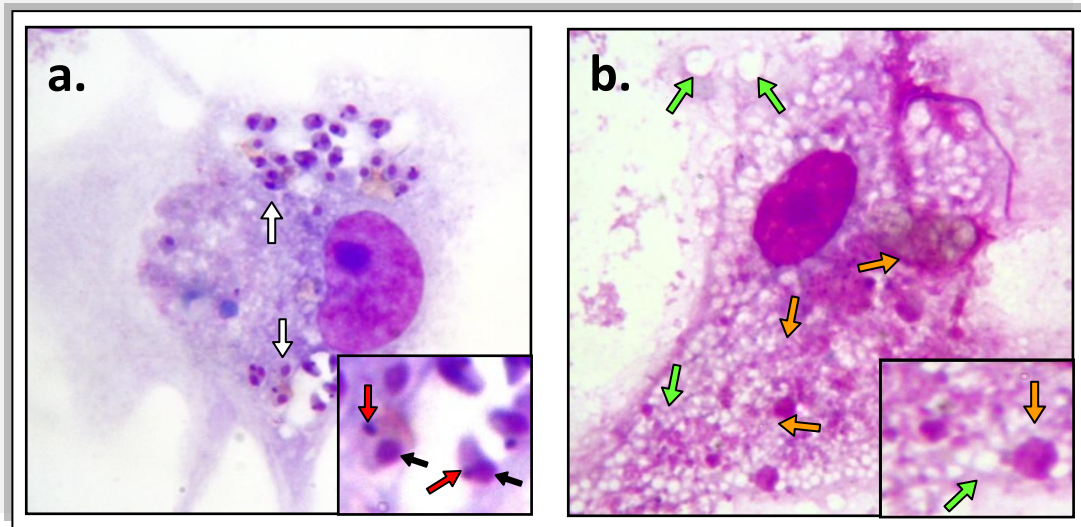
El IF (CC_{90} en la oscuridad/ CC_{90} después de irradiación) de la PcAlCl para los promastigotes fue >35 y para las células fue de >3 mostrando el requerimiento de la irradiación para la actividad del compuesto.

El IS (CC_{90} en células THP-1 después de irradiación / CC_{90} en parásitos después de irradiación) fue mayor a 37,71 indicando una actividad más selectiva del compuesto hacia los parásitos que hacia las células THP-1.

4.1.3 Los amastigotes intracelulares y su célula hospedera fueron fotosensibles a la PcAlCl. La PcAlCl a las máximas concentraciones evaluadas de 1,66 y $0,55 \mu\text{M}$ indujo alteraciones en la célula hospedera y destrucción de los amastigotes intracelulares de *L. panamensis*, 72 horas después de irradiación (Figura 10b).

Las alteraciones observadas en las células fueron: aumento en el número de vacuolas, acidofilia (cambios en la captación de la tinción de Giemsa), irregularidades en la membrana nuclear y en menor proporción disminución del tamaño de los núcleos (picnosis) (Figura 10b). Concentraciones de PcAlCl de $0,18 \mu\text{M}$ o menores no indujeron cambios ni en las células ni en los parásitos. Los porcentajes de inhibición de los parásitos a las diferentes concentraciones de PcAlCl utilizadas no pudieron ser calculados por lo anterior.

Figura 10. Efecto de la PcAlCl en células infectadas con *L. panamensis* después de irradiación.



Microfotografías de amastigotes intracelulares de *L. panamensis* (1000 X, coloración de Giemsa). **a.** Células infectas no tratadas, la flecha blanca muestra un amastigote, en la esquina inferior derecha se muestra amastigotes ampliados digitalmente; se indica el núcleo (flecha negra) y el kinetoplasto (flecha roja). **b.** Células infectas tratadas con 1,6 μM de PcAlCl, 72 horas después irradiar; se observan vacuolas (flechas verdes), cambio en la coloración del citoplasma (acidofilia), membrana nuclear irregular y restos de amastigotes donde ya no es distinguible el núcleo o el kinetoplasto (flechas naranjas).

4.1.4 La miltefosina y el peróxido de hidrógeno fueron activos contra parásitos y células THP-1. El tratamiento con miltefosina y peróxido de hidrógeno fue tóxico para promastigotes de *L. panamensis* observándose una CC90 de $5,37 \pm 0,14$ y $720,28 \pm 150,27$ μM respectivamente. Para las células THP-1 se obtuvo una CC90 de $48,82 \pm 5,84$ y $17942,39 \pm 956,38$ respectivamente (Tabla 3).

La miltefosina fue activa en amastigotes intracelulares con una CC90 de $3,81 \pm 0,21$ μM . La actividad del peróxido de hidrógeno contra esta forma parasitaria no fue evaluada.

Estos compuestos también fueron activos en oscuridad encontrándose un IF inferior a 1,27, sin embargo se encontraron diferencias estadísticamente significantes ($p < 0,05$) en el comportamiento de los promastigotes tratados miltefosina en oscuridad y luego del TFD. No se observaron diferencias en lo promastigotes tratados con peróxido en oscuridad o luz. (Tabla 1). Los IS encontrados para estos compuestos fueron mayores a 9 (Tabla 3).

4.1.5. Criterios para el análisis de expresión de los marcadores de apoptosis en promastigotes y amastigotes intracelulares. Dado que la PcAlCl mostró un efecto selectivamente fototóxico y que la miltefosina también mostró diferencias significativas ($p < 0,05$) en el comportamiento en oscuridad y luego del TFD, la evaluación de la expresión de los marcadores de apoptosis se realizó únicamente con los compuestos expuestos al TFD y no en oscuridad. Como controles se tomaron promastigotes no tratados y en oscuridad.

Tabla 3. Actividad de los compuestos en parásitos y células. Se muestra la actividad de la PcAlCl, miltefosina y peróxido de hidrógeno en promastigotes, macrófagos y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* irradiados (5 J/cm²) o no (0 J/cm²).

Compuesto		CC ₉₀ ^a $\mu\text{M} \pm \text{DE}^b$		IS ^c	IF ^d
		No irradiados (0 J/cm ²)	Irradiados (5 J/cm ²)		
PcAlCl	Promastigotes	>5	0,14 \pm 0,02	37,71	>35
	THP-1	>15	4,66 \pm 2,26		>3
	Amastigotes intracelulares	>5	>0,18	ND ^e	>27
Miltefosina	Promastigotes	6,87 \pm 0,64	5,37 \pm 0,14	9,09	1,27
	THP-1	21,4 \pm 0,97	48,82 \pm 5,84		0,43
	Amastigotes intracelulares	3,39 \pm 0,78	3,81 \pm 0,21	12,81	0,88
Peróxido de hidrógeno ^d	Promastigotes	748,38 \pm 23,83	720,28 \pm 150,27	18,13	1,03
	THP-1	13570,49 \pm 3945,30	17942,39 \pm 956,38		0,75
	Amastigotes intracelulares	NR ^f	NR		NR

^a Concentración citotóxica 90. ^b Desviación estándar. ^c Índice de Selectividad calculado dividiendo los valores de CC₉₀ para las células THP-1 sobre el valor de

la CC_{90} de promastigotes y/o amastigotes intracelulares. ^d Índice de Fototóxicidad calculado por la división de los valores de CC_{90} de los compuestos en oscuridad sobre la CC_{90} de los compuestos irradiados (5 J/cm^2). ^e No determinado al no poder realizar los cálculos con los datos obtenidos. ^f No realizado en este estudio. Los valores mostrados corresponden al promedio de datos obtenidos en dos experimentos independientes (n=6).

4.2 EFECTOS DEL TRATAMIENTO EN LA EXPRESIÓN DE MARCADORES DE APOPTOSIS

El efecto del TFD sobre los promastigotes se evaluó determinando la expresión de 5 marcadores de apoptosis: cambios morfológicos, expresión de fosfatidilserina (FSe) en la membrana externa del parásito, actividad de caspasa 3, pérdida del potencial de membrana mitocondrial y fragmentación del ADN. La evaluación se realizó en cuatro tiempos posteriores al TFD: inmediatamente después de la irradiación (0) y 6, 12 y 24 horas p.i.

El efecto en las formas intracelulares se determinó evaluando los cambios morfológicos y la fragmentación del ADN in situ por la técnica de TUNEL. Los tiempos escogidos para esta evaluación fueron 0, 24, 48 y 72 p.i.

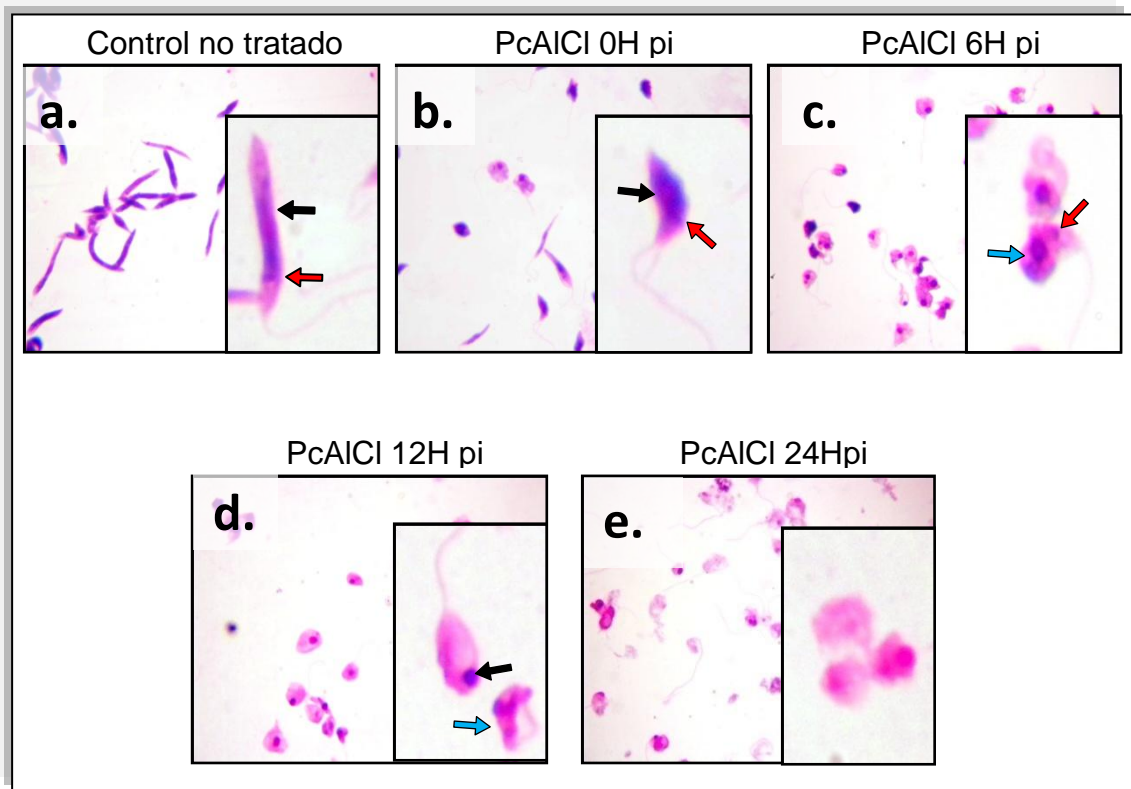
4.2.1 El tratamiento fotodinámico con los compuestos indujo cambios morfológicos en los parásitos. Inmediatamente después de la irradiación, los promastigotes disminuyeron su tamaño (figura 11b) comparados con los promastigotes control (figura 11a). Con el paso del tiempo, se observó fragmentación del núcleo, picnosis, y finalmente, 24 horas después de la irradiación los parásitos perdieron el núcleo, el kinetoplasto y el flagelo y también se observó acidofilia (Figura 11 b-c). No se observaron cambios en la morfología de los promastigotes utilizados como control en ninguno de los tiempos evaluados. Los amastigotes intracelulares tratados con $0,55 \mu\text{M}$ de PcAlCl aumentaron ligeramente su tamaño inmediatamente después de la irradiación, y se observó fragmentación del núcleo. Veinticuatro horas después se observaron los

amastigotes únicamente con su contorno sin el núcleo ni el kinetoplasto, esta condición se mantuvo hasta las 72 horas p.i. (Figura 12).

Con esta concentración de PcAlCl también se observaron cambios en las células THP-1 infectadas. Los cambios comenzaron a evidenciarse inmediatamente después de la irradiación con una gran vacuolización del citoplasma. Veinticuatro horas después de la irradiación la célula se encontraba totalmente destruida con desintegración del citoplasma, pérdida del núcleo en la mayor cantidad de las células acompañado de acidofilia. El número de células THP-1 en los pozos comenzó a disminuir 24 horas después de la irradiación y hacia las 72 horas el número disminuyó en aproximadamente un 95%. Concentraciones de PcAlCl inferiores o iguales a 0,18 μM no afectaron los amastigotes intracelulares ni a las células hospederas.

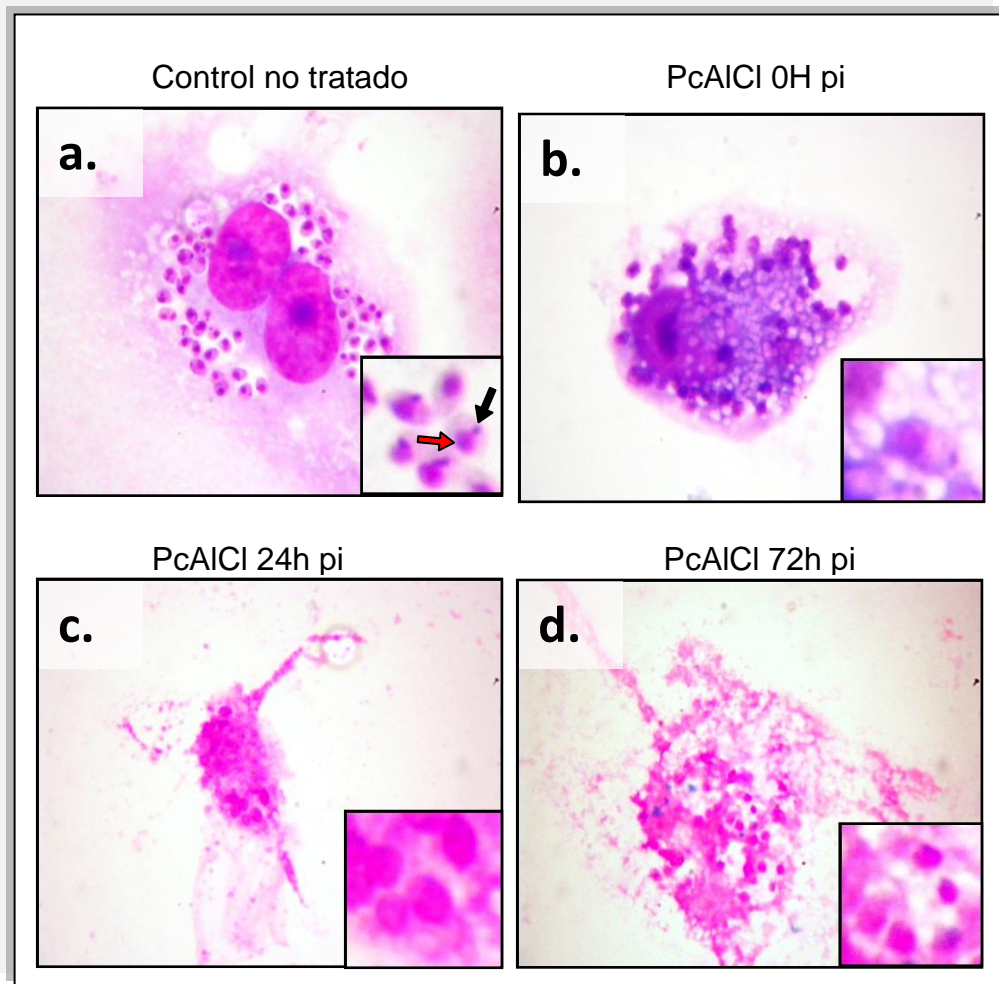
El tratamiento con miltefosina y el peróxido de hidrógeno indujeron cambios en los promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* luego del TFD. Se observó una reducción del tamaño de los promastigotes pero a diferencia de la PcAlCl, el cambio se hizo evidente sólo hasta las 12 horas. Se observó fragmentación del núcleo y pérdida del kinetoplasto hacia las 24 horas post irradiación en los dos compuestos. Los amastigotes intracelulares tratados con miltefosina mostraron fragmentación del ADN y cambios en la morfología 24 horas después de la adición de este compuesto y a las 72 horas no se observaron amastigotes intracelulares en las células hospederas. Por otra parte, y a diferencia de lo observado con PcAlCl, el tratamiento con miltefosina en las concentraciones evaluadas, no indujo cambios en las células hospederas (dato no mostrado).

Figura 11. Cambios morfológicos de promastigotes después del tratamiento fotodinámico con PcAlCl.



Microfotografías de promastigotes de *L. panamensis* (1000 aumentos, coloración de Giemsa). **a.** Promastigotes no tratado control, se indica la posición del núcleo (flecha negra) y el kinetoplasto (flecha roja). De **b** hasta **e**, promastigotes tratados con PcAlCl e irradiados, observados inmediatamente después de la irradiación (**b**), 6 (**c**), 12 (**d**) y 24 horas (**e**) después. La flecha azul indica núcleos fragmentados.

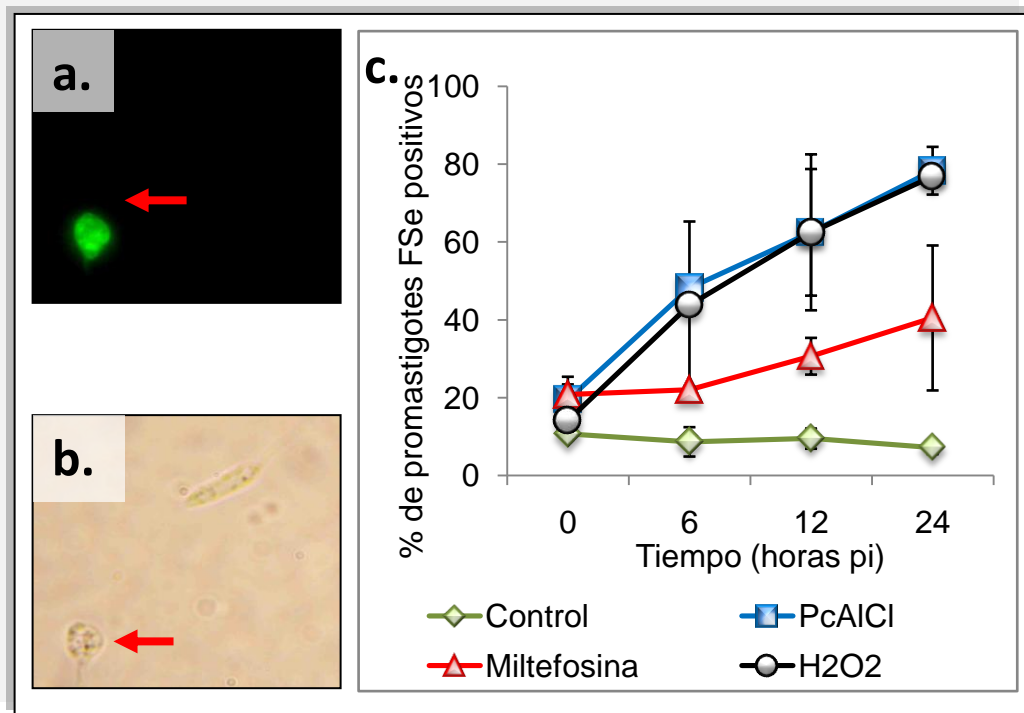
Figura 12. Cambios morfológicos de amastigotes intracelulares después del tratamiento fotodinámico con PcAICI.



Microfotografías de amastigotes intracelulares de *L. panamensis* (1000 aumentos, coloración Giemsa). **a.** Amastigotes control, se indica la posición del núcleo (flecha negra) y el kinetoplasto (flecha roja). De **b** hasta **d**, amastigotes intracelulares tratados con PcAICI e irradiados, observados inmediatamente (**b**), 24 (**c**) y 72 horas (**d**) después de la irradiación.

4.2.2 El tratamiento fotodinámico con los compuestos indujo la expresión de fosfatidilserina (FSe) en promastigotes. Inmediatamente después de la irradiación se observó expresión de FSe en los promastigotes de *L. panamensis* tratados con PcAlCl. Los parásitos que expresaban FSe se observaron de color verde utilizando el microscopio de fluorescencia (Figura 13b). La expresión de este marcador fue dependiente del tiempo p.i. observándose 19, 48, 62 y 78% de parásitos positivos a las 0, 6 12 y 24 horas p.i. respectivamente (Figura 13C). La PSe se expresó significativamente más en los promastigotes tratados con PcAlCl y peróxido de hidrógeno en comparación con los promastigotes no tratados ($p < 0,05$). El comportamiento de la miltefosina en los promastigotes no fue significativamente diferente de los promastigotes no tratados ($p > 0,05$). Sólo el 10% de los promastigotes no tratados expresaron FSe.

Figura 13. Efecto del tratamiento fotodinámico con PcAlCl en la expresión de FSe en promastigotes de *L. panamensis*.

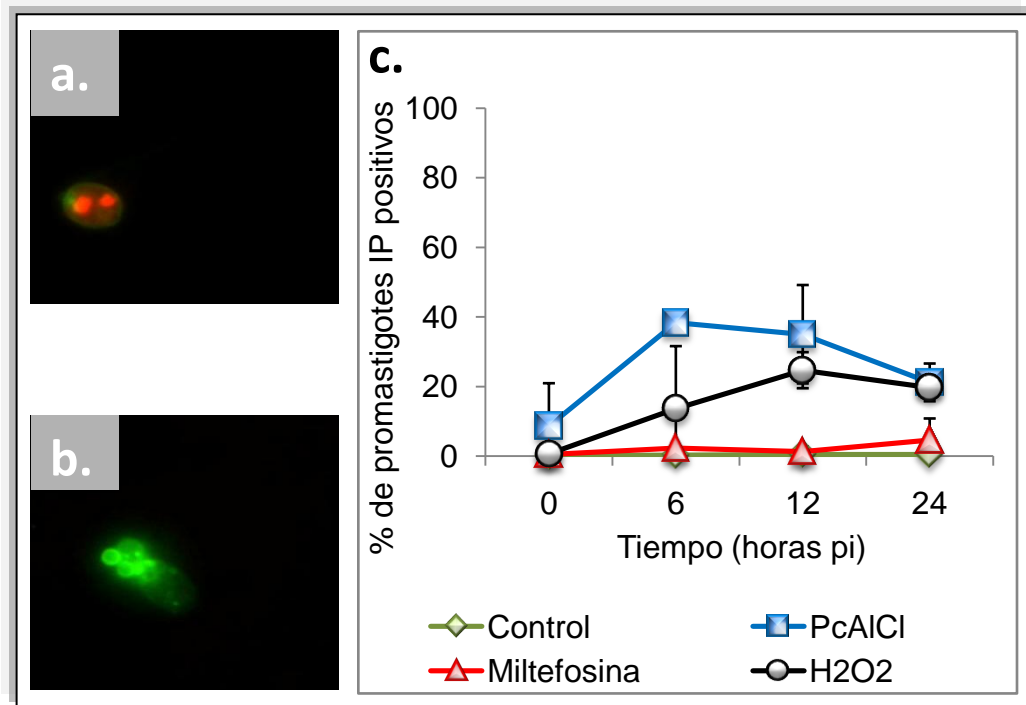


Microfotografías de promastigotes de *L. panamensis* (1000 X) marcados con anexina-V para determinar la expresión de FSe. **a.** Se observa un promastigote FSe positivo de color verde, **b.** El mismo campo tomado con luz transmitida, se observa un promastigote que no tomó la anexina-V (flecha roja). **c.** Cambios en el porcentaje de expresión de FSe en promastigotes tratados con PcAlCl, miltefosina o peróxido de hidrógeno, tiempo después de la irradiación. La gráfica muestra el promedio ± la desviación estándar de dos experimentos independientes.

4.2.3 El tratamiento fotodinámico con los compuestos indujo alteraciones en la membrana plasmática de promastigotes. Se observó alteración de la membrana plasmática evidenciada por la internalización de yoduro de propidio (IP) (Figura 14a). El daño en la membrana plasmática fue más pronunciado en la PcAlCl y peróxido de hidrógeno con respecto a los promastigotes control ($p < 0,05$). No se encontraron diferencias significativas entre el daño en la membrana plasmática inducido por la miltefosina y el encontrado en los promastigotes no

tratados ($p > 0,05$). Adicionalmente, el marcaje con anexina permitió observar globulaciones en la membrana plasmática (figura 14b) presente sólo en los promastigotes tratados con miltefosina (sección 4.2.1).

Figura 14. Efecto del tratamiento fotodinámico con PcAlCl en la alteración de la integridad de la membrana plasmática en promastigotes de *L. panamensis*.

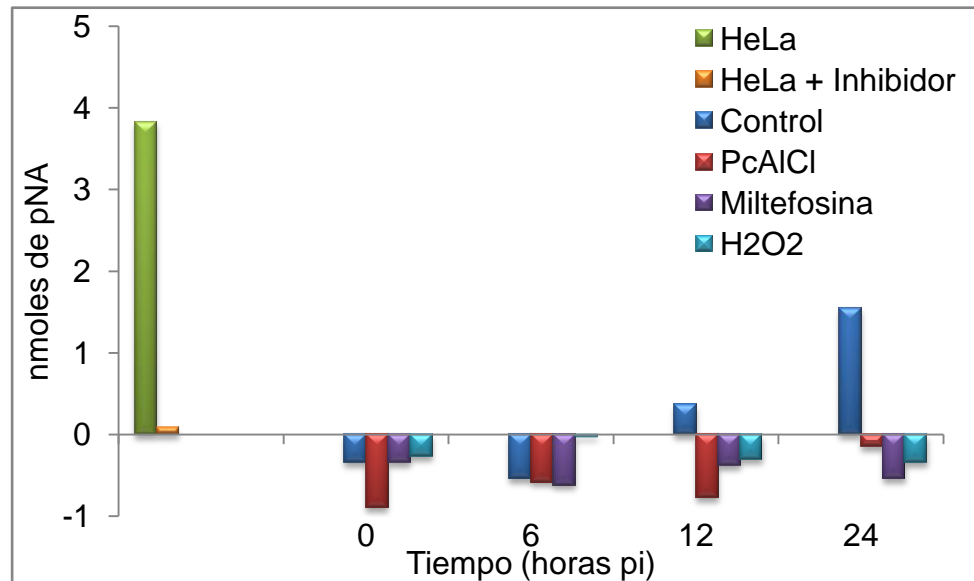


Microfotografías de promastigotes de *L. panamensis* (1000 X) marcados con IP o PSe para observar el daño en la integridad de la membrana plasmática. **a.** Promastigote en donde el IP se observa unido al ADN del núcleo y el kinetoplasto (color rojo). **b.** Promastigote con alteración de la membrana observada con PSe. **c.** Porcentaje de promastigotes IP positivos tratados con PcAlCl, miltefosina o peróxido de hidrógeno, tiempo después de la irradiación. La gráfica muestra el promedio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes.

4.2.4 El tratamiento fotodinámico con los compuestos no indujo la actividad de caspasa 3 en promastigotes. Cuando los promastigotes fueron tratados con PcAlCl, miltefosina o peróxido de hidrógeno, no se observó actividad de caspasa 3 en los promastigotes después del TFD. Como control interno de la técnica se utilizaron las células HeLa las cuales mostraron actividad de caspasa 3 luego del

tratamiento con 100 μM de etopósido por 48 horas (Figura 15, barra verde). La actividad de caspasa 3 fue inhibida en células HeLa al adicionar el inhibidor específico (DEVD-fmk) indicando la especificidad de la reacción (Figura 15 barra naranja).

Figura 15. Actividad de caspasa 3 en promastigotes de *L. panamensis* y células HeLa



Producción pNA a partir del clivaje de DEVD-pNA. Como control se utilizaron células HeLa tratadas con 100 μM de etopósido por 48 horas en ausencia o no del inhibidor específico de caspasa 3 DEVD-fmk (barra verde y naranja respectivamente). Se estudio la producción de pNA en promastigotes no tratados (barra azul), o tratados con la respectiva CC_{90} de PcAlCl (barra roja), miltefosina (barra violeta) y peróxido de hidrógeno (barra celeste) tiempo después de la irradiación.

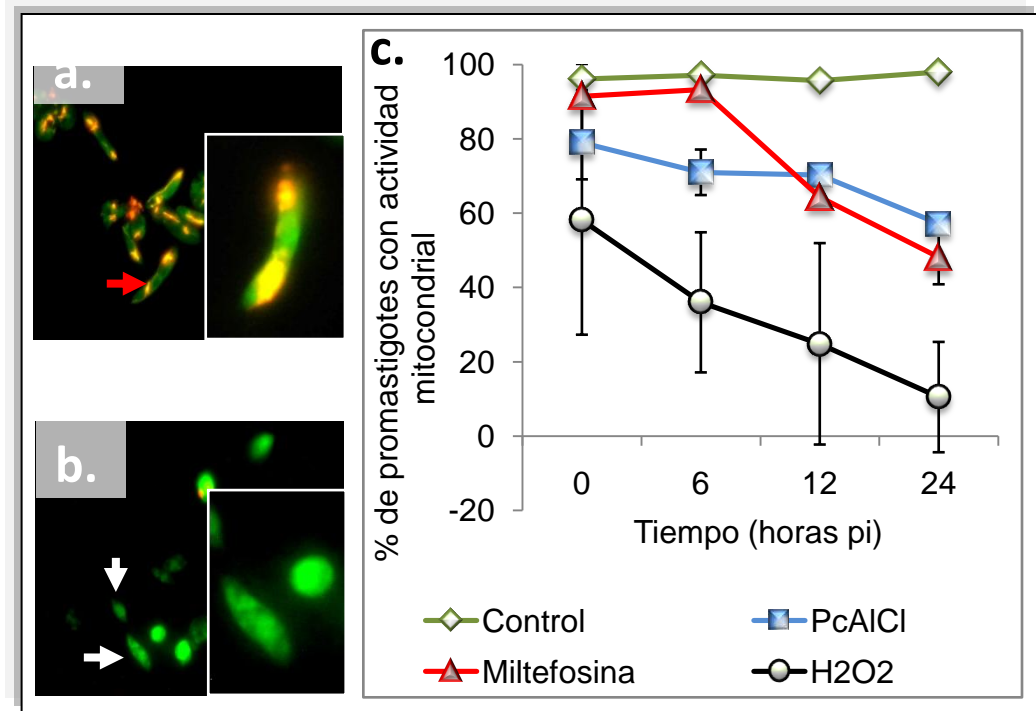
4.2.5 El tratamiento fotodinámico con los compuestos inducen cambios en el potencial de la membrana mitocondrial de promastigotes. El tratamiento con PcAlCl, miltefosina y peróxido produjo la pérdida del potencial de membrana mitocondrial de los promastigotes después de irradiar, esto se observó como fluorescencia verde al interior del citoplasma (Figura 16b, flechas blancas). El comportamiento en el tiempo de los promastigotes tratados fue significativamente diferente ($p < 0,05$) con respecto al comportamiento de los parásitos control no tratados (Figura 16c).

No se observaron diferencias significativas entre el comportamiento de los promastigotes tratados con PcAlCl, miltefosina o peróxido. Los promastigotes no tratados no presentaron cambios en el potencial de membrana mitocondrial en los diferentes tiempos evaluados.

La presencia de potencial de membrana en los promastigotes fue observado como fluorescencia roja/amarilla en el citoplasma de los promastigotes (Figura 16b). Al menos el 95% de los promastigotes control no tratados presento potencial de membrana mitocondrial en todos los tiempos evaluados.

El comportamiento de los promastigotes tratados con miltefosina no fue significativamente diferente del control hasta 6 horas post irradiación, después de este tiempo el potencial disminuyó hasta un 48%.

Figura 16. Cambios en el potencial de membrana mitocondrial en promastigotes.



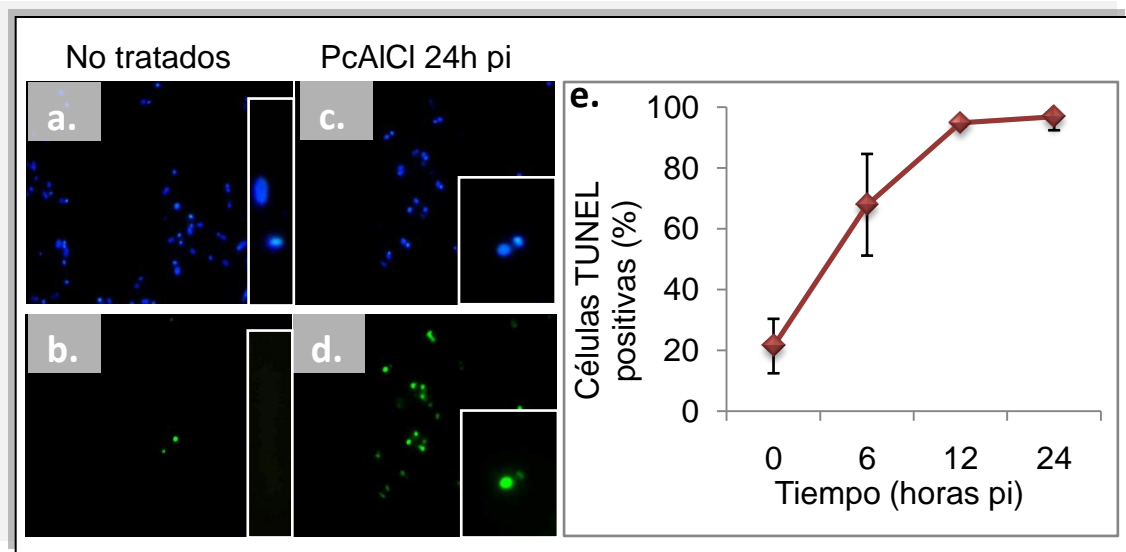
La sonda JC-1 se utilizó para evaluar la presencia (fluorescencia amarilla) o ausencia de potencial de membrana mitocondrial en promastigotes (**a** y **b** respectivamente). La evaluación se llevó en cuatro tiempos pi en promastigotes no tratados (línea verde) o tratados con la CC₉₀ de PcAlCl (línea azul), miltefosina (línea roja) y peróxido de hidrógeno (línea negra). La gráfica muestra el promedio \pm la desviación estándar de dos experimentos independientes.

4.2.6 El tratamiento fotodinámico con los compuestos induce fragmentación progresiva del ADN en los parásitos. La fragmentación del ADN en los promastigotes se evidenció por la presencia de fluorescencia verde en el núcleo y/o el kinetoplasto (Figura 17b, d). Simultáneamente se observó el ADN con fluorescencia azul para confirmar la presencia de ADN en muestras observadas como negativas.

Inmediatamente después de la irradiación el 24,3% \pm 8,9% de los promastigotes tratados con PcAlCl presentaban fragmentación del ADN nuclear. La fragmentación aumentó hasta observarse en el 67,8% \pm 16,7, 94,8 \pm 1,2% y 96,8 \pm

4,4% luego de 6, 12 y 24 horas p.i. respectivamente (Figura 17e). Luego de 6 horas la fragmentación dejó de ser exclusivamente nuclear para observarse también en el ADN del kinetoplasto. La fragmentación en los promastigotes no tratados fue sólo del 6% a las 24 horas post irradiación. En este estudio no se determinó la fragmentación de ADN inducida por miltefosina o peróxido de hidrógeno.

Figura 17. Fragmentación de ADN en promastigotes de *L. panamensis*.

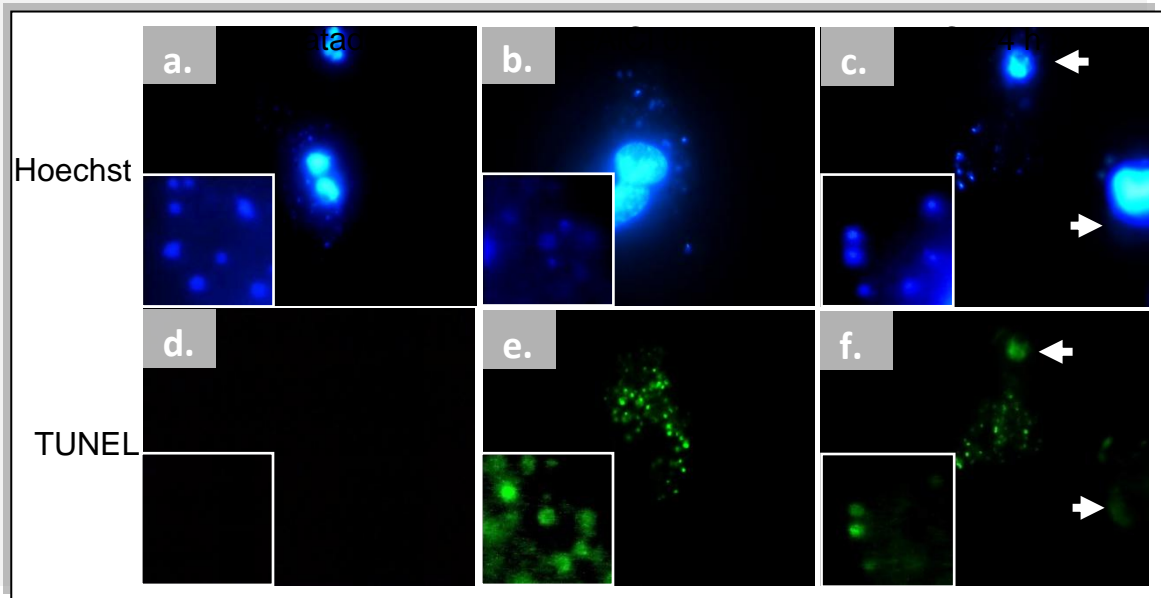


El ADN de los parásitos fue visualizado con la sonda fluorescente azul Hoechst 33342 (a y c) y los extremos libres del ADN (fragmentación) se observaron de color verde indicando los promastigotes positivos para la técnica de TUNEL (b y d). El porcentaje de promastigotes TUNEL positivos fue cuantificado en cada tiempo (e). Las fotografías mostradas son representativas de al menos 20 campos observados. El gráfico de barras muestra el promedio \pm la DS de dos experimentos independientes.

La fragmentación del ADN en los amastigotes intracelulares se evidenció inmediatamente después de la irradiación; en este tiempo no se observó fragmentación del ADN de la célula hospedera. (Figura 18b y e). Después de 24 horas, la fragmentación de ADN fue evidente también en la célula hospedera (figura 18c y f, flechas blancas).

En este estudio no se determinó la fragmentación de ADN inducida por miltefosina o peróxido de hidrógeno en los parásitos.

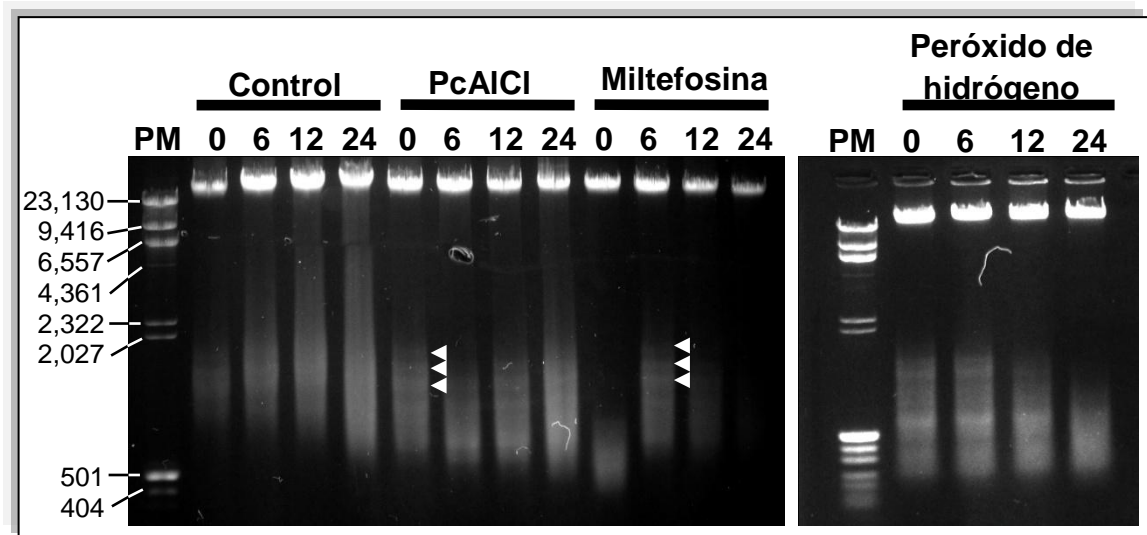
Figura 18. Fragmentación de ADN de amastigotes intracelulares de *L. panamensis*.



El ADN de los amastigotes intracelulares de *L. panamensis* fue visualizado con la sonda fluorescente azul Hoechst 33342 (a, b, c) y los extremos libres del ADN (fragmentación) se observaron de color verde (d, e y f). Células THP-1 infectadas no tratadas fueron utilizados como control (A y D). En la esquina inferior izquierda se muestra la ampliación digital de los amastigotes. Las fotografías mostradas son representativas de al menos 20 campos observados.

4.2.7 La fragmentación del ADN de los promastigotes presenta un patrón nucleosomal. La electroforesis del ADN de promastigotes tratados con PcAlCl, miltefosina o peróxido permitió la observación de un patrón oligonucleosomal desde el tiempo 0 hasta 24 horas post irradiación. Las bandas se observaron en la región comprendida entre las bandas con pesos moleculares de 2,027 y 501 pb (Figura 19 puntas de flecha). El comportamiento de los promastigotes tratados con peróxido de hidrógeno fue similar al observado con la PcAlCl. La miltefosina también mostro patrón de fragmentación oligonucleosomal pero sólo después de 6 horas post irradiación. La fragmentación del ADN también se observó en los promastigotes control.

Figura 19. Electroforesis de ADN de promastigotes de *L. panamensis* tratados con PcAlCl, miltefosina o peróxido de hidrógeno.



El ADN de los promastigotes tratados o no con PcAlCl, miltefosina o peróxido de hidrógeno fue extraído y puesto en gel de agarosa 1,2 % para su separación. PM= patrón de peso molecular para el cual se utilizaron dos marcadores de peso de ADN, Lambda/Hind III + pUC19/MspI. Las puntas de flecha indican la presencia de fragmentación oligonucleosomal. Las fotos son representativas de al menos 3 experimentos independientes.

5. DISCUSION

En este trabajo se demostró que el TFD con PcAICI en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* expresan muchos de los marcadores asociados con apoptosis en metazoos. El tratamiento fotodinámico utilizando diferentes tipos de FS ha demostrado ser efectivo *in vivo* e *in vitro* en la eliminación de los parásitos de *Leishmania* (Akilov et al., 2007; Dutta et al., 2005; Escobar et al., 2006; Ghaffarifar et al., 2006; Kosaka et al., 2007). No se conocen bien cuáles son los mecanismos de muerte involucrados en este proceso aunque se sabe que en el modelo de cáncer el TFD puede inducir apoptosis en células tumorales (Almeida et al., 2004; Moor, 2000). Es necesario determinar cuáles son los mecanismos de muerte inducidos ya sea por los medicamentos actualmente utilizados o por las nuevas terapias. Estos estudios conllevan a la identificación de eventos moleculares que dirigen este proceso aportando no solo al conocimiento sobre la biología del parásito sino estableciendo nuevos blancos terapéuticos en *Leishmania* (Mehta and Shaha, 2004; Roy et al., 2008) y/o en otras patologías (Kumar et al.). Además podrían orientar al estudio de los fenómenos de resistencia (Paris et al., 2004). Se conoce que la *Leishmania* expresa algunos marcadores de apoptosis en presencia de diferentes estímulos como fármacos, agentes físicos como temperatura, moléculas inductoras de apoptosis en células de mamífero o el mismo proceso de diferenciación que sufre el parásito a través del ciclo de vida (Bruchhaus et al., 2007; Duszenko et al., 2006). Este estudio mostró que la PcAICI al ser internalizada por los parásitos y las células era capaz de inducir la muerte después del TFD e inducir la expresión de marcadores involucrados posiblemente en apoptosis en los parásitos.

Inicialmente en este trabajo se demostraron características importantes de la relación PcAICI: parásito como la internalización, localización subcelular y su actividad antiparasitaria después del TFD. Al igual que lo encontrado con varios FS en diferentes líneas celulares de mamífero, la PcAICI fue internalizada por los

parásitos y las células THP-1 mostrando una distribución básicamente citoplasmática. La internalización del compuesto era de esperarse por el carácter hidrofóbico que posee lo que permite su difusión pasiva a través de las membranas celulares (Chan et al., 1986; Morris et al., 2003; Nunes et al., 2004). Sin embargo otros mecanismos de entrada como endocitosis, internalización a través de canales o por receptores no pueden ser descartados (Bonneau et al., 2004; Chan et al., 1997; Dubuc et al., 2008). La distribución citoplasmática de la PcAlCl se ha sido demostrada claramente por ejemplo en células aisladas de meningiomas humanos donde la PcAlCl es internalizada y localizada en el citoplasma (Malham et al., 1996).

En las formas libres de *Leishmania* se ha observado que ciertos FS como los análogos de benzofenoxazinas y las carbaporfirinas pueden ser internalizados y acumulados por promastigotes de *L. major* y *L. tarentolae* respectivamente (Akilov et al., 2006; Morgenthaler et al., 2008). El patrón de distribución observado en *L. tarentolae* con las carbaporfirinas fue similar al un patrón de distribución granular encontrado con PcAlCl-*L. panamensis* en este trabajo.

La localización mitocondrial de la PcAlCl en células infectadas con *L. panamensis* fue un hallazgo importante ya que la mayoría de estudios de este tipo han sido realizados principalmente en sistemas celulares libres de microorganismos. Aunque los FS al ser internalizados pueden acumularse en diferentes organelas celulares como la mitocondria, aparato de Golgi, retículo endoplasmático, núcleo o permanecer en el citoplasma. (Teiten et al., 2003) algunos como la ftalocianina de zinc (PcZn) y la protoporfirina IX (PpIX) han mostrado preferiblemente una localización mitocondrial (Alexandratou et al., 2005; Chen et al., 2008; Fabris et al., 2001). En contraste, algunos FS de carácter hidrofílico como la PcZn modificada con grupos de ftalonitrilo o sulfato han mostrado ubicarse preferentemente en los lisosomas de células como Hep2 y meningioma (Li et al., 2008; Malham et al., 1996). Sin embargo en este trabajo no se puede descartar la localización en otra

organela ya que sólo se utilizó una sonda específica de mitocondrias (Teiten et al., 2003).

La localización mitocondrial de la PcAlCl, acorde con lo descrito por ejemplo para la PcZn y la Pc4 (Fabris et al., 2001; Usuda et al., 2003) podría favorecer la acción del FS sobre la célula hospedera y no sobre el parásito en este caso la *Leishmania* que habita en un fagolisosoma. Igualmente podría determinar las moléculas o estructuras que son afectadas inicialmente, dado el corto periodo de vida de las especies reactivas de oxígeno (ERO) que se generan después de la irradiación. Se ha encontrado que los FS que se ubican en las mitocondrias de células de mamífero desencadenan procesos de tipo apoptótico, ya que la producción de ERO luego de la irradiación, conlleva a la desestabilización de la membrana mitocondrial y salida del citocromo *c*, suceso que en células de mamífero redundaría en la activación de la vía intrínseca de la apoptosis (Kessel and Luo, 1998; Kim et al., 1999). En caso que la PcAlCl mostrara una localización mitocondrial en la *Leishmania* como en las células THP-1, la producción de ERO podría orientar a la activación de un proceso de muerte por apoptosis como se ha visto en promastigotes de *L. donovani* tratados con rotenona quien inducen la producción de ERO al interior de la mitocondria (Mehta and Shaha, 2004).

La PcAlCl mostró actividad sobre los parásitos y células sólo después de ser sometida al TFD. Este resultado fue importante ya que confirmaba que la actividad del compuesto era dependiente de la luz presentando en consecuencia índices fototóxicos elevados. Inicialmente se determinó que la λ de la luz utilizada (400-700 nm) y la fluencia de 5 julios/cm² eran inocuas para las células. Esto es una gran ventaja en este tipo de tratamiento donde se utilizan fuentes de luz con lámparas fluorescentes para uso doméstico (Silvania “cool white”) la cual no utiliza radiación ionizante. Es sabido que la radiación ionizante tiene efecto directo sobre el ADN induciendo la muerte de células de mamífero por arresto en el ciclo celular (Mothersill and Seymour, 1998; Shackelford et al., 1999).

Los FS son compuestos que se activan con luz a una λ específica. Sin la luz (TFD) la molécula no es excitada y no se desencadena la producción de ERO. Por eso en todos los casos se encontraron IF mayores de 3. Cuando se utilizaron los compuestos de referencia se encontraron IF en el orden de 0,43 hasta 1,27, lo cual significa que los compuestos tienen una actividad similar con luz y sin luz. Por ejemplo con la miltefosina, que fue el medicamento control del estudio, el cual es activo contra esta y otras especies de *Leishmania* (Croft et al., 1996; Santa-Rita et al., 2004; Seifert et al.), se observaron IF bajos. Aunque hay una ligera dependencia de la luz en la actividad con los promastigotes, en las células THP-1 se observaron IF menores que cero. El tratamiento con el peróxido de hidrógeno en parásitos y células también presentó IF bajos siendo los promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* susceptibles al tratamiento tanto con luz como sin luz. La actividad del peróxido de hidrógeno contra *Leishmania* ha sido menos estudiada, sin embargo se ha encontrado que concentraciones del compuesto (10 veces más que las utilizadas en este trabajo) inducen la muerte de promastigotes de *L. donovani* una hora después de ser adicionado (Das et al., 2001). La utilización de estas dos moléculas (miltefosina y el peróxido de hidrógeno) en este estudio fue importante dado que por un lado se conocía su actividad anti-*Leishmania* y por otro se había demostrado que inducían la expresión de diferentes marcadores de apoptosis en promastigotes de *L. donovani* (Das et al., 2001; Paris et al., 2004).

La actividad de la PcAICI después del TFD fue diferente en las células estudiadas siendo en promastigotes > amastigotes intracelulares > células THP-1. La actividad del TFD con PcAICI en promastigotes han sido evaluado en otras especies de parásitos siendo más activas en *L. chagasi* que en *L. panamensis* cuando se utiliza el mismo esquema de irradiación (Escobar et al., 2006). Igualmente ha sido evaluada en células de mamífero siendo más activas en células tumorales que en células de cultivos primarios (Daziano et al., 1998). En

células derivadas de meningioma la actividad se encontró entre elevada (Malham et al., 1996). Sin embargo estos resultados dependen tanto de la fuente de luz, la fluencia, los tiempos de tratamiento, el tipo de células entre otros (de Castro Pazos et al., 2003).

La mayor actividad de la TDF en promastigotes podría estar relacionada con una mayor acumulación del FS en las células o por incapacidad de los parásitos para defenderse de las ERO producidas tras el TFD. Se sabe que la *Leishmania* posee mecanismos enzimáticos de detoxificación como peroxidasa, (Dolai et al., 2008) y las peroxidoxinas (Barr and Gedamu, 2003). Estos mecanismos la protegen de peróxido de hidrógeno, hidro peróxido, radicales hidroxilo y especies reactivas de nitrógeno como el óxido nítrico. Sin embargo, algunos parásitos de *Leishmania* carecen de algunas enzimas que intervienen en la eliminación de las ERO como se ha visto en *L. donovani* quien carecen de actividad de catalasa y glutatión peroxidasa (Abok et al., 1988; Murray and Cartelli, 1983). Igualmente posible que los mecanismos de detoxificación del parásito sean insuficientes para inactivar la gran cantidad de ROS que posiblemente induzcan por el TFD. Igualmente, aunque poco es conocido, ella sean incapaces de eliminar algunas ROS como el oxígeno singulete, el cual es producido cuando da lugar las reacciones de tipo II tras la activación de la PcAlCl.

La actividad de TFD en las células THP-1 era de esperarse dado que ellas son células tumorales diferenciadas. La TFD con PcAlCl y con otros FS ha sido demostrada en otras células tumorales fagocíticas como J774, U937 (Mroz et al., 2007; Xue et al., 2005). Esta característica posiblemente intervino en la actividad del compuesto mostrando una baja selectividad (IS=12,81). Esto podría sugerir que la muerte del amastigote se presenta como un efecto de la muerte de la célula hospedera, como lo ha descrito Akilov y colaboradores donde macrófagos tumorales J774.2 infectados con *L. major* y tratadas con ácido- δ -aminolevulínico (ALA) fueron destruidos (Akilov et al., 2007). En la búsqueda de un compuesto

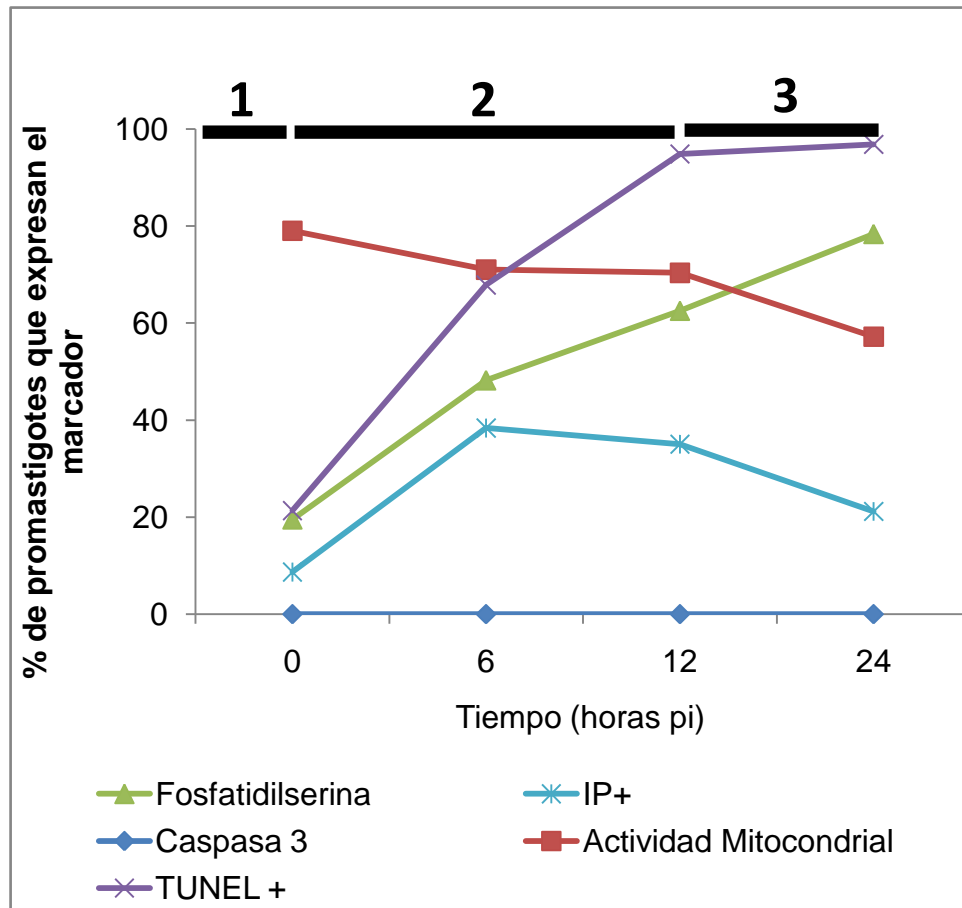
activo contra *Leishmania* uno de los criterios importantes es el IS. Se espera encontrar IS alto con los compuestos lo cuales equivaldrían al índice terapéutico que deben mostrar los fármacos utilizados en los pacientes. Estudios orientados hacia la búsqueda de selectividad de los compuestos han conjugado FS con biomoléculas para dirigir la ruta de internalización y la célula blanco (Taquet et al., 2007). Igualmente sería recomendable evaluar este tipo de compuestos utilizando células hospedera no tumorales como macrófagos de sangre periférica o macrófagos peritoneales de ratón (Daziano et al., 1998).

Por otro lado la mayor actividad del TFD con PcAICI en células THP-1 infectadas que en las no infectadas sugiere que los amastigotes de *Leishmania* podrían estar afectando de alguna manera propiedades intrínsecas de las células. Se conoce que estos pueden alterar procesos bioquímicos en su células hospedera como la vía de señalización dependiente de NF- κ B de la célula como se ha visto en la infección de macrófagos derivados de médula ósea de ratón infectados con *L. major*, *L. mexicana* y *L. braziliensis* (Calegari-Silva et al., 2009; Donovan et al., 2009; Gregory et al., 2008; Kamir et al., 2008).

A continuación se discutirán los resultados encontrados en el comportamiento de los marcadores de muerte que sucedieron inmediatamente después del TFD con PcAICI expresados estos (exceptuando los morfológicos) en una sola grafica (Ver Figura 20) y mostrando el comportamiento de los marcadores en las fases de apoptosis descritas según Saraste y Pulkki en el 2000. En la Fase 1 o de Iniciación: (32 minutos, irradiación), la PcAICI es internalizada por los parásitos, se distribuye en el citoplasma y posteriormente la PcAICI se activa con luz visible para generar ERO. En la Fase 2 o de ejecución: (tiempo 0 hasta 12 horas pi), las ERO producidas inducen la pérdida del potencial de membrana mitocondrial, cambios morfológicos y activación de rutas bioquímicas que permiten externalizar la FSe y la fragmentación del ADN. En la Fase 3 o de degradación: (12 horas hasta 24 horas pi) que inicia en el tiempo en que al menos el 70% de los

promastigotes presenta pérdida de la actividad mitocondrial, expresión de FSe y fragmentación de ADN.

Figura 20. Comportamiento en el tiempo de la expresión de los diferentes marcadores de apoptosis en promastigotes de *L. panamensis* luego del TFD con PcAlCl.



1. Fase de iniciación, 2. Fase de ejecución, 3. Fase de degradación.

En este estudio los parásitos después del TFD mostraron cambios morfológicos similares a los descritos anteriormente en células de mamífero apoptóticas como reducción del tamaño celular, condensación del citoplasma, presencia de globulaciones en la membrana, y condensación de la cromatina nuclear (Saraste and Pulkki, 2000). Otros cambios morfológicos descritos en *Leishmania*

relacionados con autofagia o necrosis no fueron encontrados (Dutta et al., 2007; Dutta et al., 2005). Los cambios morfológicos encontrados podrían sugerir la implicación de un mecanismo apoptótico, los cuales también han sido inducidos por otros compuestos como la estaurosporina, novobiocina, y miltefosina (Arnoult et al., 2002; Singh et al., 2005; Verma et al., 2007). Los cambios inducidos con miltefosina y peróxido de hidrógeno encontrados fueron concordantes con los hallazgos reportados para promastigotes de *L. donovani* donde se sugiere que los promastigotes adoptan formas esféricas, condensación citoplasmática y fragmentación del núcleo (Das et al., 2001; Paris et al., 2004). Aunque los estudios realizados en apoptosis de formas intracelulares de parásitos o microorganismos en general son más escasos, la fragmentación del ADN en amastigotes intracelulares ha sido demostrada con ayuda de técnicas de marcaje *in situ* como la técnica de TUNEL. (Lindoso et al., 2004; Sereno et al., 2001; Zangger et al., 2002). En este trabajo se encontró fragmentación del núcleo de los amastigotes resultado corroborado con la prueba de TUNEL. Además se observaron cambios en la estructura típica redondeada del amastigotes similares a los reportados por Dutta para el tratamiento de amastigotes axénicos de *L. amazonensis* con PcAlCl (Dutta et al., 2005).

Otras alteraciones presentes en el proceso de apoptosis son la expresión de Fse en la cara externa de la membrana y cambios en la actividad mitocondrial. En este trabajo se observó que la FSe se expresa después de la inducción de la muerte con PcAlCl rápidamente pero en menor proporción que la fragmentación del ADN. Otros inductores de apoptosis en células de mamífero muerte como inhibidores de la cadena respiratoria (Mehta and Shaha, 2004), camptotecina (Sen et al., 2004) o dihidropirimidona (Singh et al., 2009) también inducen la expresión de Fse. Adicionalmente el marcaje con anexina V permitió observar las globulaciones en la membrana plasmática, característico del proceso de apoptosis en células de mamífero (Hacker, 2000; Saraste and Pulkki, 2000) que no fueron evidentes con la coloración de Giemsa.

La actividad mitocondrial de los promastigotes disminuyó luego del TFD como se ha reportado también para células de mamífero expuestas al TFD con diferentes FS (Almeida et al., 2004). El daño mitocondrial es también uno de los estímulos desencadenantes del proceso apoptótico como se ha mostrado en promastigotes de *L. donovani* expuestos a la novobiocina la cual desestabiliza la mitocondria permitiendo la salida del citocromo C y la posterior activación de caspasas efectoras (Singh and Dey, 2007; Singh et al., 2005). Aunque se observó daño mitocondrial expresado como pérdida del potencial de membrana mitocondrial, no observamos actividad de caspasa 3 en los promastigotes lo que sugiere que otras proteínas deben estar participando en la fase ejecutora del proceso de muerte en los promastigotes de *L. panamensis*. Proteínas como las metacaspasas que tienen sitios de acción diferentes a las caspasas han sido encontrados como responsables de la muerte celular programada en *L. donovani* (Lee et al., 2007).

El porcentaje de promastigotes que expresaron los marcadores de apoptosis, a excepción de la actividad de caspasa 3, fue incrementando con el paso del tiempo (Figura 20). Esto podría indicar que el comportamiento de la población es heterogénea dado que no todos los promastigotes expresan los marcadores al mismo tiempo y existen algunos que no llegan a expresarlos. Una posibilidad es la existencia de una señalización por parte de los promastigotes afectados inicialmente, que potencie la muerte de otros promastigotes dentro de la misma población. Esta idea ha sido planteada como una forma de control de la población parasitaria en *Trypanosoma brucei*, quien produce la prostaglandina D₂ (PGD₂) que a su vez puede inducir la muerte de formas procíclicas de este parásito (Duszenko et al., 2006). El control de la población parasitaria también se ha observado en amastigotes intracelulares de *L. chagasi* en donde se observó muerte por apoptosis (evidenciada por fragmentación del ADN) de los amastigotes presentes en el bazo de hámsters 90 días después de la infección (Lindoso et al., 2004).

6. CONCLUSIONES

El presente trabajo de investigación hace aportes al conocimiento de la biología de la *L. panamensis* y del los mecanismos de acción del TFD, al desarrollo de nuevos blancos terapéuticos, a la implementación de metodologías, a la formación científica y a la implementación de líneas de investigación

Aporte al conocimiento de la biología de la *L. panamensis* y de los mecanismos de acción del TFD:

Este estudio muestra la expresión selectiva de algunos marcadores de apoptosis en promastigotes y amastigotes intracelulares *L. panamensis* luego del TFD con PcAICI dato del que no se tenían registros previos. Adicionalmente se presenta al TFD como un inductor de muerte celular en promastigotes y amastigotes intracelulares hecho que permitiría utilizar esta estrategia para profundizar en el estudio de las vías bioquímicas implicadas en muerte celular programada. Dada la plasticidad que tiene el TFD reflejada en una gran variedad de FS, con diferentes blancos subcelulares, y de diferentes opciones de irradiación, se podrían estudiar los procesos de muerte celular desencadenados por el daño de diferentes organelas intracelulares específicas.

Aporte al desarrollo de nuevos blancos terapéuticos

Los resultados mostrados permiten establecer que promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis* pueden sufrir un proceso de muerte organizado inducido por diferentes estímulos tal cual se ha mostrado para otras especies de *Leishmania* y células de mamífero. Este es un paso indispensable para estudios posteriores que permitan dilucidar las bases moleculares de este proceso, permitiendo establecer semejanzas o diferencias con los procesos de muerte en células de mamífero y posteriormente postular nuevos blancos terapéuticos para el desarrollo de compuestos altamente selectivos.

Implementación de nuevas metodologías

El desarrollo de la metodología propuesta, permitió la estandarización e implementación de técnicas para la evaluación de marcadores de apoptosis con las que no se contaba en el laboratorio. También permitió el establecimiento de nuevas metodologías para el estudio de la internalización de compuestos fluorescentes y de los cambios morfológicos en células crecidas directamente sobre láminas para inmunofluorescencia. El estudio de los diferentes marcadores estudiados permitió adquirir experiencia y conocimiento sobre marcajes intracelulares con compuestos fluorescentes.

Aporte a la formación científica

El desarrollo del presente trabajo de investigación permitió determinar que el TFD con PcAlCl induce un proceso de muerte celular en promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. panamensis*, expresando marcadores morfológicos y bioquímicos similares a los observados en el proceso de apoptosis en células de mamífero.

Cabe resaltar que no se contaban con estudios previos sobre las respuestas morfológicas y bioquímicas de la *L. panamensis* a estímulos de muerte.

Otro aporte importante fue la utilización del TFD como estímulo inductor de muerte y de la expresión de marcadores de apoptosis, un hallazgo importante dadas las ventajas que tiene el TFD como la utilización de diferentes FS con diferentes localizaciones subcelulares, hecho que permite estudiar las respuestas de muerte derivadas de la afectación de organelas específicas al interior de parásitos u otras células susceptibles.

Aporte al desarrollo de nuevas líneas de investigación.

El estudio de las respuestas celulares a compuestos y terapias con potencial uso en el tratamiento de la leishmaniasis es una nueva línea de investigación que se comienza a desarrollar con la presente propuesta. Esta línea permitirá incursionar en el estudio de la biología celular de parásitos y líneas celulares a diferentes tratamientos. Producto del desarrollo de este trabajo se elaboró y ejecutó una propuesta de investigación.

BIBLIOGRAFIA

ABOK, K., CADENAS, E., Brunk, U., 1988, An experimental model system for leishmaniasis. Effects of porphyrin-compounds and menadione on Leishmania parasites engulfed by cultured macrophages. *APMIS* 96, 543-551.

AKILOV, O.E., Kosaka, S., O'Riordan, K., Hasan, T., 2007, Parasitocidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Exp Dermatol* 16, 651-660.

-----, O.E., Kosaka, S., O'Riordan, K., Song, X., Sherwood, M., Flotte, T.J., Foley, J.W., Hasan, T., 2006, The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against Leishmania parasites. *Chem Biol* 13, 839-847.

AL-ABDELY, H.M., Graybill, J.R., Loebenberg, D., Melby, P.C., 1999, Efficacy of the triazole SCH 56592 against *Leishmania amazonensis* and *Leishmania donovani* in experimental murine cutaneous and visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 43, 2910-2914.

ALEXANDRATOU, E., Yova, D., Loukas, S., 2005, A confocal microscopy study of the very early cellular response to oxidative stress induced by zinc phthalocyanine sensitization. *Free Radic Biol Med* 39, 1119-1127.

ALMEIDA, R.D., Manadas, B.J., Carvalho, A.P., Duarte, C.B., 2004, Intracellular signaling mechanisms in photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta* 1704, 59-86.

ALRAJHI, A.A., Ibrahim, E.A., De Vol, E.B., Khairat, M., Faris, R.M., Maguire, J.H., 2002, Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. *N Engl J Med* 346, 891-895.

AMATO, V.S., Padilha, A.R., Nicodemo, A.C., Duarte, M.I., Valentini, M., Uip, D.E., Boulos, M., Neto, V.A., 2000, Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: a pilot study. *Int J Infect Dis* 4, 153-157.

AMEISEN, J.C., 2002, On the origin, evolution, and nature of programmed cell death: a timeline of four billion years. *Cell Death Differ* 9, 367-393.

ARANA, B.A., Mendoza, C.E., Rizzo, N.R., Kroeger, A., 2001, Randomized, controlled, double-blind trial of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg* 65, 466-470.

AREVALO, I., Ward, B., Miller, R., Meng, T.C., Najjar, E., Alvarez, E., Matlashewski, G., Llanos-Cuentas, A., 2001, Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. *Clin Infect Dis* 33, 1847-1851.

ARNOULT, D., Akarid, K., Grodet, A., Petit, P.X., Estaquier, J., Ameisen, J.C., 2002, On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ* 9, 65-81.

BAILEY, M.S., Lockwood, D.N., 2007, Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 25, 203-211.

BARR, S.D., Gedamu, L., 2003, Role of peroxidoxins in *Leishmania chagasi* survival. Evidence of an enzymatic defense against nitrosative stress. *J Biol Chem* 278, 10816-10823.

BERMAN, J.D., 1996, Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Clin Dermatol* 14, 519-522.

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

Bonneau, S., Morliere, P., Brault, D., 2004, Dynamics of interactions of photosensitizers with lipoproteins and membrane-models: correlation with cellular incorporation and subcellular distribution. *Biochem Pharmacol* 68, 1443-1452.

BRUCHHAUS, I., Roeder, T., Rennenberg, A., Heussler, V.T., 2007, Protozoan parasites: programmed cell death as a mechanism of parasitism. *Trends Parasitol* 23, 376-383.

BUATES, S., Matlashewski, G., 1999, Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. *J Infect Dis* 179, 1485-1494.

CALEGARI-SILVA, T.C., Pereira, R.M., De-Melo, L.D., Saraiva, E.M., Soares, D.C., Bellio, M., Lopes, U.G., 2009, NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. *Immunol Lett* 127, 19-26.

CASCALES, M., 2003, Bases moleculares de la apoptosis. *Anales de la Real Academia de Farmacia* 6, 29.

CORREA, J.R., Brazil, R.P., Soares, M.J., 2005, *Leishmania* (*Viannia*) *lainsoni* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* subgenus--a mini review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 100, 587-592.

CROFT, S.L., Snowden, D., Yardley, V., 1996, The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother* 38, 1041-1047.

CROFT, S.L., Sundar, S., Fairlamb, A.H., 2006, Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 19, 111-126.

CURRIE, M.A., 1983, Treatment of cutaneous leishmaniasis by curettage. *Br Med J (Clin Res Ed)* 287, 1105-1106.

CHAN, W.S., Brasseur, N., La Madeleine, C., Ouellet, R., van Lier, J.E., 1997, Efficacy and mechanism of aluminium phthalocyanine and its sulphonated derivatives mediated photodynamic therapy on murine tumours. *Eur J Cancer* 33, 1855-1859.

CHAN, W.S., Svensen, R., Phillips, D., Hart, I.R., 1986, Cell uptake, distribution and response to aluminium chloro sulphonated phthalocyanine, a potential anti-tumour photosensitizer. *Br J Cancer* 53, 255-263.

CHEN, R., Huang, Z., Chen, G., Li, Y., Chen, X., Chen, J., Zeng, H., 2008, Kinetics and subcellular localization of 5-ALA-induced PpIX in DHL cells via two-photon excitation fluorescence microscopy. *Int J Oncol* 32, 861-867.

DA SILVA, R., Sacks, D.L., 1987, Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. *Infect Immun* 55, 2802-2806.

Daniel, P.T., 2000, Dissecting the pathways to death. *Leukemia* 14, 2035-2044.

DAS, M., Mukherjee, S.B., Shaha, C., 2001, Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci* 114, 2461-2469.

DAZIANO, J.P., Humeau, L., Henry, M., Mannoni, P., Chanon, M., Chabannon, C., Julliard, M., 1998, Preferential photoinactivation of leukemia cells by aluminum phthalocyanine. *J Photochem Photobiol B* 43, 128-135.

DE CASTRO PAZOS, M., Pacheco-Soares, C., Soares da Silva, N., DaMatta, R.A., Pacheco, M.T., 2003, Ultrastructural effects of two phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. *Biocell* 27, 301-309.

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

DOLAI, S., Yadav, R.K., Pal, S., Adak, S., 2008, *Leishmania major* ascorbate peroxidase overexpression protects cells against reactive oxygen species-mediated cardiolipin oxidation. *Free Radic Biol Med* 45, 1520-1529.

DONOVAN, M.J., Maciuba, B.Z., Mahan, C.E., McDowell, M.A., 2009, *Leishmania* infection inhibits cycloheximide-induced macrophage apoptosis in a strain-dependent manner. *Exp Parasitol* 123, 58-64.

DOUGHERTY, T.J., Gomer, C.J., Henderson, B.W., Jori, G., Kessel, D., Korbek, M., Moan, J., Peng, Q., 1998, Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst* 90, 889-905.

DUBUC, C., Langlois, R., Benard, F., Cauchon, N., Klarskov, K., Tone, P., van Lier, J.E., 2008, Targeting gastrin-releasing peptide receptors of prostate cancer cells for photodynamic therapy with a phthalocyanine-bombesin conjugate. *Bioorg Med Chem Lett* 18, 2424-2427.

DUSZENKO, M., Figarella, K., Macleod, E.T., Welburn, S.C., 2006, Death of a trypanosome: a selfish altruism. *Trends Parasitol* 22, 536-542.

DUTTA, A., Bandyopadhyay, S., Mandal, C., Chatterjee, M., 2007, Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol* 56, 629-636.

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

ESCOBAR, P., Hernandez, I.P., Rueda, C.M., Martinez, F., Paez, E., 2006, Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. *Biomedica* 26 Suppl 1, 49-56.

ESCOBAR, P., Matu, S., Marques, C., Croft, S.L., 2002, Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18-OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop* 81, 151-157.

FABRIS, C., Valduga, G., Miotto, G., Borsetto, L., Jori, G., Garbisa, S., Reddi, E., 2001, Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res* 61, 7495-7500.

FINK, S.L., Cookson, B.T., 2005, Apoptosis, pyroptosis, and necrosis: mechanistic description of dead and dying eukaryotic cells. *Infect Immun* 73, 1907-1916.

FRACKOWIAK, D., Waszkowiak, A., Manikowski, H., Ion, R.M., Cofta, J., Wiktorowicz, K., 2001, The interactions of phthalocyanines with stimulated and resting human peripheral blood mononuclear cells. *Acta Biochim Pol* 48, 257-269.

GARDLO, K., Horska, Z., Enk, C.D., Rauch, L., Megahed, M., Ruzicka, T., Fritsch, C., 2003, Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol* 48, 893-896.

GAVRIELI, Y., Sherman, Y., Ben-Sasson, S.A., 1992, Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119, 493-501.

GHAFFARIFAR, F., Jorjani, O., Mirshams, M., Miranbaygi, M.H., Hosseini, Z.K., 2006, Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J* 12, 902-908.

GILABERTE, Y., Serra-Guillen, C., de las Heras, M.E., Ruiz-Rodriguez, R., Fernandez-Lorente, M., Benvenuto-Andrade, C., Gonzalez-Rodriguez, S., Guillen-Barona, C., 2006, [Photodynamic therapy in dermatology]. *Actas Dermosifiliogr* 97, 83-102.

GONTIJO, B., de Carvalho Mde, L., 2003, [American cutaneous leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop* 36, 71-80.

GRADONI, L., Gramiccia, M., Scalone, A., 2003, Visceral leishmaniasis treatment, Italy. *Emerg Infect Dis* 9, 1617-1620.

GREGORY, D.J., Godbout, M., Contreras, I., Forget, G., Olivier, M., 2008, A novel form of NF-kappaB is induced by Leishmania infection: involvement in macrophage gene expression. *Eur J Immunol* 38, 1071-1081.

HACKER, G., 2000, The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 301, 5-17.

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

HUANG, H.F., Chen, Y.Z., Wu, Y., 2005, ZnPcS2P2-based photodynamic therapy induces mitochondria-dependent apoptosis in K562 cells. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 37, 488-494.

HUERTA, S., Goulet, E.J., Huerta-Yepez, S., Livingston, E.H., 2007, Screening and detection of apoptosis. *J Surg Res* 139, 143-156.

Instituto Nacional de Salud 2009. Comportamiento de los casos de Leishmania reportados al SIVIGILA hasta el año 2009. In Instituto Nacional de Salud, p. 16.

JHA, T.K., 2006, Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. *Indian J Med Res* 123, 389-398.

JUZENIENE, A., Nielsen, K.P., Moan, J., 2006, Biophysical aspects of photodynamic therapy. *J Environ Pathol Toxicol Oncol* 25, 7-28.

KAMIR, D., Zierow, S., Leng, L., Cho, Y., Diaz, Y., Griffith, J., McDonald, C., Merk, M., Mitchell, R.A., Trent, J., Chen, Y., Kwong, Y.K., Xiong, H., Vermeire, J., Cappello, M., McMahon-Pratt, D., Walker, J., Bernhagen, J., Lolis, E., Bucala, R., 2008, A Leishmania ortholog of macrophage migration inhibitory factor modulates host macrophage responses. *J Immunol* 180, 8250-8261.

KASIM, N.A., Whitehouse, M., Ramachandran, C., Bermejo, M., Lennernas, H., Hussain, A.S., Junginger, H.E., Stavchansky, S.A., Midha, K.K., Shah, V.P., Amidon, G.L., 2004, Molecular properties of WHO essential drugs and provisional biopharmaceutical classification. *Mol Pharm* 1, 85-96.

KERR, J.F., 1965, A histochemical study of hypertrophy and ischaemic injury of rat liver with special reference to changes in lysosomes. *J Pathol Bacteriol* 90, 419-435.

KERR, S.F., 2000, Palaeartic origin of Leishmania. Mem Inst Oswaldo Cruz 95, 75-80.

KESSEL, D., Luo, Y., 1998, Mitochondrial photodamage and PDT-induced apoptosis. J Photochem Photobiol B 42, 89-95.

KESSEL, D., Luo, Y., Mathieu, P., Reiners, J.J., Jr., 2000, Determinants of the apoptotic response to lysosomal photodamage. Photochem Photobiol 71, 196-200.

KHATAMI, A., Firooz, A., Gorouhi, F., Dowlati, Y., 2007, Treatment of acute Old World cutaneous leishmaniasis: a systematic review of the randomized controlled trials. J Am Acad Dermatol 57, 335 e331-329.

KIM, H.R., Luo, Y., Li, G., Kessel, D., 1999, Enhanced apoptotic response to photodynamic therapy after bcl-2 transfection. Cancer Res 59, 3429-3432.

KING, R.J., Campbell-Lendrum, D.H., Davies, C.R., 2004, Predicting geographic variation in cutaneous leishmaniasis, Colombia. Emerg Infect Dis 10, 598-607.

KLENER, P., Jr., Andera, L., Klener, P., Necas, E., Zivny, J., 2006, Cell death signalling pathways in the pathogenesis and therapy of haematologic malignancies: overview of apoptotic pathways. Folia Biol (Praha) 52, 34-44.

KOLAROVA, H., Lenobel, R., Kolar, P., Strnad, M., 2007, Sensitivity of different cell lines to phototoxic effect of disulfonated chloroaluminium phthalocyanine. Toxicol In Vitro 21, 1304-1306.

KONAN, Y.N., Gurny, R., Allemann, E., 2002, State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. J Photochem Photobiol B 66, 89-106.

KOSAKA, S., Akilov, O.E., O'Riordan, K., Hasan, T., 2007, A mechanistic study of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol* 127, 1546-1549.

KROEMER, G., El-Deiry, W.S., Golstein, P., Peter, M.E., Vaux, D., Vandenabeele, P., Zhivotovsky, B., Blagosklonny, M.V., Malorni, W., Knight, R.A., Piacentini, M., Nagata, S., Melino, G., 2005, Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death. *Cell Death Differ* 12 Suppl 2, 1463-1467.

KUMAR, P., Lodge, R., Trudel, N., Ouellet, M., Ouellette, M., Tremblay, M.J., Nelfinavir, an HIV-1 protease inhibitor, induces oxidative stress-mediated, caspase-independent apoptosis in *Leishmania* amastigotes. *PLoS Negl Trop Dis* 4, e642.

LEE, N., Gannavaram, S., Selvapandiyan, A., Debrabant, A., 2007, Characterization of metacaspases with trypsin-like activity and their putative role in programmed cell death in the protozoan parasite *Leishmania*. *Eukaryot Cell* 6, 1745-1757.

LI, H., Jensen, T.J., Fronczek, F.R., Vicente, M.G., 2008, Syntheses and properties of a series of cationic water-soluble phthalocyanines. *J Med Chem* 51, 502-511.

LI, P., Nijhawan, D., Budihardjo, I., Srinivasula, S.M., Ahmad, M., Alnemri, E.S., Wang, X., 1997, Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 91, 479-489.

LINDOSO, J.A., Cotrim, P.C., Goto, H., 2004, Apoptosis of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 34, 1-4.

LIU, R., Arai, K., Watanabe, S., 2000, Analysis of antiapoptosis activity of human GM-CSF receptor. *J Allergy Clin Immunol* 106, S10-18.

LOCK, S.O., Friend, J.V., 1986, Phototoxicity testing in vitro: evaluation of mammalian cell culture techniques. *Food Chem Toxicol* 24, 789-793.

LOCKSHIN, R.A., Williams, C.M., 1965, Programmed Cell Death--I. Cytology of Degeneration in the Intersegmental Muscles of the Pernyi Silkworm. *J Insect Physiol* 11, 123-133.

LUKSIENE, Z., 2003, Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. *Medicina (Kaunas)* 39, 1137-1150.

MAJNO, G., Joris, I., 1995, Apoptosis, oncosis, and necrosis. An overview of cell death. *Am J Pathol* 146, 3-15.

MALHAM, G.M., Thomsen, R.J., Finlay, G.J., Baguley, B.C., 1996, Subcellular distribution and photocytotoxicity of aluminium phthalocyanines and haematoporphyrin derivative in cultured human meningioma cells. *Br J Neurosurg* 10, 51-57.

MATTSON, M.P., Chan, S.L., 2003, Calcium orchestrates apoptosis. *Nat Cell Biol* 5, 1041-1043.

MEGYERI, K., Au, W.C., Rosztoczy, I., Raj, N.B., Miller, R.L., Tomai, M.A., Pitha, P.M., 1995, Stimulation of interferon and cytokine gene expression by imiquimod and stimulation by Sendai virus utilize similar signal transduction pathways. *Mol Cell Biol* 15, 2207-2218.

MEHTA, A., Shaha, C., 2004, Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem* 279, 11798-11813.

Ministerio de la protección social, C. 2007. Guía de atención de la Leishmaniasis (República de Colombia, <http://www.minproteccionsocial.gov.co/VBeContent/NewsDetail.asp?ID=16159&IDCompany=3>)

MINODIER, P., Parola, P., 2007, Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis* 5, 150-158.

MOOR, A.C., 2000, Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 57, 1-13.

MORGENTHALER, J.B., Peters, S.J., Cedeno, D.L., Constantino, M.H., Edwards, K.A., Kamowski, E.M., Passini, J.C., Butkus, B.E., Young, A.M., Lash, T.D., Jones, M.A., 2008, Carbaporphyrin ketals as potential agents for a new photodynamic therapy treatment of leishmaniasis. *Bioorg Med Chem* 16, 7033-7038.

MORRIS, R.L., Azizuddin, K., Lam, M., Berlin, J., Nieminen, A.L., Kenney, M.E., Samia, A.C., Burda, C., Oleinick, N.L., 2003, Fluorescence resonance energy transfer reveals a binding site of a photosensitizer for photodynamic therapy. *Cancer Res* 63, 5194-5197.

MOTHERSILL, C., Seymour, C.B., 1998, Mechanisms and implications of genomic instability and other delayed effects of ionizing radiation exposure. *Mutagenesis* 13, 421-426.

MOULDING, D.A., Hart, C.A., Edwards, S.W., 1999, Regulation of neutrophil FcγRIIb (CD16) surface expression following delayed apoptosis in response to GM-CSF and sodium butyrate. *J Leukoc Biol* 65, 875-882.

MROZ, P., Pawlak, A., Satti, M., Lee, H., Wharton, T., Gali, H., Sarna, T., Hamblin, M.R., 2007, Functionalized fullerenes mediate photodynamic killing of cancer cells: Type I versus Type II photochemical mechanism. *Free Radic Biol Med* 43, 711-719.

MURRAY, H.W., 2001, Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2185-2197.

-----, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G., 2005, Advances in leishmaniasis. *Lancet* 366, 1561-1577.

-----, H.W., Cartelli, D.M., 1983, Killing of intracellular *Leishmania donovani* by human mononuclear phagocytes. Evidence for oxygen-dependent and -independent leishmanicidal activity. *J Clin Invest* 72, 32-44.

NAGATA, S., Nagase, H., Kawane, K., Mukae, N., Fukuyama, H., 2003, Degradation of chromosomal DNA during apoptosis. *Cell Death Differ* 10, 108-116.

NEUBER, H., 2008, Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges* 6, 754-765.

NEVA, F.A., Ponce, C., Ponce, E., Kreutzer, R., Modabber, F., Olliaro, P., 1997, Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras fails to respond to topical paromomycin. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 91, 473-475.

NUNES, S.M., Sguilla, F.S., Tedesco, A.C., 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.

OCHSNER, M., 1997, Photophysical and photobiological processes in the photodynamic therapy of tumours. *J Photochem Photobiol B* 39, 1-18.

OLLIARO, P.L., Guerin, P.J., Gerstl, S., Haaskjold, A.A., Rottingen, J.A., Sundar, S., 2005, Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. *Lancet Infect Dis* 5, 763-774.

OSIECKA, B.J., Piotr, Z., Gamian, E., Lis-Nawara, A., Marszalik, P., White, S.G., Bonnett, R., 2003, Determination of basic fibroblast growth factor levels in serum of tumor-bearing BALB/c mice treated with photodynamic therapy. *Pol J Pathol* 54, 117-121.

OSORIO, L.E., Castillo, C.M., Ochoa, M.T., 1998, Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. *Am J Trop Med Hyg* 59, 49-52.

OUELLETTE, M., Drummelsmith, J., Papadopoulou, B., 2004, Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat* 7, 257-266.

OVALLE, C.E., Porrás, L., Rey, M., Rios, M., Camargo, Y.C., 2006, [Geographic distribution of *Leishmania* species isolated from patients at the National Institute of Dermatology Federico Lleras Acosta E.S.E., 1995-2005]. *Biomedica* 26 Suppl 1, 145-151.

PARIS, C., Loiseau, P.M., Bories, C., Breard, J., 2004, Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 852-859.

PITTONI, V., Valesini, G., 2002, The clearance of apoptotic cells: implications for autoimmunity. *Autoimmun Rev* 1, 154-161.

PLAETZER, K., Kiesslich, T., Oberdanner, C.B., Krammer, B., 2005, Apoptosis following photodynamic tumor therapy: induction, mechanisms and detection. *Curr Pharm Des* 11, 1151-1165.

PROSKURYAKOV, S.Y., Gabai, V.L., Konoplyannikov, A.G., 2002, Necrosis is an active and controlled form of programmed cell death. *Biochemistry (Mosc)* 67, 387-408.

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

RINCON, M.Y., Silva, S.Y., Duenas, R.E., Lopez-Jaramillo, P., 2009, [A report of two cases of disseminated cutaneous leishmaniasis in Santander, Colombia]. *Rev Salud Publica (Bogota)* 11, 145-150.

ROY, A., Ganguly, A., BoseDasgupta, S., Das, B.B., Pal, C., Jaisankar, P., Majumder, H.K., 2008, Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Mol Pharmacol* 74, 1292-1307.

SAH, J.F., Ito, H., Kolli, B.K., Peterson, D.A., Sassa, S., Chang, K.P., 2002, Genetic rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants

suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. *J Biol Chem* 277, 14902-14909.

SALOTRA, P., Singh, R., 2006, Challenges in the diagnosis of post kala-azar dermal leishmaniasis. *Indian J Med Res* 123, 295-310.

SANTA-RITA, R.M., Henriques-Pons, A., Barbosa, H.S., de Castro, S.L., 2004, Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. *J Antimicrob Chemother* 54, 704-710.

SARASTE, A., Pulkki, K., 2000, Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res* 45, 528-537.

SARAVIA, N.G., Nicholls, R.S., 2006, [Leishmaniasis: a public health challenge that demands concerted effort and will (editorial)]. *Biomedica* 26 Suppl 1, 7-9.

SARAVIA, N.G., Weigle, K., Navas, C., Segura, I., Valderrama, L., Valencia, A.Z., Escorcia, B., McMahon-Pratt, D., 2002, Heterogeneity, geographic distribution, and pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. *Am J Trop Med Hyg* 66, 738-744.

SCHUITMAKER, J.J., Baas, P., van Leengoed, H.L., van der Meulen, F.W., Star, W.M., van Zandwijk, N., 1996, Photodynamic therapy: a promising new modality for the treatment of cancer. *J Photochem Photobiol B* 34, 3-12.

SCHULTZ, D.R., Harrington, W.J., Jr., 2003, Apoptosis: programmed cell death at a molecular level. *Semin Arthritis Rheum* 32, 345-369.

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

SEIFERT, K., Escobar, P., Croft, S.L., In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother* 65, 508-511.

SEN, N., Das, B.B., Ganguly, A., Mukherjee, T., Bandyopadhyay, S., Majumder, H.K., 2004, Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 279, 52366-52375.

SERENO, D., Holzmuller, P., Mangot, I., Cuny, G., Ouaisi, A., Lemesre, J.L., 2001, Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 45, 2064-2069.

SHACKELFORD, R.E., Kaufmann, W.K., Paules, R.S., 1999, Cell cycle control, checkpoint mechanisms, and genotoxic stress. *Environ Health Perspect* 107 Suppl 1, 5-24.

SHAZAD, B., Abbaszadeh, B., Khamesipour, A., 2005, Comparison of topical paromomycin sulfate (twice/day) with intralesional meglumine antimoniate for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. major*. *Eur J Dermatol* 15, 85-87.

SINGH, G., Dey, C.S., 2007, Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*. *Acta Trop* 103, 172-185.

SINGH, G., Jayanarayan, K.G., Dey, C.S., 2005, Novobiocin induces apoptosis-like cell death in topoisomerase II over-expressing arsenite resistant *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 141, 57-69.

SINGH, N., Kaur, J., Kumar, P., Gupta, S., Ghosal, A., Dutta, A., Kumar, A., Tripathi, R., Siddiqi, M.I., Mandal, C., Dube, A., 2009, An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of *Leishmania donovani* overexpressing pteridine reductase 1. *Parasitol Res* 105, 1317-1325.

SOTO, J., Berman, J., 2006, Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 100 Suppl 1, S34-40.

SOTO, J., Soto, P., 2006a, [Current situation and future of antileishmanial therapy in Colombia]. *Biomedica* 26 Suppl 1, 194-206.

-----,. 2006b, [Oral miltefosine to treat leishmaniasis]. *Biomedica* 26 Suppl 1, 207-217.

SOTO, J., Toledo, J., Vega, J., Berman, J., 2005, Short report: efficacy of pentavalent antimony for treatment of colombian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg* 72, 421-422.

SUNDAR, S., Chatterjee, M., 2006, Visceral leishmaniasis - current therapeutic modalities. *Indian J Med Res* 123, 345-352.

SUNDAR, S., Mehta, H., Chhabra, A., Singh, V., Chauhan, V., Desjeux, P., Rai, M., 2006, Amphotericin B colloidal dispersion for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *Clin Infect Dis* 42, 608-613.

SYNTICHAKI, P., Tavernarakis, N., 2002, Death by necrosis. Uncontrollable catastrophe, or is there order behind the chaos? *EMBO Rep* 3, 604-609.

TAQUET, J.P., Frochot, C., Manneville, V., Barberi-Heyob, M., 2007, Phthalocyanines covalently bound to biomolecules for a targeted photodynamic therapy. *Curr Med Chem* 14, 1673-1687.

TEITEN, M.H., Bezdetnaya, L., Morliere, P., Santus, R., Guillemin, F., 2003, Endoplasmic reticulum and Golgi apparatus are the preferential sites of Foscan localisation in cultured tumour cells. *Br J Cancer* 88, 146-152.

TIMMER, J.C., Salvesen, G.S., 2007, Caspase substrates. *Cell Death Differ* 14, 66-72.

USUDA, J., Chiu, S.M., Murphy, E.S., Lam, M., Nieminen, A.L., Oleinick, N.L., 2003, Domain-dependent photodamage to Bcl-2. A membrane anchorage region is needed to form the target of phthalocyanine photosensitization. *J Biol Chem* 278, 2021-2029.

VAN CRUCHTEN, S., Van Den Broeck, W., 2002, Morphological and biochemical aspects of apoptosis, oncosis and necrosis. *Anat Histol Embryol* 31, 214-223.

VANNIER-SANTOS, M.A., Martiny, A., de Souza, W., 2002, Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. *Curr Pharm Des* 8, 297-318.

VELEZ, I.D., Colmenares, L.M., Munoz, C.A., 2009, Two cases of visceral leishmaniasis in Colombia resistant to meglumine antimonial treatment. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51, 231-236.

VERMA, N.K., Dey, C.S., 2004, Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 48, 3010-3015.

-----,. Singh, G., Dey, C.S., 2007, Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol* 116, 1-13.

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

WILLARD, R.J., Jeffcoat, A.M., Benson, P.M., Walsh, D.S., 2005, Cutaneous leishmaniasis in soldiers from Fort Campbell, Kentucky returning from Operation Iraqi Freedom highlights diagnostic and therapeutic options. *J Am Acad Dermatol* 52, 977-987.

WILLINGHAM, M.C., 1999, Cytochemical methods for the detection of apoptosis. *J Histochem Cytochem* 47, 1101-1110.

Xue, L.Y., Chiu, S.M., Oleinick, N.L., 2005, Differential responses of Mcl-1 in photosensitized epithelial vs lymphoid-derived human cancer cells. *Oncogene* 24, 6987-6992.

YOUNG, F.M., Phungtamdet, W., Sanderson, B.J., 2005, Modification of MTT assay conditions to examine the cytotoxic effects of amitraz on the human lymphoblastoid cell line, WIL2NS. *Toxicol In Vitro* 19, 1051-1059.

ZANGGER, H., Mottram, J.C., Fasel, N., 2002, Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 9, 1126-1139.