

EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD FOTOTÓXICA DE LA BIS  
(TRI-N-HEXILSILOXIDO)- Y BIS CLORO FTALOCIANINA DE SILICIO  
EN *LEISHMANIA*

EDGAR HERNANDO LIZARAZO JAIMES

UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
POSGRADO EN QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2006

**EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD FOTOTÓXICA DE LA BIS  
(TRI-N-HEXILSILOXIDO)- Y BIS CLORO FTALOCIANINA DE SILICIO  
EN *LEISHMANIA***

**EDGAR HERNANDO LIZARAZO JAIMES**

Tesis de Grado como requisito para optar al título de  
**Magíster en Química**

Directora: **PATRICIA ESCOBAR RIVERO**, Bacterióloga, M. Sc., Ph. D.  
Codirectores: **FERNANDO MARTÍNEZ ORTEGA**, Químico, Ph. D.  
**EDGAR ALBERTO PÁEZ MOZO**, Químico, Ph. D.

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE QUÍMICA  
POSGRADO EN QUÍMICA  
BUCARAMANGA  
2006**

*A las Elenas “Dulcineas de este cuento”*

## AGRADECIMIENTOS

Al instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” COLCIENCIAS por su apoyo financiero (proyecto Código 1102-04-14130; RC No 480-2003). A los doctores Edgar Páez, Fernando Martínez y Patricia Escobar por la disponibilidad y sus valiosos aportes fundamentales en la culminación de esta empresa.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCIÓN	15
1. ESTADO DEL ARTE	18
1.1 LEISHMANIASIS	18
1.2 QUIMIOTERAPIA EN LA LEISHMANIASIS.	22
1.3 TERAPIA FOTODINÁMICA (TFD).	23
1.3.1 Mecanismos fotoquímicos presentes en la TFD.	24
1.3.2 Mecanismos de fotooxidación de las membranas lipídicas en la TFD.	26
1.3.3 Fotosensibilizadores (FS) empleados en la terapia fotodinámica.	29
1.4 FTALOCIANINAS DE SILICIO (PcSi)	31
1.5 LIPOSOMAS	32
1.5.1 Generalidades.	32
1.5.2 Composición química de los liposomas	34
1.5.3 Utilización de los liposomas como transportadores de medicamentos.	37
2. METODOLOGÍA	39
2.1 MATERIALES	40
2.1.1 Parásitos.	40
2.1.2 Células.	40
2.1.3 Fotosensibilizadores.	40
2.1.4 Ftalocianinas liposomales.	41
2.1.5 Sistema de irradiación.	42
2.2 PREPARACIÓN DE LAS FTALOCIANINAS DE SILICIO LIPOSOMALES.	42
2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS	44
2.3.1 Determinación de la concentración de los fosfolípidos.	44
2.3.2 Determinación de la concentración de ftalocianina.	44

2.3.3 Evaluación de la contaminación de las formulaciones liposomales.	45
2.4 INCORPORACIÓN DE LAS FTALOCIANINA LIPOSOMALES EN CÉLULAS THP-1.	46
2.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS FTALOCIANINAS DE SILICIO EN CÉLULAS THP-1	47
2.6 DETERMINACIÓN DEL EFECTO FOTOTÓXICO DE LAS FTALOCIANINAS DE SILICIO EN <i>LEISHMANIA</i> .	49
2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	51
3. RESULTADOS	53
3.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS FTALOCIANINAS DE SILICIO LIPOSOMALES.	53
3.1.1 Estabilidad de las ftalocianinas en medio acuoso.	53
3.1.2 Estabilidad de las formulaciones liposomales.	55
3.2. INCORPORACIÓN DE LA FTALOCIANINAS EN MACRÓFAGOS.	57
3.3. EFECTO TÓXICO Y FOTOTÓXICO DE LAS FTALOCIANINAS DE SILICIO EN CÉLULAS THP-1	59
3.4. EFECTO FOTOTÓXICO DE LAS FTALOCIANAS DE SILICIO CONTRA PARÁSITOS INTRACELULARES DE <i>LEISHMANIA CHAGASI</i> .	65
4. DISCUSIÓN	68
4.1 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LA FORMULACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOTOXICA DE LAS FTALOCIANINAS EN CÉLULAS THP-1	69
4.2 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LA FORMULACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOTOXICA DE LAS FTALOCIANINAS EN AMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA CHAGASI</i>	71
5. CONCLUSIONES	73
6. RECOMENDACIONES	75
7. BIBLIOGRAFÍA	76

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Estructuras espaciales teóricas de los lípidos en la fase de cristal-líquido.	37
Tabla 2. Formulaciones de las ftalocianinas de silicio libres utilizadas.	41
Tabla 3. Concentración de fosfolípidos y ftalocianina en las formulaciones liposomales.	53
Tabla 4. Citotoxicidad de las formulaciones de las PcSi en macrófagos no infectados.	59
Tabla 5. Fototoxicidad de las formulaciones de la PcSiCl <sub>2</sub> en células THP-1 no infectadas.	60
Tabla 6. Fototoxicidad de las formulaciones de la TriHex en células THP-1.	63
Tabla 7. Efecto fototóxico de la TriPC contra amastigotes de <i>Leishmania chagasi</i> .	67

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Pág.</b>
Figura 1. Ciclo de vida de la Leishmania.	20
Figura 2. Fotorreacciones tipo I y II presentes en la terapia fotodinámica.	24
Figura 3. Estructura de las ftalocianinas de silicio sustituidas axialmente.	31
Figura 4. Clasificación de los liposomas según su lamelaredad y tamaño.	33
Figura 5. Estructura molecular de los fosfolípidos.	35
Figura 6. Estructuras teóricas de los estados que pueden presentar los fosfolípidos.	36
Figura 7. Diagrama de flujo de las etapas principales realizadas en esta investigación.	39
Figura 8. Espectro de absorción ultravioleta visible de la TriHex en THF y en una mezcla de medio de cultivo RPMI 1640 y THF $1.0 \times 10^{-5} M$ .	54
Figura 9. Espectro de absorción ultravioleta visible de la $PcSiCl_2$ $1.0 \times 10^{-5} M$ en DMF y en una mezcla de medio de cultivo RPMI 1640 y DMF.	55
Figura 10. Espectros ultravioleta visible de la ftalocianina liposomal TriPC $1.0 \times 10^{-5}$ en medio RPMI.	56
Figura 11. Fluorescencia de la TriPC incorporada por las células THP-1.	57
Figura 12. Fluorescencia de la TriHex libre en células THP-1.	58
Figura 13. Actividad de la $Cl_2PC$ en macrófagos THP-1	61
Figura 14. Potencia relativa de la $Cl_2PC$ en la destrucción de células THP-1.	62
Figura 15. Efecto fototóxico de la TriPC en células THP-1.	64
Figura 16. Actividad de la $Cl_2PC$ en macrófagos THP-1.	65
Figura 17. Efecto fototóxico de la TriPC contra amastigotes intracelulares de <i>L. chagasi</i> .	66
Figura 18. Posible conformación de la bicapa lipídica de la TriHex.	68

## LISTA DE APENDICE

	<b>Pág.</b>
APÉNDICE 1.	88
APÉNDICE 2.	90
APÉNDICE 3.	92
APÉNDICE 4.	93

**TITULO: EVALUACIÓN *IN VITRO* DE LA ACTIVIDAD FOTOTÓXICA DE LA BIS (TRI-N-HEXILSILOXIDO)- Y BIS CLORO FTALOCIANINA DE SILICIO EN *LEISHMANIA*\***

**AUTORES: LIZARAZO JAIMES, Edgar,; PÁEZ MOZO, Edgar,; MARTÍNEZ ORTEGA, Fernando, ESCOBAR RIVERO, Patricia\*\***

**PALABRAS CLAVES: ftalocianinas de silicio, fotosensibilización, terapia fotodinámica, *Leishmania*, liposomas.**

En numerosos países la quimioterapia con antimoniales es usada como tratamiento único contra la leishmaniasis a pesar de los efectos tóxicos sistémicos y a la resistencia que ha desarrollado el parásito a estos medicamentos. Por tal razón es necesaria la búsqueda de nuevos tratamientos. La terapia fotodinámica (TFD) es una alternativa terapéutica usada principalmente contra el cáncer que podría ser utilizada para la destrucción de parásitos de *Leishmania*. Se basa en que ciertos compuestos denominados fotosensibilizadores, cuando son excitados con radiación visible de una longitud de onda apropiada, pueden generar especies reactivas del oxígeno que causan la destrucción selectiva de los tejidos enfermos.

En este trabajo se evaluó la fototoxicidad de la bis(tri-n-hexilsiloxido)- y bis cloro ftalocianina de silicio contra monocitos humanos de leucemia y parásitos intracelulares de *Leishmania chagasi*. Para incrementar la solubilidad en el medio de cultivo y su incorporación en la células, las ftalocianinas se encapsularon en liposomas de fosfatidilcolina y colesterol.

La bis cloro ftalocianina de silicio liposomal (Cl<sub>2</sub>PC) presentó mayor actividad contra las células de leucemia que la bis(tri-n-hexilsiloxido) ftalocianina de silicio liposomal (TriPC). La magnitud de la concentración letal cincuenta (CL<sub>50</sub>) fue 11.78 veces mayor para la TriPC (2.98±0.17) x10<sup>-6</sup> M que para la Cl<sub>2</sub>PC (2.53±0.22) x10<sup>-7</sup> M. El efecto fototóxico ocasionó menos del 50 % de muerte celular al utilizar las ftalocianinas disueltas en una mezcla de RPMI-solvente.

La concentración inhibitoria cincuenta (CI<sub>50</sub>) fue evaluada en un rango de concentraciones entre 0.12 a 1.11 µM para la TriPC y entre 0.04 a 0.4 µM para la Cl<sub>2</sub>PC. La TriPC mostró efecto inhibitorio de la infección y el valor correspondiente a la CI<sub>50</sub> encontrado fue 6.17x10<sup>-7</sup> M. Las ftalocianinas disueltas en RPMI-solvente no mostraron actividad fototóxica contra parásitos intracelulares de *Leishmania*. Los resultados obtenidos muestran que las ftalocianinas de silicio al ser utilizadas en la TFD pueden llegar a ser una excelente alternativa contra la leishmaniasis si estos fotosensibilizadores son encapsulados en liposomas.

---

\* Tesis de grado de Maestría en Química

\*\* Facultad de Ciencias, Maestría en química, Dra. Patricia Escobar Rivero

**TITLE: IN VITRO EVALUATION OF PHOTOTOXIC ACTIVITY OF BIS(TRI-N-HEXILSILOXY) SILICON PHTHALOCYANINE AND DICHLOROSILICON PHTHALOCYANINE\***

**AUTHORS: LIZARAZO JAIMES, Edgar,; PÁEZ MOZO, Edgar,; MARTÍNEZ ORTEGA, Fernando, ESCOBAR RIVERO, Patricia\*\***

**KEYWORDS: Silicon phthalocyanine, Photosensitization, photodynamic therapy, *Leishmania*, liposomes.**

In many countries the chemotherapy with pentavalent antimonials is used as unique treatment against the leishmaniasis in spite of the systemic toxic effects and to the resistance that has developed the parasite to these drugs. For this reason it is necessary the search of new treatments. Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic alternative used mainly against the cancer that could be used for the destruction of parasites of *Leishmania*. PDT is based on the concept that certain compounds called photosensitizer can be localized in neoplastic tissue, and subsequently, these photosensitizer can be activated with appropriate wavelength of light to generate active molecular species of the oxygen that are toxic to cell and tissues.

In this work the phototoxic activity in vitro of both bis(tri-n-hexilsiloxido) - and bis chlorine silicon phthalocyanine was evaluated against human monocitos of leukemia and parasites of *Leishmania* chagasi. These phthalocyanines have been encapsulated in phosphatidilcoline and cholesterol liposomas.

The dichlorosilicon phthalocyanine liposomal (Cl<sub>2</sub>PC) it presented bigger activity against the leukemia cells that the bis(tri-n-hexilsiloxido) silicon Phthalocyanine liposomal (TriPC). The magnitude of the lethal concentration fifty (LC<sub>50</sub>) has been 11.78 bigger for the TriPC (2.98±0.17) x10<sup>-6</sup> M that for the Cl<sub>2</sub>PC (2.53±0.22) x10<sup>-7</sup> M. The activity phototoxic caused less than 50% of cellular death when using the phthalocyanines dissolved in a mixture of RPMI-solvent. The inhibitory concentration (CI<sub>50</sub>) it was evaluated in a range of concentrations among 0.12 to 1.11 μM for the TriPC and among 0.04 to 0.4 μM for the Cl<sub>2</sub>PC. Alone the TriPC showed inhibitory activity of the infection and the value corresponding to the IC<sub>50</sub> has been 6.17x10<sup>-7</sup> M. Phthalocyanines dissolved in RPMI-solvent not showed phototoxic activity against *Leishmania*. Results showed that the silicon phthalocyanines in PDT can end up being an excellent alternative against the leishmaniasis when these photosensitizers are encapsulated in liposomas, to increase their photoactivity and increment their incorporation in cells.

---

\* Thesis of grade of Master in Chemistry

\*\* School of sciences, Master in Chemistry, Patricia Escobar Rivero

## ABREVIATURAS

ALA	Ácido 5-aminolevulini
Cl <sub>2</sub> PC	Bis cloro ftalocianina de silicio liposomal.
Col	Colesterol
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria que ocasiona el 50 por ciento de inhibición
CL <sub>50</sub>	Concentración letal que causa el 50 por ciento de muerte celular.
DMF	Dimetilformamida.
FC	Fosfatidilcolina
FS	Fotosensibilizador.
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrógeno.
<i>L.</i>	<i>Leishmania.</i>
L:H	Lípido.
L•	Radical lipídico.
LOO•	Radical hidroperóxido de un lípido.
LOOH	Hidroperóxido lipídico.
M	Concentración molar.
ND	No determinado.
<sup>1</sup> O <sub>2</sub>	Oxígeno singulete.
O <sup>•</sup> <sub>2</sub>	Anión radical superóxido.
•HO	Radical hidroxilo.
<sup>1</sup> P	Estado singulete fundamental del fotosensibilizador.
<sup>1</sup> P*	Estado singulete excitado del fotosensibilizador.
<sup>3</sup> P*	Estado triplete excitado del fotosensibilizador.
Pc	Ftalocianina
PcSi	Ftalocianina de silicio
PcSiCl <sub>2</sub>	Medio de cultivo celular.
PpIX	Vesículas unilamelares pequeñas.
SUV	Vesículas unilamelares pequeñas.
THF	Tetrahidrofurano.

TriHex	Bis (tri-n-hexilsiloxido) ftalocianina de silicio
TriPC	Bis (tri-n-hexilsiloxido) ftalocianina de silicio liposomal
TFD	Terapia fotodinámica
S	Sustrato orgánico
$\mu\text{M}$	Concentración micromolar
VML	Vesículas multilamelares.
VUL	Vesículas unilamelares.

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis son enfermedades endémicas causadas por diferentes especies de parásitos denominados *Leishmania*, los cuales se transmiten a los humanos por la picadura de mosquitos infectados, esta transmisión generalmente es zoonótica. Clínicamente esta enfermedad se manifiesta por la producción de lesiones cutáneas, mucosas o viscerales. Solo los tratamientos quimioterapéuticos han sido aprobados contra la leishmaniasis, y son los antimoniales pentavalentes considerados como medicamentos de primera elección aunque presentan ciertas deficiencias principalmente porque su uso está ligado con ciertos efectos tóxicos secundarios en varios órganos y algunos parásitos han mostrado resistencia al tratamiento, además, estos medicamentos están restringidos en el mercado. Por estas razones se hace necesaria la búsqueda de tratamientos alternativos que permitan destruir los parásitos de *Leishmania* con un menor efecto tóxico secundario.

El objetivo principal de esta investigación fue destruir parásitos intracelulares de *Leishmania chagasi* con un novedoso método conocido como terapia fotodinámica, el cual fue desarrollado inicialmente contra el cáncer y que eventualmente podría llegar a ser utilizado en el tratamiento de las leishmaniasis debido a que existen ciertas características comunes entre las células cancerígenas y las células infectadas con parásitos de *Leishmania*, lo cual ha estimulado el uso de ciertos compuestos y tratamientos, desarrollados originalmente contra el cáncer, para destruir parásitos de *Leishmania* (Croft, Seifert y Duchene, 2003; Paris, 2004). La TFD consiste en la destrucción selectiva de tejidos por la fotooxidación lipídica de las membranas celulares debido a la presencia de especies reactivas del oxígeno, que se generan cuando ciertos fotosensibilizadores que han sido localizados en los tejidos neoplásicos son activados mediante radiación con longitudes de onda apropiada.

En esta investigación se utilizó la actividad fotodinámica de la bis cloro- y bis (tri-n-hexilsiloxido) ftalocianinas de silicio *in vitro* contra parásitos intracelulares de *Leishmania chagasi* y contra células humanas de leucemia. Estas ftalocianinas han sido utilizadas con muy buenos resultados en investigaciones contra células de cáncer, aunque su principal inconveniente es su carácter hidrófobo el cual no permite que estas ftalocianinas puedan ser utilizadas directamente en medios de cultivo.

Algunos investigadores han observado que los medicamentos tradicionalmente usados al ser administrados en formulaciones lipídicas presentan una reducción de la toxicidad y un incremento de la actividad contra la *Leishmania* (Yardley y Croft, 2000). En esta investigación el objetivo específico más relevante fue la utilización liposomas como transportadores de las ftalocianinas de silicio para facilitar su solubilidad en medios acuosos además de las ventajas mencionadas anteriormente.

Para los ensayos de actividad fototóxica (TFD), se preparó una mezcla con las diluciones de las ftalocianinas en solventes orgánicos y medio RPMI 1640, cuidando que el porcentaje de solvente fuera menor a 0.5 %. Además, se usaron las ftalocianinas encapsuladas en liposomas como estrategia para incrementar su actividad fototóxica. Estos liposomas tienen la capacidad de aumentar la concentración de la ftalocianina en las células y dirigir estos fotosensibilizadores a los sitios donde se encuentran los parásitos de *Leishmania*. Los liposomas permiten el transporte de compuestos altamente hidrófobos en medios acuosos, el transportador liposomal utilizado en esta investigación fue preparado con fosfatidilcolina y colesterol, estos lípidos garantizan que el liposoma libere la ftalocianina solo cuando estos son irradiados con longitudes de onda correspondiente al rojo del espectro electromagnético ( $\lambda > 650$  nm). En el proceso de irradiación la ftalocianina excitada puede destruir la membrana de los liposomas y liberarse de esta, una vez liberada esta ftalocianina continúa la fotooxidación de las membranas del parásito y de las células. Los resultados de fotocitotoxicidad obtenidos con las formulaciones liposomales en células de leucemia, presentaron un efecto fototóxico dependiente de la

concentración, el cual fue reproducible en los dos experimentos realizados, la citotóxicidad en la oscuridad de estas formulaciones es muy baja por lo general son menores al 10 %.

Finalmente se evaluó *in vitro* la actividad contra la *Leishmania*, en células THP-1 infectadas con parásitos de *Leishmania chagasi*. En estos experimentos se determinó la inhibición de la infección con respecto a células infectadas que no fueron tratadas con las ftalocianinas. Se observó un efecto fototóxico dependiente de la concentración cuando se utilizó la bis (tri-n-hexilsiloxido) ftalocianina de silicio liposomal (TriPC).

La bis cloro ftalocianina de silicio liposomal (Cl<sub>2</sub>PC) presentó mayor actividad contra las células de leucemia que la bis (tri-n-hexilsiloxido) ftalocianina de silicio liposomal (TriPC). La magnitud de la concentración letal cincuenta (CL<sub>50</sub>) fue 11.78 veces mayor para la TriPC que para la Cl<sub>2</sub>PC. El efecto fototóxico ocasionó menos del 50 % de muerte celular al utilizar las ftalocianinas disueltas en una mezcla de RPMI-solvente. Aunque la Cl<sub>2</sub>PC no mostró efecto fototóxico en amastigotes intracelulares de *L. chagasi* en el rango de concentraciones evaluada.

La concentración inhibitoria cincuenta (CI<sub>50</sub>) fue evaluada en un rango de concentraciones entre 0.12 a 1.11  $\mu$ M para la TriPC. Las ftalocianinas disueltas en RPMI-solvente no mostraron actividad fototóxica contra parásitos intracelulares de *Leishmania*. Los resultados obtenidos muestran que las ftalocianinas de silicio al ser utilizadas en la TFD pueden llegar a ser una excelente alternativa contra la leishmaniasis si estos fotosensibilizadores son encapsulados en liposomas, porque incrementan su actividad fototóxica.

## 1. ESTADO DEL ARTE

### 1.1 LEISHMANIASIS

Las leishmaniasis es un grupo de enfermedades causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania spp*, que tienen como reservorios a animales domésticos, silvestres y en algunas ocasiones al hombre (Macias, 1999). El número de personas enfermas en el mundo son 12 millones y las que están en riesgo de contraer la enfermedad son alrededor de 350 millones según los reportes de la Organización Mundial de la Salud (WHO, 1995).

En Colombia el Ministerio de la protección social informa alrededor de 6.500 casos anuales de leishmaniasis, sin incluir los casos que se presentan en el ejército (aproximadamente 2.000), este panorama es aún más desalentador, debido al gran número de personas infectadas que no acuden a los centros de salud para su tratamiento. (King et al., 2004; Velez et al., 2001; Trujillo, 2001).

El parásito o agente etiológico responsable es un protozoario dimórfico que pertenece a la familia *Trypanosomatidae*, del género *Leishmania* orden *Kinetoplastidia* (Cuba, 2000). Morfológicamente todas las especies son similares, con diferencias en el comportamiento biológico, inmunológico, tipo de enfermedad que causan y distribución geográfica. En el Nuevo Mundo, se han reconocido un total de 20 especies del género *Leishmania*, de las cuales 14 son conocidas que infectan al hombre (Ampuero, 2000). La leishmaniasis es una antropozoonosis que llega al hombre por la picadura de diferentes especies de mosquitos infectados (Travi et al., 2001). En América y en el resto del mundo (Europa, Asia y África) las especies de insectos responsables de transmitir los parásitos son la *Lutzomia* y *Flebotomos* respectivamente.

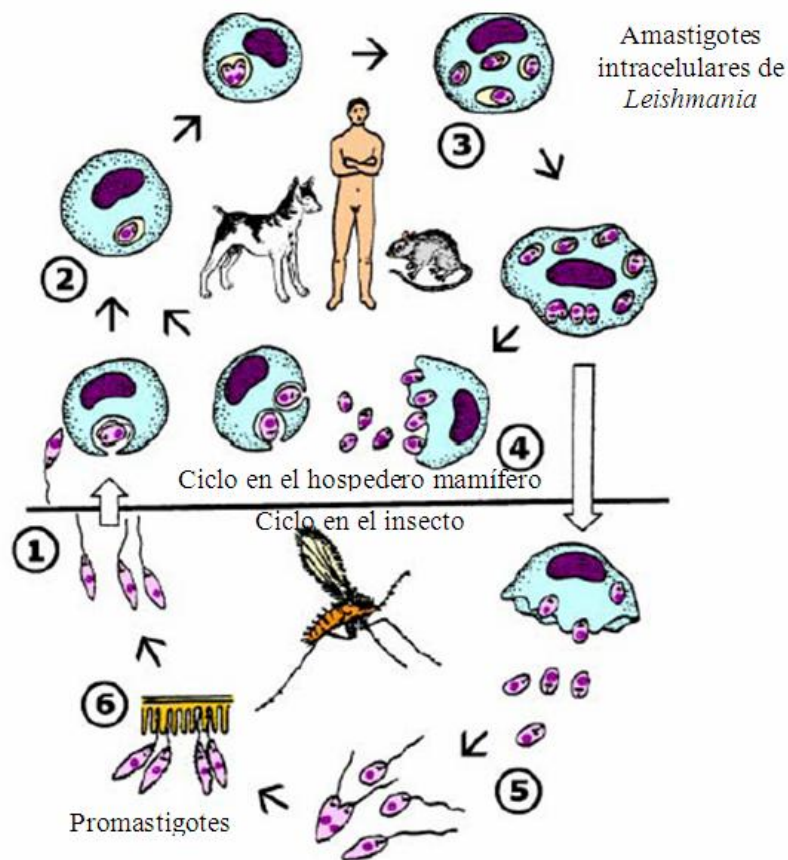
Estas enfermedades de evolución crónica se caracterizan por comprometer piel, mucosas y vísceras dependiendo de la especie de *Leishmania* causante y de la respuesta inmune del huésped. Las formas clínicas son: leishmaniasis cutánea, visceral, mucocutánea y difusa (Lenis, 1998). La leishmaniasis visceral es la condición más agresiva, causa fiebre, pérdida de peso, causa hepatomegalia y esplenomegalia y es letal si no es tratada (Burstein y Guillén, 2002). Por otra parte, la leishmaniasis cutánea es la forma de mayor incidencia en Latinoamérica con 39 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad y 59.000 casos reportados anualmente (Galvão et al., 2003). Esta incluye la leishmaniasis cutánea localizada que se caracteriza por la presencia de lesiones granulomatosas y ulceradas y la leishmaniasis cutánea difusa no presenta úlceras y solo se observan algunas lesiones nodulares (Lenis, 1998).

Estas enfermedades tienen en común: (i) el agente causal (alguna especie de *Leishmania*), (ii) el vector (insectos dípteros hematófagos), (iii) el reservorio (vertebrados mamíferos) y (iv) el parasitismo de las células del sistema fagocítico mononuclear sobre todo macrófagos (Ampuero, 2000).

Los parásitos de *Leishmania* presentan dos ciclos de transmisión: el ciclo silvestre donde la *Leishmania* circula entre los reservorios naturales, manteniendo el ciclo con la participación de vectores propios de la zona y el ciclo doméstico donde participan como reservorios animales domésticos como el perro y el caballo y el hombre (ver figura 1) (Ampuero, 2000). El parásito presenta dos formas de vida bien diferenciadas: la promastigota y la amastigota. Como se aprecia en la Figura 1, los promastigotes, se multiplican en el intestino medio del insecto y están caracterizados morfológicamente por la presencia de un flagelo. La infección se inicia cuando los mosquitos hembra inyectan los promastigotes en la piel y estos son fagocitados por las células mononucleares del sistema inmunitario (principalmente macrófagos). Dentro de estas células, los promastigotes forman la vacuola parasitófora la cual se

fusiona con los lisosomas. En este sitio, los promastigotes pierden su flagelo y se transforman en amastigotes los cuales se multiplican por fisión binaria. Estos pueden romper la célula y liberarse para infectar otras células del mismo tipo (Descoteaux y Turco, 1999)

**Figura 1.** Ciclo de vida de la Leishmania.



\* (1) Forma extracelular del parásito (promastigotes), se encuentran en las glándulas salivales de los mosquitos, infectan los macrófagos donde se transforman en amastigotes, (2), forma intracelular, dentro de las células los parásitos forman las vacuolas parasitófora, (3) los parásitos se dividen por fisión binaria, (4) los

amastigotes lisan las células y (5) pasan al torrente sanguíneo donde son tomados por los mosquitos dípteros.

Los macrófagos y demás células fagocíticas tienen la capacidad de eliminar los patógenos intracelulares por medio de diferentes mecanismos que incluyen la respuesta oxidativa y la producción de enzimas lisosómicas y proteínas catiónicas, los cuales además, inducen la formación de úlceras e inflamación de los tejidos en donde se localizan los parásitos (Lenis, 1998).

Los promastigotes han desarrollado estrategias para sobrevivir en las células del sistema inmunitario de algunos mamíferos, una de ellas es la localización de lipofosfoglicanos en su superficie. A estas moléculas se les ha responsabilizado de facilitar la entrada del parásito a la célula y de conferirle resistencia a la acción lítica por acción del ambiente ácido y las hidrolasas de los lisosomas de estas células (Descoteaux y Turco, 1999). Recientemente se ha encontrado que la alta infectividad de los promastigotes en la fase estacionaria comparada con la fase logarítmica, se debe a la principalmente a la exposición de fosfatidilserina (FS) en su superficie el cual puede ayudar al promastigote a ser incorporado por los macrófagos a través de los receptores de FS similar al mecanismo adoptado por las células apoptóticas (Fadok et al. 2000; Freitas et al. 2001; Tripathi A. y Gupta, 2003).

Dentro de las células el parásito pierde su flagelo, a esta forma intracelular no flagelada se le denomina amastigote, la cual se localiza en un compartimiento denominado fagolisosoma en donde se multiplica por fisión binaria, luego se liberan e infectan otras células del mismo tipo (Descoteaux y Turco, 1999).

## 1.2 QUIMIOTERAPIA EN LA LEISHMANIASIS.

Los antimoniales pentavalentes: gluconato sódico de antimónio (Pentostan®) y el antimoniato meglumine (Glucantime®) son consideradas por la Organización Mundial de la Salud como los medicamentos de primera línea en el tratamiento de la leishmaniasis (Machado et al., 2002). Como tratamiento de segunda línea se utiliza la anfotericina B, la pentamidina y la miltefosina (Croft et al., 2005). El mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes no se ha elucidado claramente aunque se sabe que ellos inhiben la ruta glucolítica y la  $\beta$  oxidación de ácidos grasos de las membranas de los amastigotes (Yepez y Scorza, 2003). Sin embargo, el uso de estas drogas en pacientes está limitado por: su elevado potencial cardio y nefrotóxico, por su inactividad al ser usadas por vía oral, por el incremento desproporcionado de su costo y/o por la poca disponibilidad de estos medicamentos en el mercado (Carcelén et al., 1999; Martínez et al., 1998; Moskowitz y Kuerban, 1999, Toledo et al., 2001).

Además, su uso continuo ha causado que el parásito incremente su resistencia a estos medicamentos, esto debido posiblemente a algunas proteínas de la membrana del parásito que actúan como bombas que retiran el medicamento (Guimond, 2003; Leandro y Campino, 2003).

En Colombia el tratamiento de primera opción es el antimoniato de meglumine Glucantime® y sólo en caso de que este falle se utiliza el isotianato de pentamidina (Pentacarina®) y la anfotericina B.

Además de la quimioterapia se han utilizado otros métodos para destruir los parásitos de *Leishmania*, entre estos se encuentra la termoterapia, la electroterapia y la crioterapia (Moskowitz y Kurban, 1999). Pero, estos métodos no han mostrado resultados comparables con la quimioterapia. Recientemente se ha tratado de inhibir la producción de enzimas vitales para la supervivencia del parásito, por ejemplo, se

han utilizado antidepresivos tricíclicos para inhibir la enzima H<sup>+</sup>-ATPasa (responsable de la resistencia del parásito a los cambios de pH) (Yepez y Scorza, 2003). Lamentablemente el tratamiento quimioterapéutico con estos medicamentos presenta baja o nula efectividad en algunas especies de *Leishmania*. También se han utilizado combinaciones de los medicamentos de primera línea con resultados alentadores (Ampuero, 2000; Galvao et al., 2001).

Recientemente, la miltefosine (Hexadecilfosfolina) desarrollada originalmente como un medicamento contra el cáncer y actualmente usada para tratamientos tópicos de cáncer de piel, ha mostrado que al ser utilizada en forma oral es eficaz y segura para el tratamiento de leishmaniasis visceral y la cutánea. Además, la miltefosine se ha usado con éxito en pacientes resistentes a los medicamentos antimoniales (Paris et al., 2003). Los complejos organometálicos de Pt (II) y Rh (I) los cuales también fueron evaluados inicialmente contra el cáncer han mostrado una actividad *in vitro* relativamente alta contra promastigotes y amastigotes de *Leishmania donovani* (Mesa, 1996).

A pesar de los efectos secundarios, de los fracasos terapéuticos y de la resistencia creciente a los medicamentos, no existe una terapia alternativa eficaz es por ello que es necesario la búsqueda de un nuevo agente o tratamiento contra la *Leishmania*.

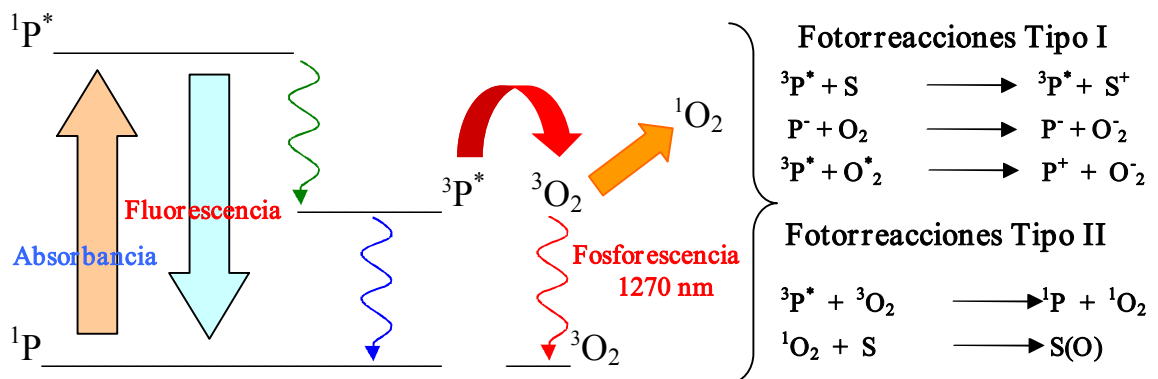
### 1.3 TERAPIA FOTODINÁMICA (TFD).

La TFD es un novedoso método utilizado para la detección y destrucción de tejidos cancerosos, en algunas enfermedades de la piel y en la destrucción de bacterias, virus y parásitos (Wainwright, 1998). Se basa en que ciertos compuestos denominados fotosensibilizadores (FS) pueden causar la destrucción selectiva de tejidos por la acción de especies reactivas del oxígeno, tales como el oxígeno singlete <sup>1</sup>O<sub>2</sub>,

radicales hidróxilo  $\cdot\text{OH}$ , el anión radical superóxido  $\text{O}_2^{\cdot-}$ , y el peróxido de hidrógeno  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Estas especies son generadas por la interacción entre el oxígeno molecular o un sustrato orgánico con el FS excitado por radiación visible (Hansan et al., 1999).

La radiación visible empleada en la TFD para la excitación de los FS, cubre un limitado rango de longitudes de onda ( $\lambda$  entre 400 y 700 nm), y es la porción roja del espectro electromagnético la que tiene mayor utilidad en la TFD, por cuanto esta puede penetrar la piel con mayor profundidad (Macdonald y Dougherty, 2001).

**Figura 2.** Fotorreacciones tipo I y II presentes en la terapia fotodinámica.



\*  ${}^1\text{P}$  es el fotosensibilizador en estado basal singulete,  ${}^3\text{P}^*$  es el fotosensibilizador en estado excitado triplete, S es la molécula de sustrato,  $\text{P}^-$  es la molécula de fotosensibilizador reducida,  $\text{S}^+$  es la molécula de sustrato oxidada.

**1.3.1 Mecanismos fotoquímicos presentes en la TFD.** El proceso de generación de las especies oxidantes se inicia cuando el FS es irradiado con luz visible de una longitud de onda apropiada. Esta radiación excita al cromóforo o FS hasta el estado

singulete excitado (identificado como  $^1P^*$  en la Figura 2) el cual puede relajarse por dos vías: (i) por emisión de un fotón fluorescente que regresa el FS hasta el estado fundamental y (ii) pasar al estado excitado triplete ( $^3P^+$ ) por cruzamiento inter-sistema. Se han propuesto dos mecanismos de reacción en la TFD denominados fotorreacciones tipo I y tipo II, en los cuales el FS en se encuentra en el estado triplete excitado (Figura 2). La presencia de uno u otro mecanismo depende de la concentración de oxígeno en los tejidos y del tiempo de vida media de FS en el estado triplete excitado (Wainwright, 1998).

Las fotorreacciones tipo I se caracterizan porque ocurren en células con concentraciones de oxígeno relativamente bajas o en ambientes más polares (Sharman et al., 1999). En este caso el FS en su estado triplete excitado puede transferirle un electrón a los sustratos orgánicos (S) produciendo su oxidación ( $S^+$ ) y la formación del FS reducido ( $P^-$ ). Este último tiene la capacidad de reaccionar con oxígeno molecular para producir aniones superóxido ( $O_2^-$ ). En este tipo de fotorreacciones el anión radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) también puede generarse por la interacción entre el FS en estado triplete excitado y un radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ). Las fotorreacciones tipo I se caracterizan por la generación de radicales libres ya sea del sustrato ( $S^*$ ) o del FS ( $P^*$ ) que pueden en principio inducir una cascada peroxidativa (Sharman et al., 1999).

Las fotorreacciones tipo II ocurren en ambientes más oxigenados, en este caso el FS en estado triplete excitado, fácilmente transfiere su energía al oxígeno molecular en estado basal ( $^3O_2$ ), transformándolo en oxígeno singulete ( $^1O_2$ ). Esta especie es considerada en TFD como la principal responsable de la oxidación de sustratos orgánicos (S), principalmente lípidos, causando la destrucción de los tejidos celulares (Macdonald y Dougherty, 2001).

El fotosensibilizador en estado triplete excitado puede relajarse al estado basal sin intervenir en ninguno de los dos tipos de fotorreacciones, este proceso está acompañado por la emisión de un fotón fosforescente.

El tipo de muerte celular en la TFD dependiendo en gran medida de la localización del fotosensibilizador en la célula. Los FS localizados en los lisosomas y en las membranas celulares inducen necrosis (involucra procesos inflamatorios) y los FS localizados en la mitocondria inducen muerte celular por apoptosis (Belichenco et al, 2001; Chiu et al, 2001; Hieh et al, 2003).

**1.3.2 Mecanismos de fotooxidación de las membranas lipídicas en la TFD.** La química de la fotooxidación de lípidos, de forma similar a los procesos fotodinámicos, puede ser clasificada como tipo I o tipo II. En el primer caso los responsables de la oxidación lipídica son los radicales libres formados en las fotorreacciones tipo I y en el segundo caso el responsable es el oxígeno singlete generado en las fotorreacciones tipo II. La presencia de los hidroperóxidos lipídicos en las membranas celulares induce la formación de defectos estructurales y canales en las bicapas lo que puede llegar a ocasionar un incremento de la permeabilidad de los iones  $H^+$ ,  $OH^-$ , induciendo una disminución del potencial eléctrico. En las membranas celulares, además de estos efectos se puede presentar la oxidación de los grupos S-H de las proteínas que actúan como bombas de calcio, dando como resultado un incremento intracelular de iones  $Ca^{2+}$ ; finalmente se presenta la muerte de las células por efecto de la lisis (Vladimirov et al., 2004).

Los principales intermediarios o productos de la fotooxidación de las membranas lipídicas son los hidroperóxidos de los fosfolípidos (LOOHs) e hidroperóxidos del colesterol (COOHs). La identificación de estos compuestos nos permiten determinar cual especie reactiva del oxígeno o cual fotorreacción está involucrada la TFD (Girotti, 2001).

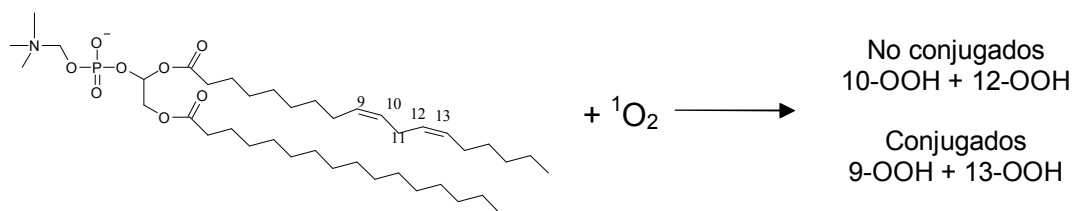
La fotooxidación de lípidos tipo I son reacciones radicalarias. Se inicia cuando el OH\* retira un hidrógeno alílico de un lípido insaturado (LH) como se aprecia en la ecuación (1). Las ecuaciones (2) y (3) corresponden a los pasos de propagación y finalización de la reacción. En el caso particular de los fosfolípidos este hidrógeno proviene del grupo acilo sn-2, mientras que para el colesterol el hidrógeno corresponde al carbono 7.



Para el caso de la fotooxidación de lípidos tipo II, el  ${}^1O_2$  reacciona con los grupos acilo sn-2 y con el colesterol para dar pocos hidroperóxidos.

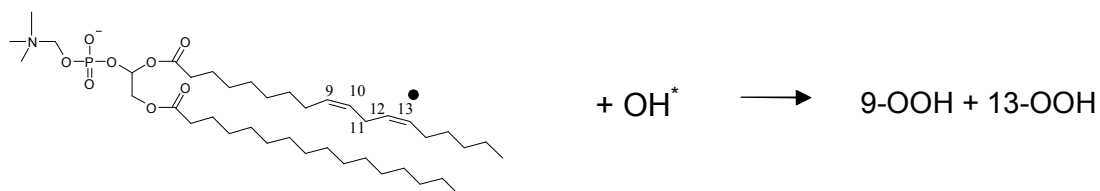


Por ejemplo, el 1-palmitoil-2-linoleil-sn-glicero-3-fosfocolina al ser atacado por el oxígeno singulete genera cuatro hidroperóxidos, dos de los cuales (10-OOH y el 12-OOH) son específicos para esta especie y nos permiten confirmar la presencia de fotorreacciones tipo II, como se aprecia en la siguiente ecuación.

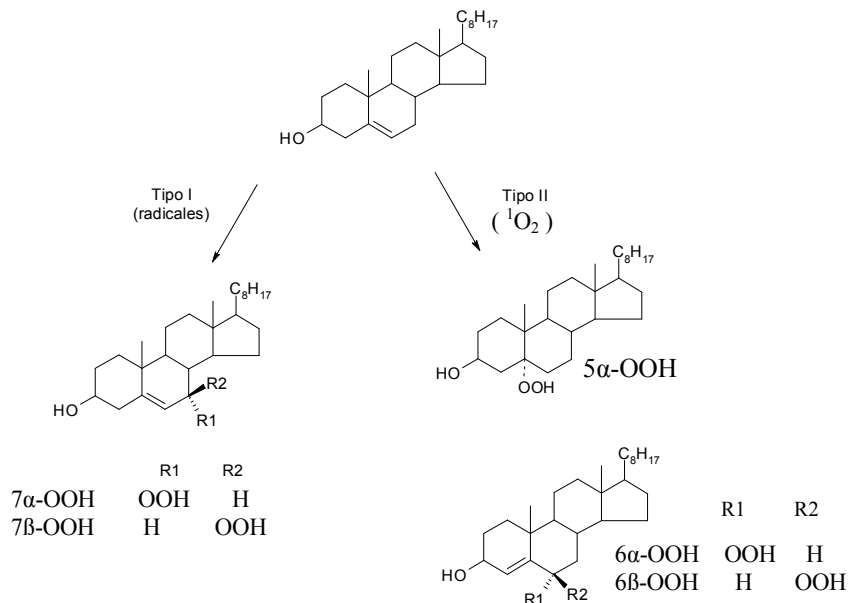


La reacción por radicales para este mismo fosfolípido genera sólo dos hidroperóxidos el 9-OOH y el 13-OOH, lamentablemente su identificación no nos permite confirmar la presencia de las fotorreacciones tipo I. En la siguiente ecuación química se

aprecian los productos obtenidos en las fotorreacciones tipo I para el 1-palmitoil-2-linoleil-sn-glicero-3-fosfolina.



Los productos obtenidos de la reacción entre el colesterol y el oxígeno singlete o con radicales pueden ser utilizados para determinar el tipo de fotorreacción presente. Por ejemplo, la detección del 5 $\alpha$ -OOH confirma la presencia de la especie  $^1\text{O}_2$  como se muestra en la siguiente reacción (Cheien et al., 2002; Caruso et al., 1996; Kulig y Smith, 1973; Ubhayasekera et al., 2004; Chien et al., 2004)



En la oxidación del colesterol por radicales se obtienen dos productos el 7 $\alpha$  y  $\beta$ -OOH (reacciones tipo I), y cuando esta oxidación se lleva a cabo por efecto del oxígeno

singulete se obtienen los mismos hidroperóxidos obtenidos en las reacciones tipo I y el  $5\alpha$ -OOH el cual es específico para la especie  $^1\text{O}_2$ .

La identificación del **hidroperóxido** de colesterol  $5\alpha$ -OOH, es confirmatorio de la presencia del  $^1\text{O}_2$ , como se precia en la siguiente reacción.

**1.3.3 Fotosensibilizadores (FS) empleados en la terapia fotodinámica.** La selectividad dual de la TFD ha mostrado que este es un tratamiento propicio para la destrucción de células cancerígenas, de virus, bacterias y parásitos (Wainwright, 1998). Esta selectividad se logra porque la irradiación se limita al área que se desea destruir y porque los tejidos enfermos poseen alta afinidad por los FS (Kimel et al., 2000).

Los fotosensibilizadores se han clasificado como FS de primera y segunda generación (Ver Apéndice 4). En la primera categoría se encuentran las porfirinas y sus derivados, cuya principal desventaja para ser usados en la TFD es que la máxima absorción de estos compuestos ocurre a longitudes de onda menores de 650 nm, lo cual impide una mayor penetración de esta radiación en los tejidos (Kimel et al., 2000). El fotofrin®, es el derivado hematoporfirinico comercial más importante en el tratamiento contra el cáncer. Ha sido aprobado como FS en el tratamiento de cáncer de esófago y endobronquial en varios países (Chwilkowska et al; 2003; Hsieh et al., 2003; Bellnier et al., 1997).

El protoporfirinogeno IX (Pp IX) es una porfirina perteneciente a los FS de la primera generación. Es generado dentro de la célula en la biosíntesis del grupo hemo a partir del ácido 5-aminolevulinico ALA (Hornung et al, 1999; Weiss et al., 2003; Scarmato et al., 2003). Recientemente se ha inducido su formación y acumulación con ayuda de el ALA y una enzima que inhibe la ferroquelatasa, esta enzima se encarga de incorporar el hierro al Pp IX para formar el grupo hemo (Bhasin et al., 2002)

Los fotosensibilizadores de segunda generación poseen ciertas ventajas sobre los derivados hematoporfirínicos ya que absorben a longitudes de onda mayores. Esto permite que sean utilizados para tratar células cancerígenas que se encuentran a una mayor profundidad de la piel, además estos FS se eliminan fácilmente del organismo, lo cual evita la sensibilización de los pacientes por largos periodos de tiempo (Macdonald y Dougherty., 2001).

Las clorinas son FS de segunda generación los cuales han mostrado una alta actividad fotocitotóxica *in vitro*. Por ejemplo la meta-tetra (hidroxifenil) clorina ha mostrado una alta actividad contra células de cáncer HT 29 (Bourdon et al, 2000) y la clorina E6 ha sido evaluada con éxito en células resistentes a múltiples drogas contra el cáncer (Merlin et al., 2002).

Otro grupo de FS pertenecientes a la segunda generación son las ftalocianinas (Pc), las cuales satisfacen la mayoría de los requerimientos que debe tener un FS para ser utilizados en la TFD. Las ftalocianinas se caracterizan por: (i) poseer un pico de máxima absorción en la parte roja del espectro electromagnético, (ii) poseen baja toxicidad y alta selectividad y (iii) se pueden obtener altamente puras. Otra ventaja de las Pc es que sus propiedades fisicoquímicas pueden ser modificadas por varias vías, entre ellas, por la inclusión de un metal central apropiado, por la inclusión de grupos funcionales en la periferia y por la inclusión de grupos funcionales en la posición axial. Esta particularidad solo se puede realizar en las Pc que contienen metales del grupo IV (silicio y germanio) las cuales poseen una alta eficiencia cuántica para la generación del estado triplete excitado. (Waszkowiak et al., 2002).

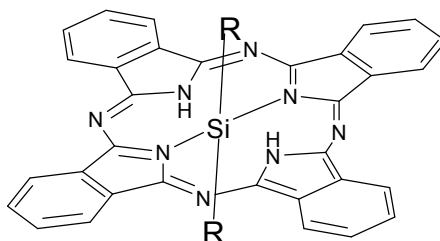
Algunas Pc de aluminio y zinc han mostrado un interesante efecto fotocitotóxico, (Lukyanets et al., 1999; Leznoff et al., 1989; Decreau et al., 1999) en comparación con el fotofrin. Este aspecto está relacionado con la mayor absorción molar que poseen las Pc a radiaciones cercanas a los 700 nm (Gao et al., 2001; Kharisov et al., 2004; Maree et al., 2001; Kassab et al., 2000). También se ha observado que las Ft

solo requieren una tercera parte del oxígeno (~10 mmHg) del requerido por los derivados hematoporfirínicos, para obtener una eficiencia cuántica similar a las porfirinas (Leznoff et al., 1989).

#### 1.4 FTALOCIANINAS DE SILICIO (PcSi)

Las PcSi presentan la característica especial de llevar uniones axiales (Si-R, Ver Figura 3), perpendiculares a las uniones planares del silicio con los cuatro nitrógenos del macrociclo de la Pc donde el silicio presenta estructura octaédrica (Benar, 1979). Las PcSi han mostrado muy buenos resultados en la TFD para destruir células de cáncer, ejemplo de ello es la denominada Pc4 (Esposito et al., 1978). Esta PcSi tiene la capacidad de localizarse en las mitocondrias (posiblemente por su carácter anfifílico), e inducir muerte celular por apoptosis posiblemente por la liberación del citocromo c desde la mitocondria al citosol, lo que ocasiona la inhibición de la respiración celular (Varnes et al., 1999; Chiu et al., 2001; Belichenco et al., 2001; Nagy et al., 2000; Reddan et al., 1999). Algunas PcSi dicationicas se han utilizado en complejos con suero bovino fetal para incrementar su actividad en células tumorales (Huang et al., 2003)

**Figura 3.** Estructura de las ftalocianinas de silicio sustituidas axialmente.



\* El grupo axial R puede ser uno de los siguientes grupos: alquilo, arilo, alcóxido, acilo, siloxilo, halógenos e hidróxilo.

En esta investigación se emplearon las PcSi por su alta estabilidad térmica y química e interesantes propiedades ópticas principalmente porque absorben a longitudes de onda cercanas a los 700 nm. Además, los grupos tri-n hexilsiloxido axiales, de una de la PcSi utilizada, evitan que en solución formen agregados que desactivan rápidamente el estado triplete de la Pc (Leznoff et al., 1989).

El principal inconveniente de las PcSi es su alta hidrofobicidad, inducida por el anillo ftalocianinico lo cual impide que estos FS puedan ser utilizadas directamente en los cultivos celulares, haciendo necesario el uso de solventes orgánicos o sistemas transportadores. Esta falta de solubilidad se ha resuelto con la incorporación de grupos altamente hidrófilos tales como (COO<sup>-</sup>, SO<sub>3</sub><sup>-</sup>) en la periferia del anillo. Esta estrategia aunque permite su administración directa al torrente sanguíneo, disminuye su incorporación en las células porque se reduce la afinidad de la Pc por las membranas de las células (Kimel et al., 2000).

Estos inconvenientes han sido resueltos con la utilización de liposomas como transportadores de estas Pc. Estos transportadores además de permitir la solubilidad de las Pc en solventes acuosos, ha incrementado la absorción de las Pc en las células enfermas ocasionando una mayor actividad fototóxica. (Whorle et al., 1999; Decreau et al., 1999). En esta investigación se utilizaron liposomas de fosfatidilcolina y colesterol para incrementar la solubilidad de las PcSi y para dirigir estas a los fagolisosomas donde se encuentran los parásitos de *Leishmania*.

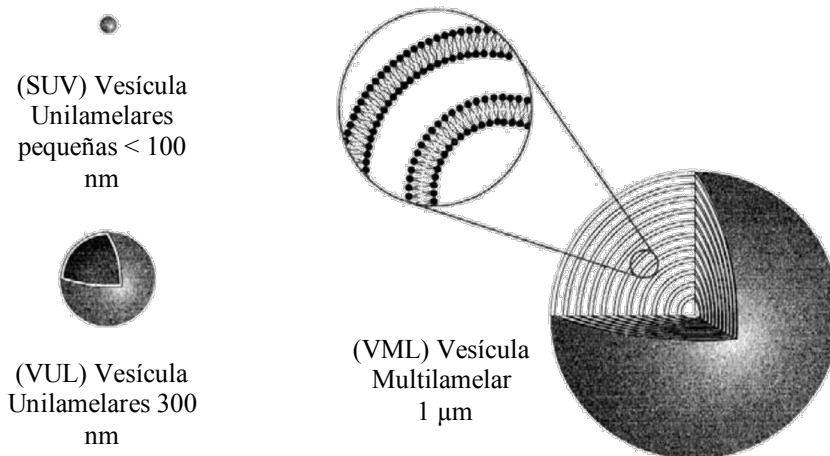
## 1.5 LIPOSOMAS

**1.5.1 Generalidades.** Los liposomas son partículas esféricas de tamaño nanométrico, constituidas por una o más bicapas de lípidos, principalmente fosfolípidos y colesterol. Estas bicapas de lípidos encierran en su interior una fase acuosa. Debido a

este carácter anfipático se pueden incorporar sustancias hidrófobas entre sus bicapas lipídicas y sustancias hidrófilas en la fase acuosa. (Metselaar et al., 2003).

Dependiendo del número de bicapas lipídicas (lamelas) los liposomas se clasifican en vesículas multilamelares (VML) y vesículas unilamelares (VUL) (Ver Figura 4). Las VML poseen tamaños de partícula entre 350-1000 nm y están formados por un compartimiento acuoso central y varios interlamelares así como un número variable de bicapas.

**Figura 4.** Clasificación de los liposomas según su lamelaredad y tamaño.



Las VUL están formadas por una bicapa que engloba un compartimiento acuoso, las cuales dependiendo de su tamaño se subdividen en vesículas unilamelares pequeñas (SUV) con tamaños entre 25-50 nm y las vesículas unilamelares grandes con tamaños que van de 50-250 nm. (Ver Figura 4): Las VUL que miden alrededor de los 100 nm son frecuentemente usadas como transportadores de medicamentos debido a su mejor distribución en el organismo (Hope et al., 1986; Sulkowski et al., 2005). Las VML se obtienen por hidratación de una película lipídica y las VUL se obtienen por ruptura mediante radiación ultrasónica o por extrusión y reacomodación de las membranas de

las VML (MacDonald et al., 1990). Las propiedades de los liposomas y su aplicación en el área médica dependen de las características de los lípidos que componen la membrana (Sulkowski et al., 2005).

Los medicamentos contenidos en los liposomas deben liberarse en respuesta a un estímulo específico del sitio donde se quiere dirigir los compuestos activos. Las estrategias desarrolladas para inducir la ruptura de los liposomas y la liberación de los componentes activos que ellos transportan incluye: formación de defectos y canales en las bicapas lipídicas, transición de la fase lamelar a micelar o a hexagonal y separación de las fases lipídicas y la fusión liposomal.

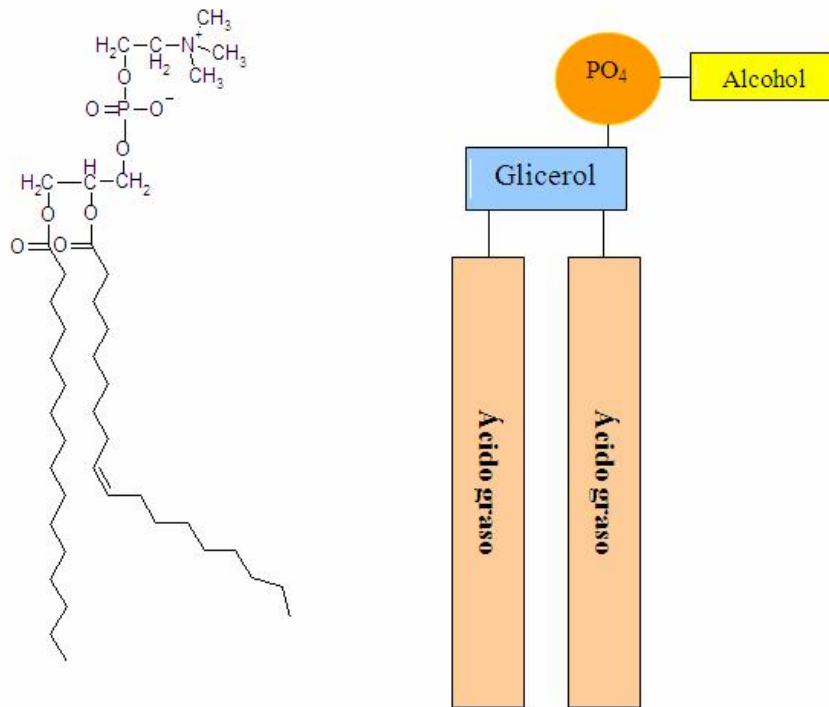
Los estímulos que inducen la liberación de los medicamentos desde los liposomas pueden ser externos tales como calor o luz o ser estímulos biológicos tales como cambio de pH, ruptura por enzimas o cambio del potencial redox. Finalmente los componentes químicos que responden a estos estímulos e inducen la ruptura de los liposomas incluyen: lípidos ionizables, lípidos con una temperatura de transición de fase deseada, polímeros y péptidos ionizables, detergentes ionizables, isomerización cis-trans y radicales libres generados por compuestos tales como fotosensores (Guo y Szoka, 2002).

**1.5.2 Composición química de los liposomas.** Los liposomas se preparan principalmente a partir de fosfolípidos y colesterol. Estos lípidos son biomoléculas orgánicas presentes en las membranas celulares de plantas y animales. Generalmente son insolubles en agua y muy solubles en solventes orgánicos de baja polaridad. Los fosfolípidos comúnmente usados son: fosfatidilcolina, fosfatidilserina, fosfatidilglicerol, esfingomielina, diestearoil fosfatidilcolina, dimiristoilfosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina (Konvertier, 2004).

Los fosfolípidos le dan la forma espacial de los liposomas. La parte hidrófoba la forman largas cadenas de ácidos grasos y la parte hidrófila es el extremo dipolar

iónico (el grupo fosfato sustituido) (Ver Figura 5). Estas moléculas en soluciones acuosas tienden a formar capas dobles, para ello se alinean dos hileras de moléculas, la parte posterior con la parte posterior, con sus extremos polares proyectándose hacia el agua de las dos superficies de la capa doble. El grueso de la capa doble está formado por las cadenas de ácidos grasos en donde es posible disolver moléculas (medicamentos) no polares (Otake et al., 2001).

**Figura 5.** Estructura molecular de los fosfolípidos.

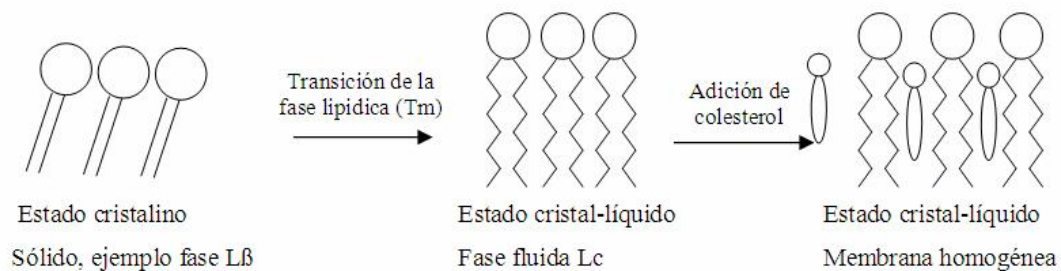


(a) Estructura molecular de la fosfatidilcolina (b) Grupos funcionales que componen los fosfolípidos.

Los fosfolípidos a menudo presentan estados intermedios entre los estados sólido y líquido conocidos como mesofases o cristales líquidos, en donde las propiedades de

los sólidos y de los líquidos son observadas. Estas mesofases son obtenidas al someter los fosfolípidos a una determinada temperatura denominada temperatura de transición (Ver Figura 6). La temperatura ocasiona la transición de la conformación cis a trans de las múltiples insaturaciones de las fracciones acílicas de la posición sn-2 de los fosfolípidos naturales (Konvertiert, 2004).

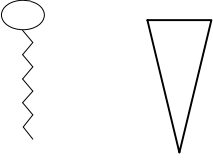
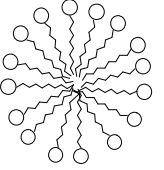
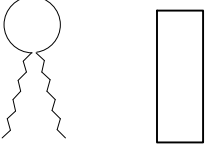
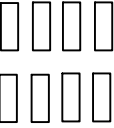
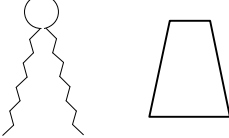
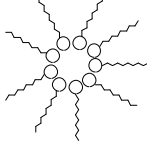
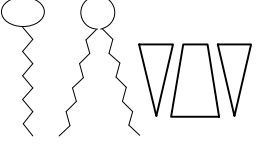
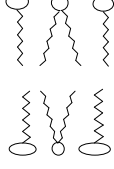
**Figura 6.** Estructuras teóricas de los estados que pueden presentar los fosfolípidos.



Los requerimientos espaciales del estado cristal-líquido son mayores que en el estado sólido (Konvertier, 2004). Al hidratar los fosfolípidos en su estado cristal-líquido se forman diversos arreglos tridimensionales (mezcla de fosfolípidos y agua) cada uno con una fase característica. Estos arreglos se pueden explicar a partir de un simple modelo el cual se fundamenta en la “forma teórica de los fosfolípidos” y a la facilidad que estos poseen para agruparse ordenadamente en el espacio, como se aprecia en la tabla 1.

El colesterol es un esteroide con un núcleo cíclico semejante al del fenantreno, al cual se le une un anillo ciclopentano. Este lípido tiene la capacidad de conferirle mayor estabilidad a los liposomas porque permite un mejor acomodamiento de los fosfolípidos en la bicapa (Ver Figura5). Esta estabilidad impide el intercambio lipídico entre los liposomas y hace menos fluida las membranas liposomales (Sulkowski et al., 2005; Gelabert y Díaz, 2001).

**Tabla 1.** Estructuras espaciales teóricas de los lípidos en la fase de cristal-líquido.

Lípido	Forma	Organización	Fase
Lisofosfolípidos			Isotropita Hexagonal I
Fosfatidilcolina -Serina -Inositol			Lamelar Cúbica
Fosfatidiletanolamina Ácido fosfatídico Colesterol			Miscelas invertidas Hexagonal II
Mezclas de lisofosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina			Lamelar

\* Organización y fase de las vesículas que se forman al ser hidratados

**1.5.3 Utilización de los liposomas como transportadores de medicamentos.** Los liposomas han sido utilizados como transportadores de medicamentos por su capacidad de interactuar fácilmente con diversos tipos de células. Esta interacción puede ocurrir por: adsorción, fusión, transferencia lipídica o por contacto célula-liposoma. Se pueden diseñar liposomas específicos para cierto tipo de células (Gelabert y Díaz, 2001). Por ejemplo, liposomas preparados con tamaños superiores a 10 nm, podrían llegar a los tejidos enfermos (tejidos neoplásicos), que por lo general presenta poros entre 100-1000 nm y no a tejidos sanos que en su microvasculatura presentan tamaños menores a 10 nm (Romero et al., 1999).

La mayoría de los tratamientos con medicamentos liposomales presentan una mayor especificidad, mayor índice terapéutico porque se disminuye la toxicidad asociada con la no especificidad de la distribución de los medicamentos y aumenta la localización del medicamento en los tejidos enfermos (Papahadjopoulos, 1999).

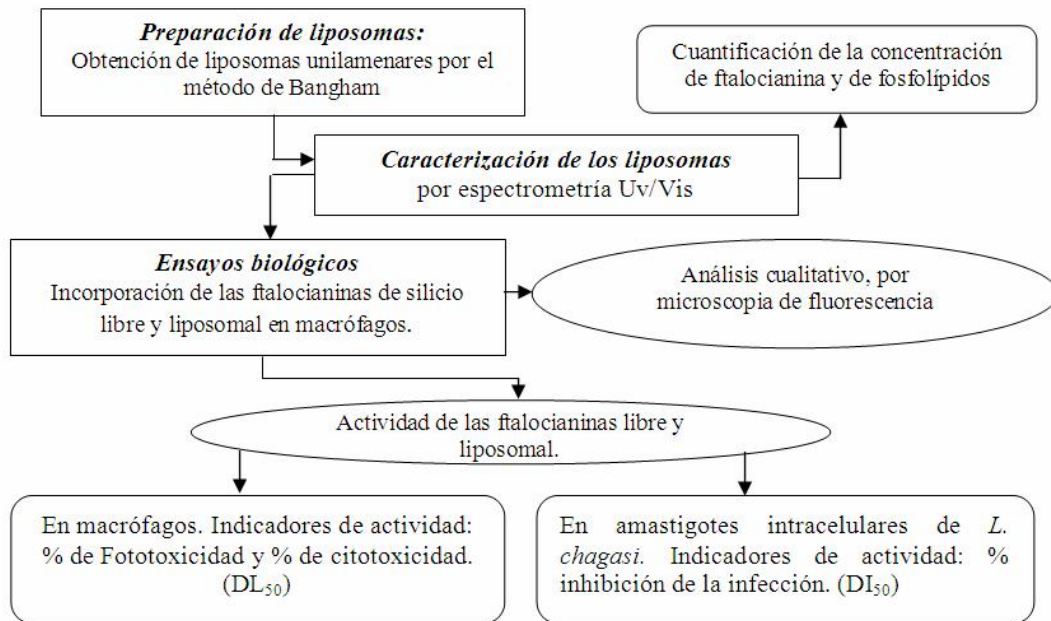
En recientes investigaciones se han evaluado la actividad de un gran número de estructuras moleculares encapsuladas en liposomas sobre diversas enfermedades. Los liposomas sensibles al pH son utilizados frecuentemente como transportadores de material genético, por ejemplo se han encapsulado agentes antivirales en este tipo de liposomas para afectar la replicación de HIV en macrófagos (Duzgunes et al., 2005), también como transportadores de material genético contra algunos tipos de cáncer (Dutour et al., 2004). También han sido utilizados en el transporte de ciertos esteroides liposomales en el tratamiento contra el asma (Konduri, 2005), como transportadores de anestésicos opiodes (Rose et al., 2005), como transportadores de antibióticos (Salem et al., 2005), en el transporte de aminas usadas como antidepresivos (Ahyayauch et al., 2004), en el transporte de beznidazol contra la enfermedad de Chagas (Morilla et al, 2005), en el transporte de antioxidantes como la superóxido dismutasa en el tratamiento contra la artritis (Cruz et al; 2005) y en algunas aplicaciones cosméticas y dermatológicas (Foco et al., 2005; Betz et al., 2005; Sinico et al; 2005).

El uso de liposomas ha permitido obtener excelentes resultados de incorporación de los FS en las células y se ha observado un incremento considerable de la actividad contra células cancerígenas (Scarmato et al., 2000; Igarashi et al., 2003). Las formulaciones liposomales no afectan la presencia de uno u otro tipo de fotorreacción en la TFD y en algunas investigaciones en las que se utilizan los liposomas para incrementar la incorporación de estos FS en células se ha logrado detectar la generación de oxígeno singulete (Baier et al; 2004; Heyne et al; 2005).

## 2. METODOLOGÍA

Para el desarrollo de esta investigación seguimos el orden establecido en el diagrama de flujo de la Figura 7. La etapa inicial consistió en la estandarización del método modificado de Bangham (Otake, 2001), para preparar las ftalocianinas liposomales. Estas formulaciones luego fueron caracterizadas por espectrometría ultravioleta visible. Posteriormente se determinaron importantes características biológicas como su incorporación en células de mamífero y en células infectadas con amastigotes intracelulares de *L. chagasi*.

**Figura 7.** Diagrama de flujo de las etapas principales realizadas en esta investigación.



Finalmente se evaluó la actividad fototóxica *in vitro* de estos compuestos en células y amastigotes intracelulares de *L. chagasi*. La actividad que presentaron las PcSi liposomales fue comparada con las PcSi libres.

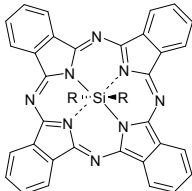
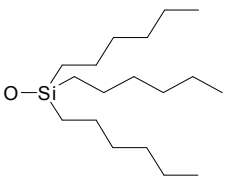
## 2.1 MATERIALES

**2.1.1 Parásitos.** Se utilizó una cepa de referencia de *Leishmania chagasi* (HOM/BR/74/PP75). Los promastigotes fueron cultivados en medio RPMI 1640 (Gibco) con 20 % de suero bovino fetal inactivado (SBFi) a 27 °C.

**2.1.2 Células.** Se utilizó una línea celular de monocitos tumorales humanos THP-1 (ATCC). Estas células fueron mantenidas en medio RPMI con 20 % de SBFi a 37 °C y una atmósfera que contiene 5 % de CO<sub>2</sub> y 95 % de humedad. Las células fueron transformadas a macrófagos con forbol miristato acetato (PMA, Sigma).

**2.1.3 Fotosensibilizadores.** Se emplearon las siguientes ftalocianinas de silicio (PcSi): (i) bis (cloro) ftalocianina de silicio [PcSiCl<sub>2</sub>] disuelta en dimetilformamida (DMF) y (ii) bis(Tri-n-hexilsiloxido) ftalocianina de silicio [TriHex] disuelta en tetrahidrofurano (THF). Para los ensayos de fotocitotoxicidad se utilizó una concentración máxima de la ftalocianina igual a 10x10<sup>-6</sup> M, para ello las soluciones se diluyeron en medio de cultivo celular (RPMI 1640) teniendo en cuenta que el volumen de solvente orgánico no excediera a 0.5 % v/v. Estas Pc fueron adquiridas comercialmente (Sigma-Aldrich) y denominadas en este trabajo como ftalocianinas libres. Los nombres, los grupos axiales unidos al átomo de silicio central y las propiedades físicas más relevantes para las dos ftalocianinas utilizadas se pueden apreciar en la tabla 2.

**Tabla 2.** Formulaciones de las ftalocianinas de silicio libres utilizadas.

Ftalocianinas de silicio		
		
Nombres de la ftalocianina	Grupo sustituyente representados por R	Propiedades físicas y solvente utilizado
Bis(Tri-n-hexilsiloxi)silico ftalocianina		$\lambda_{\max} = 669 \text{ nm}$ $\epsilon \approx 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ Tetrahidrofurano (THF)
Bis(cloro) silico ftalocianina	$\text{Cl}_2$	$\lambda_{\max} = 673$ $\epsilon > 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ Dimetilformamida (DMF)

\* Abreviaciones:  $\epsilon$ : absortividad molar en solventes orgánicos, R : grupo sustituyente unido axialmente al átomo de silicio.

**2.1.4 Ftalocianinas liposomales.** Las ftalocianinas de silicio TriHex y  $\text{PcSiCl}_2$  se encapsularon en vesículas unilamelares de fosfatidilcolina (FC) y colesterol (Col), las cuales fueron denominadas en este trabajo como se describe más adelante en la tabla 3.

**2.1.5 Sistema de irradiación.** Se utilizó un sistema láser clase III b de Edmund Industrial Optics® acoplado a una fibra óptica (longitud de onda 670 nm, potencia de salida entre 0 y 300 mW).

## **2.2 PREPARACIÓN DE LAS FTALOCIANINAS DE SILICIO LIPOSOMALES.**

Se prepararon tres liposomas de igual composición lipídica, en dos de ellos fueron incorporadas las ftalocianinas de silicio y en el tercer liposoma se dejó sin ftalocianina. Este último fue utilizado como control negativo en los ensayos.

Para la preparación de los liposomas se utilizó el método de Bangham y colaboradores (Otake, 2001) con una modificación para obtener las vesículas unilamelares pequeñas (SUV). Este método consiste en dos pasos fundamentales: (i) formación de una capa lipídica y (ii) la hidratación de esta para obtener las vesículas multilaminares (VML). Luego las VML fueron modificadas a SUV por radiación ultrasónica.

La relación lipídica utilizada para la preparación de las PcSi-liposomales SUV fue establecida previamente en una serie de experimentos, en los cuales se prepararon cuatro liposomas VML, cada uno con diferente relación lipídica. A estos liposomas se les evaluó la cantidad de PcSi incorporada y su actividad fotocitotóxica en células THP-1. En estos experimentos se pudo determinar que las VML que presentaron mayor incorporación de la ftalocianina TriHex y mayor actividad fototóxica en células THP-1 fueron las que se prepararon con la siguiente composición lipídica: colesterol 38% y fosfatidilcolina 62%. Por tal razón las demás formulaciones liposomales de las ftalocianinas de silicio se prepararon con el mismo porcentaje lipídico

El procedimiento para la obtención de las SUV se inició con la preparación de los stocks de lípidos y ftalocianinas. Para ello se preparó una solución de colesterol y de fosfatidilcolina ambas a una concentración de 10  $\mu\text{mol/mL}$  utilizando cloroformo:metanol (90:10 v/v) como solvente. Debido a que la fosfatidilcolina posee alrededor de 35 % de impurezas, se eliminó el mayor porcentaje de estos con varios lavados con acetona como se indica en el apéndice 2. Las PcSi, TriHex y PcSiCl<sub>2</sub> fueron disueltas en tetrahidrofurano y diclorometano respectivamente a una concentración de  $2 \times 10^{-3}$  M.

Para formar la capa lipídica se depositaron en un balón fondo redondo 14.95  $\mu\text{mol}$  de colesterol, 24.38  $\mu\text{mol}$  de fosfatidilcolina y 0.67  $\mu\text{mol}$  de PcSi (la relación molar lípido: ftalocianina fue 59:1). El solvente fue retirado a 40°C en un roto-evaporador a una velocidad de rotación 140 revoluciones por minuto, durante 40 minutos. La capa lipídica fue hidratada con 4 mL de una solución tamponada de Tris base 10 mM (0.9 % p/v de NaCl y pH 7.4) durante 15 minutos, utilizando agitación magnética y esferas de vidrio (5-6 esferas) para facilitar la hidratación.

Los liposomas SUV fueron obtenidos a partir de los liposomas VML dejando estas últimas en ultrasonido durante 20 minutos a 40 °C. Posteriormente, el compuesto activo que no fue encapsulado por los liposomas SUV fue separado por precipitación en una centrifuga a 1200 revoluciones por minuto y 4 °C. En el sobrenadante permanecieron las SUV porque su masa es tan pequeña no precipitan al centrifugar la suspensión. Todos los liposomas obtenidos se depositaron en frascos ámbar y se almacenaron a 4°C.

## 2.3 CARACTERIZACIÓN DE LOS LIPOSOMAS

La caracterización de los liposomas se llevó a cabo por espectrometría ultravioleta-visible para determinar principalmente la concentración de fosfolípidos y de ftalocianina. Igualmente se determinó su estabilidad en el tiempo de almacenamiento.

**2.3.1 Determinación de la concentración de los fosfolípidos.** La cuantificación de los fosfolípidos se realizó por el micrométodo de Bartlett (Botcher, 1961), el cual consiste en la reacción del molibdeno (Mo) con los aniones fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$  de los fosfolípidos) para formar heteropoliácidos que a su vez reaccionan en medio ácido con iones tartrato y amonio, formando el molibdofosfato de amonio de coloración azul, el cual puede ser cuantificado por espectrometría a 818 nm.

Para los ensayos se preparó una solución de fosfatos (32 nmol de  $\text{NaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ /mL de agua) y se elaboró una curva de calibración preparando cinco concentraciones diferentes de fosfato en el rango 10-50 nmol, adicionando los volúmenes correspondientes en tubos de ensayo. Luego, se adicionó 0.2 mL de ácido perclórico tanto a los tubos que contenían los puntos de la curva como a las muestras (2-5  $\mu\text{L}$ ) de los liposomas y se calentó durante 30 minutos a una temperatura entre 180-190°C. Posteriormente, se dejó enfriar a temperatura ambiente y se adicionó 2 mL del reactivo de molibdatos y 0.25 mL de ácido ascórbico al 10 %. Finalmente, la solución de los tubos se homogenizó y se calentó en baño María durante 10 minutos, luego de los cuales fueron enfriados con agua. Se midió la absorbancia de la solución a 818 nm. La curva de fosfatos utilizada para la cuantificación de fosfolípidos se encuentra en el apéndice 1.

**2.3.2 Determinación de la concentración de ftalocianina.** Para cuantificar la concentración de PcSi en la solución liposomal se elaboró una curva de calibración que consistió en la preparación de cinco patrones de cada uno de éstos

fotosensibilizadores en un rango de concentración entre  $2.25 \times 10^{-8}$  a  $8.80 \times 10^{-7}$  M para el caso de la TriHex y de  $3.57 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-5}$  M para la PcSiCl<sub>2</sub>. A cada patrón de TriHex, se adicionaron 192  $\mu$ L de la suspensión liposomal sin ftalocianina (BPC) y 253  $\mu$ L de BPC a cada patrón de PcSiCl<sub>2</sub>. Este volumen de BPC permitió restar el efecto de los lípidos sobre la lectura de la absorbancia a 670 nm en cada muestra (Ver Apéndice 3). Cada patrón fue preparado por triplicado.

Para determinar la concentración molar de la ftalocianina en las suspensiones liposomales se depositó de 80 a 100  $\mu$ L de muestra en un tubo de 2 mL y se aforó con THF o DMF dependiendo de la ftalocianina. Este procedimiento se realizó por triplicado. Para la lectura de la absorbancia se utilizó un espectrómetro ultravioleta visible Hewlett Packard 8453.

La estabilidad en el tiempo de las formulaciones liposomales de las PcSi se evaluó por espectrofotometría ultravioleta visible. Se tomaron dos espectros, uno de ellos al preparar estas formulaciones y otra al finalizar los ensayos de fototóxicidad (1-2 meses). Se analizó el corrimiento de la banda Q de los espectros ultravioleta visible de las formulaciones libres para determinar si había formación de agregados cuando se disolvía la solución orgánica de la ftalocianina en medio RPMI 1640.

**2.3.3 Evaluación de la contaminación de las formulaciones liposomales.** Para determinar si las suspensiones liposomales estaban libres de patógenos, entre 10 y 20  $\mu$ L de la suspensión fueron adicionados a 2 mL de medio de cultivo RPMI 1640 con suero bovino fetal al 20 % y se incubaron 8 días. Luego una fracción de esta se observó al microscopio entre lámina y laminilla en busca de hongos o bacterias.

## 2.4 INCORPORACIÓN DE LAS FTALOCIANINA LIPOSOMALES EN CÉLULAS THP-1.

Este experimento se realizó para comprobar si las formulaciones de las PcSi tenían la capacidad de incorporarse en las células THP-1

Para éste ensayo se depositaron 100  $\mu\text{L}$  de una suspensión que contenía una concentración 800.000 células/mL en una placa de 16 pozos (Lab-Tek<sup>®</sup>). Las células fueron transformadas a macrófagos adherentes adicionando 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI con forbol miristato acetato (PMA) al 10 %. Las células fueron incubadas durante 48 horas en una atmósfera que contiene 5 % de  $\text{CO}_2$  a 37 °C. Finalizado este tiempo el medio de cultivo fue retirado completamente de todos los pozos y se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de las formulaciones de las ftalocianinas de silicio. Las concentraciones que se evaluaron fueron las siguientes, para las PcSi liposomales 15, 20 y 30  $\mu\text{M}$  y para las PcSi libres 20, 30 y 40  $\mu\text{M}$ , cada concentración se evaluó por triplicado. Las células con las ftalocianinas se dejaron incubando durante 15 minutos y luego se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI 1640 con SBFi al 20 %. En cada placa se dejaron dos pozos como controles, a uno de ellos se le adiciona liposomas que no contienen la ftalocianina y el otro pozo solo debe contener las células. Las placas fueron incubadas 24 horas a 37 °C y 5% de  $\text{CO}_2$ . Luego se retiró el medio, se lavó tres veces cada pozo con 200  $\mu\text{L}$  de PBS estéril y se secaron a 37 °C durante 20 minutos. Se determinó cualitativamente la incorporación de la ftalocianina por comparación con los controles, la fluorescencia de coloración roja de la ftalocianina incorporada es observada cuando las células son iluminadas con radiación ultravioleta con ayuda de un microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E-400 con filtro de excitación UV2A ( $\lambda_{\text{Exc.}} = 330\text{-}380\text{nm}$ ).

## 2.5 DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS FTALOCIANINAS DE SILICIO EN CÉLULAS THP-1.

En estos ensayos se determinó la toxicidad de las PcSi liposomales y PcSi libres en función de su concentración en condiciones de oscuridad (citotoxicidad) o previa irradiación con luz visible (fototoxicidad). Primero se estableció el rango de concentraciones de toxicidad de los compuestos sin luz y después se evaluó el efecto fototóxico de estos compuesto (con luz) para obtener los valores del porcentaje de fototoxicidad corregido o real

Para estos ensayos, se colocaron 100  $\mu\text{L}$  de células THP-1 (800.000 células/mL) en dos cajas de 96 pozos fondo plano y 100  $\mu\text{L}$  de RPMI 1640 con 10% SBFi y 2 % de PMA. Las células fueron incubadas en una atmósfera de 5 % de  $\text{CO}_2$  a 37 °C por 72 horas para transformar y adherir las células al fondo de los pozos. Al terminar este tiempo, todo el medio fue retirado y cada pozo fue lavado con 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Luego se adicionaron 100  $\mu\text{L}$  de los fotosensibilizadores (concentraciones de 0.37, 1.11, 3.33 y 10.00  $\mu\text{M}$ ; cada concentración se evaluó por triplicado) en forma de PcSi libre y PcSi-liposomal disueltos en medio RPMI 1640 libre de SBFi para facilitar la incorporación de los liposomas. Como controles algunas células se dejaron con medio RPMI 1640 libre de SBFi sin adicionar la ftalocianina. Las células fueron incubadas durante 15 minutos y luego se les adicionó 100  $\mu\text{L}$  de medio RPMI al 20 % de SBFi. Las cajas fueron incubadas nuevamente durante 24 horas. Posteriormente las células fueron lavadas tres veces con 100  $\mu\text{L}$  de PBS y fue adicionó medio fresco. Las células fueron irradiadas con una longitud de onda alrededor de 670 nm durante 76 minutos (10  $\text{J}/\text{cm}^2$ ). Una de las cajas no fue irradiada y se utilizó para determinar la toxicidad (sin luz). Al finalizar este tiempo las dos cajas se dejaron incubando durante 24 horas a 37 °C y en atmósfera con 5 % de  $\text{CO}_2$ .

Finalizado el tiempo de incubación, se determinó el porcentaje de toxicidad en las células por el método MTT. El método está basado en la capacidad que tienen las sales MTT [bromuro de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazolio] para atravesar las membranas de las células vivas, y por acción de las reductasas intracelulares y de la membrana plasmática se reducen estas sales, formando compuestos coloreados fácilmente detectables por espectrofotometría (Mosman, 1983). La magnitud de la absorbancia de estos compuestos es función del porcentaje de células vivas.

Se adicionó 20 µL de una solución de MTT de concentración 20 ng/mL a las células tratadas con las formulaciones por 4 h a 37 °C en una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. El medio de cultivo y el MTT fue retirado de los pozos por inversión y los cristales de formazán fueron disueltos con 100 µL de dimetilsulfóxido. La concentración de sales de tetrazolio se determinó por medio de un espectrofotómetro con una longitud de onda igual a 540 nm. Para calcular el porcentaje de fototoxicidad en las células que fueron irradiadas se empleó la siguiente ecuación.

$$\% \text{ Fototoxicidad} = [1 - (\text{absorbancia de las células tratadas con las PcSi e irradiadas} / \text{absorbancia de las células no tratadas con las PcSi e irradiadas})] \times 100$$

El porcentaje de fototoxicidad corresponde al % de células muertas posiblemente por acción de las especies oxidantes generadas por la ftalocianina en presencia de la radiación visible.

De forma similar, se empleó la siguiente ecuación para determinar el porcentaje de citotoxicidad en las células que no fueron irradiadas.

$$\% \text{ de Citotoxicidad} = [1 - (\text{absorbancia de las células tratadas con las PcSi no irradiadas} / \text{absorbancia de las células no tratadas con PcSi y no irradiadas})] \times 100$$

La citotoxicidad se refiere al efecto tóxico innato de la ftalocianina en las células y parásitos que no han sido irradiadas y corresponde a un indicador de la actividad de la PcSi en células THP-1. El porcentaje de citotoxicidad corresponde al porcentaje de células muertas.

Los resultado más importante en estos ensayos corresponden a los porcentajes de mortalidad celular corregida o porcentajes de fototoxicidad corregida porque estos fueron utilizados como el indicador de la actividad de las ftalocianinas en células, su valor fue calculado utilizando la siguiente formula.

$$\% \text{ Fototoxicidad corregida} = \% \text{ de Fototoxicidad} - \% \text{ de citotoxicidad.}$$

## 2.6 DETERMINACIÓN DEL EFECTO FOTOTÓXICO DE LAS FATLOCIANINAS DE SILICIO EN *LEISHMANIA*.

En este ensayo se determinó el efecto fototóxico de los FS en la infección intracelular de *L. chagasi* en macrófagos THP-1, en función de la concentración de la PcSi.

Se utilizaron tres placas de 16 pozos, en las cuales se depositaron 100 µL de una suspensión de células THP-1 a una concentración igual a 800.000 células/mL, y 100 µL de RPMI 1640 al 10 % de SBFi y 2 % de PMA. Las células fueron incubadas durante 72 horas a 37 °C y una atmósfera con 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego todo el medio fue retirado y las células fueron infectadas con parásitos a una relación célula:parásito 1:10, con promastigotes de *L. chagasi*, durante 24 horas a 37 °C y 5 % de CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo se descartó el sobrenadante y las células fueron lavadas tres veces con 100 µL de PBS.

Una de las placas se utilizó como control de infección a las 24 horas el cual debía ser mayor a 60 % para continuar los ensayos. El porcentaje de infección (porcentaje de células infectadas con amastigotes de *Leishmania*) se determinó por recuento microscópico previa fijación de las células con metanol y coloración con Giemsa. Se contó el número de células infectadas presentes en 300 células (infectadas y no infectadas) y por regla de tres se determinó el porcentaje. Se consideró como célula infectada aquella que presentaba más de un amastigote intracelular.

En las dos placas restantes, las células infectadas fueron tratadas con 100 µL de la PcSi (concentraciones de 0.12, 0.37, 1.11, 10.00 y 3.33 µM) en medio RPMI libre de SBFi, o sin PcSi (control negativo) por 24 horas a 37 °C, 5 % de CO<sub>2</sub>. Luego, se retiró el fotosensibilizador y las células se lavaron tres veces con 100 µL de PBS estéril y se adicionó 200 µL de medio RPMI 1640. Posteriormente las células fueron irradiadas con luz visible ( $\lambda = 670$  nm) durante 76 minutos (10 J/cm<sup>2</sup>). Una de las placas fue dejada sin irradiar para determinar el porcentaje de la infección en la oscuridad. Las dos placas se dejaron incubando durante 24 horas a 37 °C y atmósfera de 5 % de CO<sub>2</sub>. Finalmente, se determinó el porcentaje de infección en cada pozo de las dos placas, como se describió para la placa que se dejó como control de la infección a las 24 horas. A partir de los porcentajes de infección se calculó la inhibición del porcentaje de células infectadas con *L. chagasi* inducido por la ftalocianina sensibilizada y no sensibilizada por radiación visible mediante la siguiente ecuación.

$$\text{Inhibición de la infección} = [1 - (\% \text{ de células infectadas en cultivos con ftalocianina} / \% \text{ de células infectadas en cultivos sin ftalocianina})] \times 100$$

La inhibición de la infección parasitaria es la capacidad que tienen las PcSi de destruir los parásitos intracelulares de *Leishmania chagasi*, esta magnitud se determinó en cultivos infectados que fueron tratados con las PcSi y activados con radiación visible y en ensayos con las mismas condiciones pero sin activar la

ftalocianina con radiación. Esta inhibición de la infección debida a las PcSi activadas o no por la radiación fue utilizada como el indicador de la actividad de las ftalocianinas de silicio contra parásitos intracelulares de *Leishmania* chagasi.

## 2.7 ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Se utilizó el porcentaje de muerte de células THP-1 como el indicador de la actividad de las ftalocianinas de silicio en función de su concentración, este porcentaje de muerte celular fue denominado % de citotoxicidad para los ensayos en donde la ftalocianina no fue activada con luz visible y % de fototoxicidad en los ensayos donde fue activada la ftalocianina. Se determinaron los valores del % de muerte celular (indicador de la actividad) causado por la fototoxicidad de las PcSi libres y liposomales en células THP-1, en función de la concentración de PcSi. La potencia de de las formulaciones de las ftalocianinas de silicio contra monocitos tumorales humanos THP-1 fue obtenido de los ensayos de fototoxicidad y fue expresado como concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>). Este valor fue calculado utilizando el programa XLFIT. Este programa determinó la función que mejor se ajustó a los datos obtenidos de fototoxicidad y a partir de esta función calculó la CL<sub>50</sub>.

Todos los experimentos fueron repetidos por triplicado. El valor de la fototoxicidad utilizado para determinar los valores de la CL<sub>50</sub> corresponde al valor corregido, el cual se obtiene restando el efecto tóxico (sin luz). La fototoxicidad corregida fue determinada por triplicado para cada concentración y su valor se presentó como el promedio, con un intervalo de confianza igual a la desviación estándar entre los 3 datos obtenidos.

Finalmente, se determinaron los valores de la fototoxicidad de las PcSi libres y liposomales contra amastigotes intracelulares de *L. chagasi*, en función de la

concentración de PcSi. El indicador de la actividad de las formulaciones de las ftalocianinas de silicio contra los amastigotes intracelulares que fue utilizado corresponde al porcentaje de inhibición en función de la concentración, además la potencia de la TriHex liposomal contra amastigotes intracelulares fue obtenido de los ensayos de inhibición de la infección y fue expresado como concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>). Este valor fue calculado de forma similar que los datos de CL<sub>50</sub> en fotocitotoxicidad. Los datos de inhibición se presentaron como el promedio, con un intervalo de confianza igual a la desviación estándar entre los 3 datos obtenidos para cada concentración.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 OBTENCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LAS FTALOCIANINAS DE SILICIO LIPOSOMALES.

Se obtuvieron dos formulaciones liposomales, (i) liposomas de la ftalocianina TriHex denominada TriPC (ii) liposomas de la ftalocianina PcSiCl<sub>2</sub> denominada Cl<sub>2</sub>PC. Además se prepararon liposomas sin ftalocianina para utilizarlos como control negativo, denominada BPC la cual presentó una concentración de fosfolípido igual a 1.75x10<sup>-3</sup> M. La concentración de fosfolípidos y de ftalocianina de las preparaciones (i) y (ii) es mostrada en la tabla 3. Cada formulación fue preparada como mínimo dos veces. De acuerdo a los resultados mostrados en la tabla 3, la encapsulación de la PcSi en los liposomas fue 1.5 veces mayor para la TriHex que para la PcSiCl<sub>2</sub>. Este comportamiento se observó en diferentes ensayos.

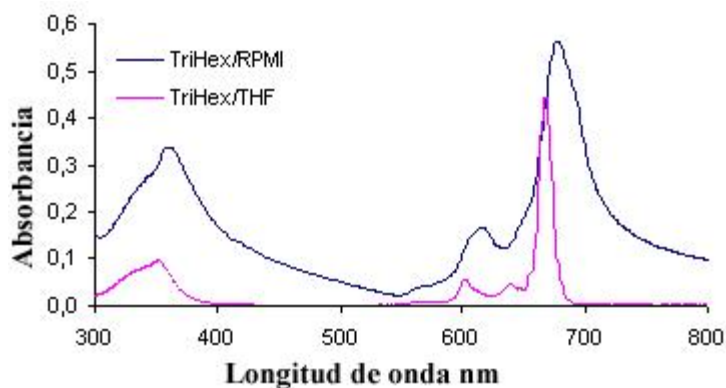
**Tabla 3.** Concentración de fosfolípidos y ftalocianina en las formulaciones liposomales.

Ftalocianina encapsulada	Fosfolípidos [M]	Ftalocianina PcSi [M]	Mol fosfolípidos : mol de ftalocianina	Código
TriHex	3.36x10 <sup>-3</sup>	4.7x10 <sup>-5</sup>	71,5:1	TriPC
PcSiCl <sub>2</sub>	4.43x10 <sup>-3</sup>	4.1x10 <sup>-5</sup>	108:1	Cl <sub>2</sub> PC
Ninguna	1.75x10 <sup>-3</sup>	0	0	BPC

**3.1.1 Estabilidad de las ftalocianinas en medio acuoso.** La formación de agregados en medios acuoso se confirma con el ensanchamiento de las bandas y el

desplazamiento de la banda Q hacia longitudes de onda menores en los espectros de la ftalocianina en medio acuoso en comparación con los espectros de la ftalocianina en solvente orgánico (Leznoff, 1989). Se determinó que en la forma libre de la TriHex no forma agregados cuando se diluye en medio de cultivo celular (RPMI 1640) en las ftalocianinas libres. Esto se evidenció al comparar los espectros ultravioleta visible de la TriHex en RPMI-THF (THF al 0.5 % v/v) con los de la TriHex en THF. No se observó ningún corrimiento de la banda Q hacia longitudes de onda menores en el espectro de la TriHex en RPMI 1640 Figura 9.

Figura 8. Espectro de absorción ultravioleta visible de la TriHex en THF y en una mezcla de medio de cultivo RPMI 1640 y THF  $1.0 \times 10^{-5} M$ .



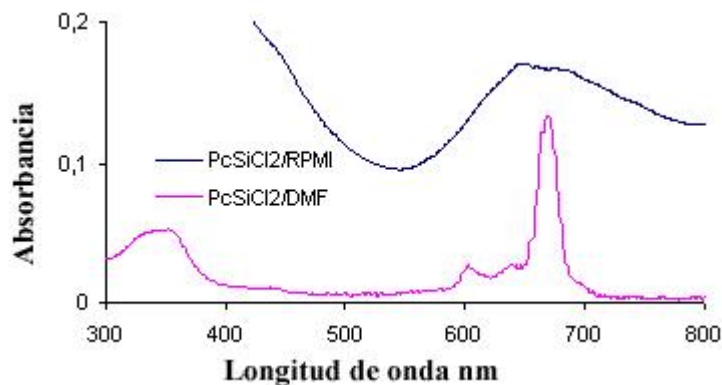
\* En el espectro de la TriHex en RPMI-THF el THF no sobrepaso el 0.5% v/v.

En la Figura 9 se observa el espectro de absorción de la TriHex, en el cual solo se observaron transiciones  $\pi-\pi^*$  entre los 280 a 700 nm. La banda más intensa corresponde a la banda Q ( $n-\pi^*$ ) en la región roja del espectro entre 650 y 700 nm. La banda Soret o B ( $\pi-\pi^*$ ) se localiza entre los 300 y 400 nm. Aunque, el espectro de la TriHex en RPMI presenta un desplazamiento de las bandas S y Q hacia longitudes de

onda mayores, esto posiblemente se debe a efectos de la interacción entre la TriHex con el medio acuoso.

Por el contrario, la  $\text{PcSiCl}_2$  formó agregados cuando se disolvió en RPMI-DMF. Esto fue confirmado por el ensanchamiento de las bandas y el desplazamiento de la banda Q hacia longitudes de onda menores del espectro ultravioleta visible como se aprecia en la grafica 9.

**Figura 9.** Espectro de absorción ultravioleta visible de la  $\text{PcSiCl}_2$   $1.0 \times 10^{-5}$  M en DMF y en una mezcla de medio de cultivo RPMI 1640 y DMF.



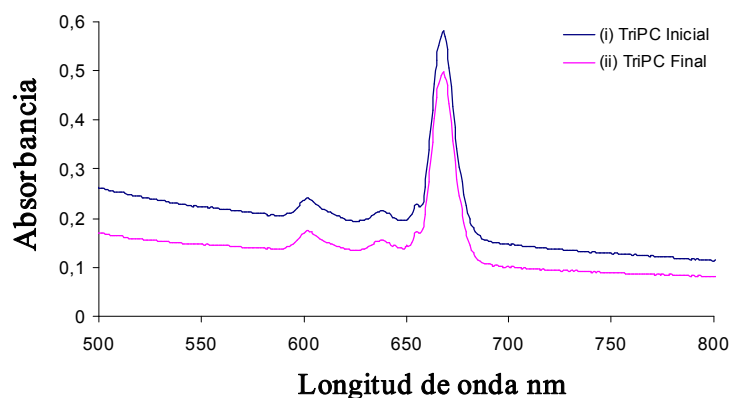
\* En el espectro de la  $\text{PcSiCl}_2$  en RPMI-DMF la DMF no sobrepasó el 0.5 % v/v.

**3.1.2 Estabilidad de las formulaciones liposomales.** La TriPC fue estable en el tiempo, ya que los espectros de la TriHex liposomal tomados al iniciar y finalizar los ensayos no presentaron cambios apreciables de las bandas que indiquen la degradación de los liposomas (Figura 11). No se observó una diferencia debido al cambio de la intensidad de la absorbancia, al parecer este cambio es constante en todas las longitudes de onda y no corresponde a la degradación de los liposomas,

aunque esta afirmación solo se puede corroborar con la técnica de escaneo calorimétrico diferencial de alta resolución (El Magraby, 2005).

Los espectros de absorción ultravioleta visible de ftalocianinas liposomales fueron registrados por encima de los 500 nm ya que no se observa ninguna banda característica de la ftalocianina por debajo de estas longitudes de onda (datos no mostrados). Este fenómeno ha sido expuesto en trabajos anteriores, en los cuales se ha observado que en liposomas que contiene más de un 25 % de colesterol con respecto a los lípidos totales, no se observa la banda Soret característica de estos FS ya que es solapada por la banda de absorción de los lípidos mencionados (Oliveira, 2005).

**Figura 10.** Espectros ultravioleta visible de la ftalocianina liposomal TriPC  $1.0 \times 10^{-5}$  en medio RPMI.



\* Los espectros son tomados al inicio y final de los experimentos para determinar la estabilidad en relación con el tiempo de almacenamiento.

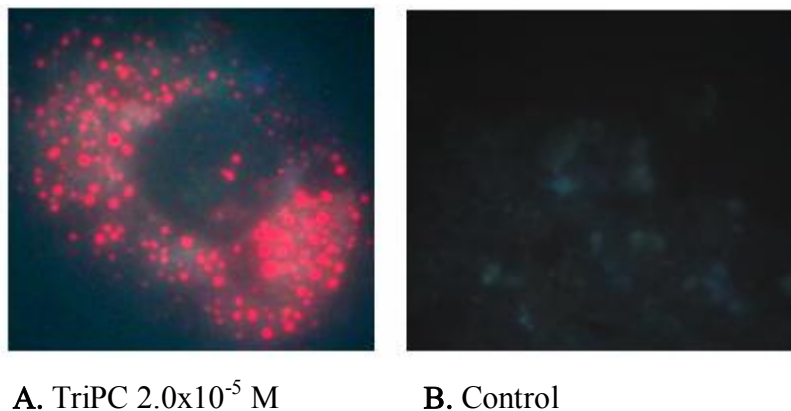
Para el caso de la  $PcSiCl_2$ , la suspensión liposomal fue muy turbia e impidió obtener su respectivo espectro o (Ver Figura 10b), por lo que no se puede concluir nada acerca de la estabilidad en el tiempo de esta  $PcSi$  liposomal.

### 3.2. INCORPORACIÓN DE LA FTALOCIANINAS EN MACRÓFAGOS.

Se observó fluorescencia intracelular solo cuando las macrófagos fueron tratados con concentraciones de TriHex iguales o mayores a 20  $\mu\text{M}$  al emplear la TriPC. La TriHex libre también presentó fluorescencia intracelular sólo cuando ésta era utilizada a concentraciones mayores de 40  $\mu\text{M}$ . Las PcSiCl<sub>2</sub> liposomal y libre no mostraron fluorescencia al ser excitada con las longitudes de onda que permite el equipo ( $\lambda_{\text{Exc.}} = 330\text{-}380\text{nm}$ ) a pesar de que la PcSiCl<sub>2</sub> absorbe a estas longitudes de onda, la fluorescencia de esta ftalocianina no se observó en la suspensión liposomal pero si se observó en DMF.

En la Figura 11 se observa que la formulación liposomal de la TriHex se localizó en el citoplasma de la célula. Además se observó claramente una circunferencia oscura bien delimitada, la cual posiblemente corresponda al núcleo de la célula. Es posible que estos liposomas se localicen en los lisosomas de las células.

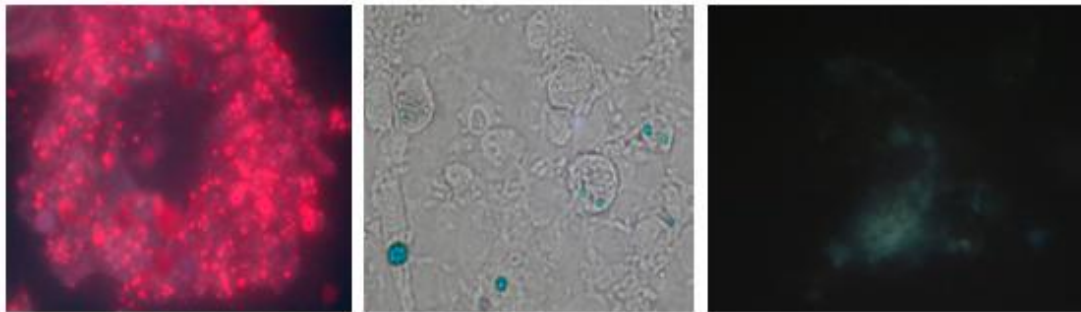
**Figura 11.** Fluorescencia de la TriPC incorporada por las células THP-1.



\* Las células THP-1 fueron incubadas con la TriPC a una concentración igual a  $2.0 \times 10^{-5}$  M. Figura A fluorescencia de las células incubadas con la ftalocianina. Figura B fluorescencia de los controles.

Con respecto a la incorporación de la TriHex libre, se encontraron precipitados visibles en el microscopio de inversión cuando se utilizaron concentraciones mayores de  $40 \mu\text{M}$ . En la Figura 12, se observa la fluorescencia de la ftalocianina TriHex libre dentro de las células THP-1 y muy posiblemente la de los precipitados formados.

**Figura 12.** Fluorescencia de la TriHex libre en células THP-1.



A. TriHex  $4,0 \times 10^{-5}$  M      B. Precipitados de TriHex      C. Control

\* Las células fueron incubadas a una concentración de TriHex igual a  $40 \times 10^{-6}$  M. Figura A fluorescencia de las células cultivadas con la ftalocianina libre, Figura B formación de precipitados a concentraciones mayores de  $4.0 \times 10^{-5}$  M, Figura C fluorescencia de los controles.

En la foto el núcleo no está bien delimitado y dentro de este se encuentran un gran número de puntos fluorescentes. Esta fluorescencia y la que corresponde a los puntos de tamaño considerable posiblemente corresponda en parte a algunos precipitados formados y que son observados en el microscopio.

Por medio de este tipo de análisis cualitativo no se permite elucidar en que organelo de la célula se encuentra la PcSi ni la cantidad que es incorporada. Sin embargo se puede decir que la TriHex libre y liposomal fueron incorporadas por la célula y que la formulación liposomal fue más eficaz en la incorporación de la TriHex en la célula a concentraciones bajas.

### 3.3. EFECTO TÓXICO Y FOTOTÓXICO DE LAS FTALOCIANINAS DE SILICIO EN CÉLULAS THP-1

De acuerdo con los datos de la tabla 4 no se encontró efecto de la composición lipídica de los liposomas ni de la radiación visible suministrada por el láser sobre la mortalidad de las células THP-1.

**Tabla 4.** Citotoxicidad de las formulaciones de las PcSi en macrófagos no infectados.

Controles	Concentración [M]	% de Citotoxicidad en macrófagos	
		Promedio experimento I $\pm$ desviación estándar	Promedio experimento II $\pm$ desviación estándar
Negativo		14.00 $\pm$ 0.56	0.00
BPC		0.00	0.00
TriPC	1,00x10 <sup>-5</sup>	0.00	0,00
	3,33x10 <sup>-6</sup>	9.90 $\pm$ 0.32	8,37 $\pm$ 0.59
	1,11x10 <sup>-6</sup>	10.13 $\pm$ 0.34	0,00
	3,70x10 <sup>-7</sup>	7,28 $\pm$ 0,30	0.00
Cl <sub>2</sub> PC	1.0x10 <sup>-5</sup>	19,80 $\pm$ 1,85	8,58 $\pm$ 0,36
	3.33x10 <sup>-6</sup>	19,51 $\pm$ 3,76	0.00
	1.11x10 <sup>-6</sup>	43,50 $\pm$ 6,09	0.00
	3.7x10 <sup>-7</sup>	23,92 $\pm$ 3,61	0.00

\* Cultivos no irradiados.

En todos los experimentos, excepto el experimento I con la Cl<sub>2</sub>PC, se encontró que la toxicidad de las formulaciones de las ftalocianinas es muy baja en los macrófagos que no fueron irradiados, en estos caso la citotoxicidad siempre fue menor a 10 %

Para el caso de los ensayos de fototoxicidad se encontró que las PcSi liposomales presentaron un efecto fototóxico contra macrófagos tumorales humanos el cual fue dependiente de la concentración de ftalocianina. Contrario a las PcSi libres, las cuales mostraron baja o nula actividad fototóxica, como se muestra en las tablas 4 y 5.

**Tabla 5.** Fototoxicidad de las formulaciones de la PcSiCl<sub>2</sub> en células THP-1 no infectadas.

Formulación	Concentración [M]	% Fototoxicidad en células THP-1	
		Promedio experimento I ± desviación estándar	Promedio experimento II ± desviación estándar
Cl <sub>2</sub> PC	1.0x10 <sup>-5</sup>	57.61 ± 0.68	89.32 ± 0.33
	2x10 <sup>-6</sup>	57.11 ± 0.58	84.61 ± 1.13
	4.0x10 <sup>-7</sup>	29.28 ± 1.08	69.23 ± 2.87
	8.0x10 <sup>-8</sup>	9.84 ± 3.33	8.09 ± 2.24
PcSiCl <sub>2</sub> /Libre	1.0x10 <sup>-5</sup>	46.08 ± 1.29	28.88 ± 1.29
	3.33x10 <sup>-6</sup>	52.64 ± 0.43	21.16 ± 1.34
	1.11x10 <sup>-6</sup>	63.76 ± 0.92	21.69 ± 1.40
	3.7x10 <sup>-7</sup>	45.46 ± 0.44	16.76 ± 1.32

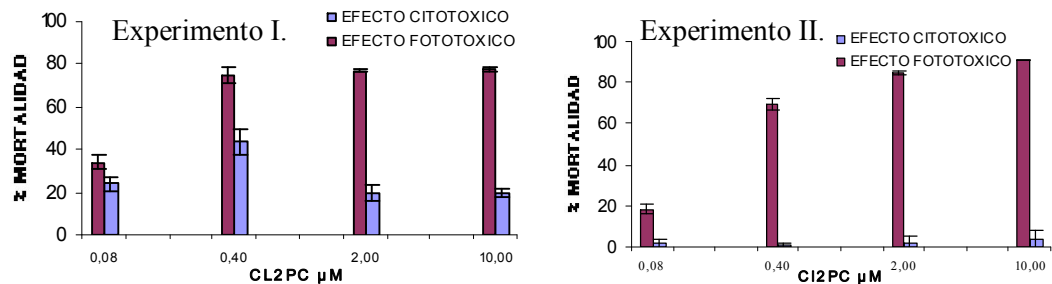
\* Irradiación 75 min. (10J/cm<sup>2</sup>). Los resultados son expresados como el promedio del % de fototoxicidad. ND = no determinado.

Los experimentos I y II no fueron reproducibles para la Cl<sub>2</sub>PC, por lo tanto no se utilizo esta ftalocianina para los ensayos en amastigotes intracelulares de *Leishmania*.

Aunque, es importante resaltar que el efecto fototóxico para la Cl<sub>2</sub>PC fue determinado para un rango de concentraciones menores que las evaluadas para la TriPC. Los ensayos con la Cl<sub>2</sub>PC se realizaron a concentraciones menores porque al ser utilizadas las mismas concentraciones no se observó ninguna variación del porcentaje de mortalidad en células THP-1 en función de la concentración de la ftalocianina (datos no mostrados). La mayor concentración de PcSi fue la misma para las dos ftalocianinas ( $1,0 \times 10^{-5}$  M), pero en el caso de la TriPC se emplearon diluciones 1:3 mientras que para la Cl<sub>2</sub>PC se utilizaron diluciones 1:5.

Se observó el mismo comportamiento de la actividad fototóxica la cual fue dependiente de la concentración de la Cl<sub>2</sub>PC en células THP-1 en los dos experimentos, como se aprecia en la Figura 14. Posiblemente los valores de citotoxicidad para el experimento I no corresponden a los valores reales ya que en un experimento preliminar realizado con esta formulación se obtuvieron porcentajes de citotoxicidad menores (20.22; 10.93; 3.09 y 11.00 % de muerte celular) para concentraciones mayores de Cl<sub>2</sub>PC esto es  $1.0 \times 10^{-5}$ ,  $3.33 \times 10^{-6}$ ,  $1.11 \times 10^{-6}$  y  $3.70 \times 10^{-7}$  M respectivamente.

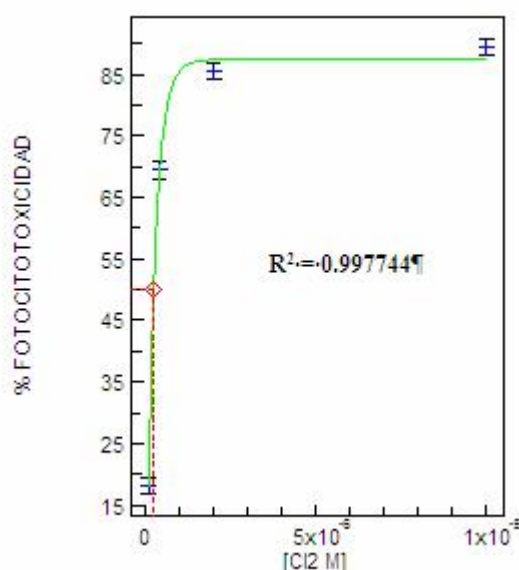
**Figura 13.** Actividad de la Cl<sub>2</sub>PC en macrófagos THP-1



En los ensayos de la actividad en células THP-1 en los cuales se utilizó la Cl<sub>2</sub>PC no existió reproducibilidad en los resultados, en este caso los valores de citotoxicidad presentaron las mayores diferencias entre experimentos.

La concentración letal 50 (CL<sub>50</sub>) para la Cl<sub>2</sub>PC, obtenida utilizando el programa XLFIT fue 11.78 veces menor que el obtenido para la TriPC. Este valor para la Cl<sub>2</sub>PC fue  $(2.53 \pm 0.22) \times 10^{-7}$  M y para la TriPC fue  $(2.98 \pm 0.17) \times 10^{-6}$  M (Figuras 15 y 16). En las dos formulaciones los datos de fototoxicidad se ajustaron a una función sigmoidea correspondiente al modelo de Weibull, el coeficiente de correlación de esta grafica para la Cl<sub>2</sub>PC fue  $r^2 = 0.9977$  y para la TriPC fue mejor la correlación de los datos a la función de onda seleccionada por el programa XLFIT ( $r^2 = 0.999969$ ).

**Figura 14.** Potencia relativa de la Cl<sub>2</sub>PC en la destrucción de células THP-1.



\* Ajuste de los datos obtenidos en el experimento II a una función sigmoidea mediante el programa XLFIT, la función corresponde al modelo de Weibull la línea roja punteada indica el valor de la CL<sub>50</sub>.

En la Figura 15 se aprecia que la fototoxicidad no varía significativamente para las dos concentraciones más altas de Cl<sub>2</sub>PC, este efecto tiende a ser constante por encima de  $4 \times 10^{-7}$  M. La parte inicial de la grafica muestra que con pequeñas variaciones de la

concentración se obtienen porcentaje de muerte celular mayores en comparación con la TriPC.

**Tabla 6.** Fototoxicidad de las formulaciones de la TriHex en células THP-1.

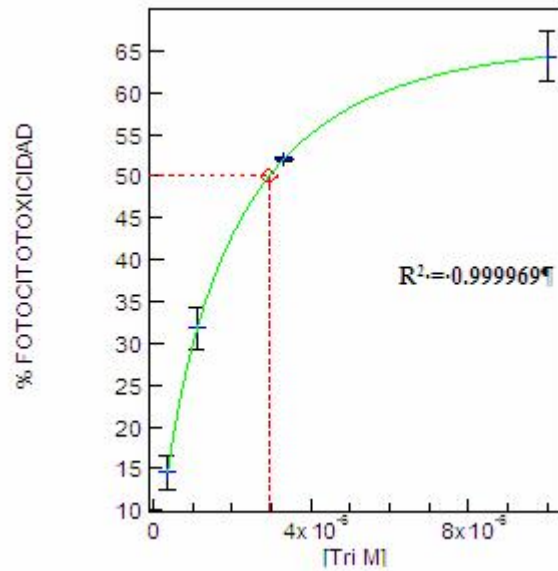
Formulación	Concentración [M]	% de Fototoxicidad en células THP-1	
		Promedio experimento I $\pm$ desviación estándar	Promedio experimento II $\pm$ desviación estándar
TriPC	$1.0 \times 10^{-5}$	$70.91 \pm 0.13$	$64.36 \pm 2.89$
	$3.33 \times 10^{-6}$	$55.45 \pm 7.76$	$52.02 \pm 0.30$
	$1.11 \times 10^{-6}$	$34.98 \pm 6.05$	$31.83 \pm 2.49$
	$3.7 \times 10^{-7}$	$15.29 \pm 4.11$	$14.54 \pm 2.02$
TriHex/Libre	$1.0 \times 10^{-5}$	$48.60 \pm 6.36$	$28.49 \pm 4.21$
	$3.33 \times 10^{-6}$	$13.77 \pm 5.72$	$12.20 \pm 0.21$
	$1.11 \times 10^{-6}$	0.00	0.00
	$3.7 \times 10^{-7}$	0.00	0.00

Para las dos formulaciones los valores de la  $CL_{50}$  se obtuvieron de los datos del experimento II, debido a que los datos de fotocitotoxicidad obtenidos en este experimento presentaron la menor dispersión para cada concentración de la ftalocianina.

La  $CL_{50}$  no pudo ser obtenida para las formulaciones libres de la TriHex y de la  $PcSiCl_2$  en el rango de concentraciones evaluadas. Los datos de fototoxicidad obtenidos en los dos experimentos para las ftalocianinas libres no fueron

reproducibles y en el caso de la TriHex el valor de fotocitotoxicidad siempre fue menor a 50 % por lo cual no se determinó la DL<sub>50</sub>.

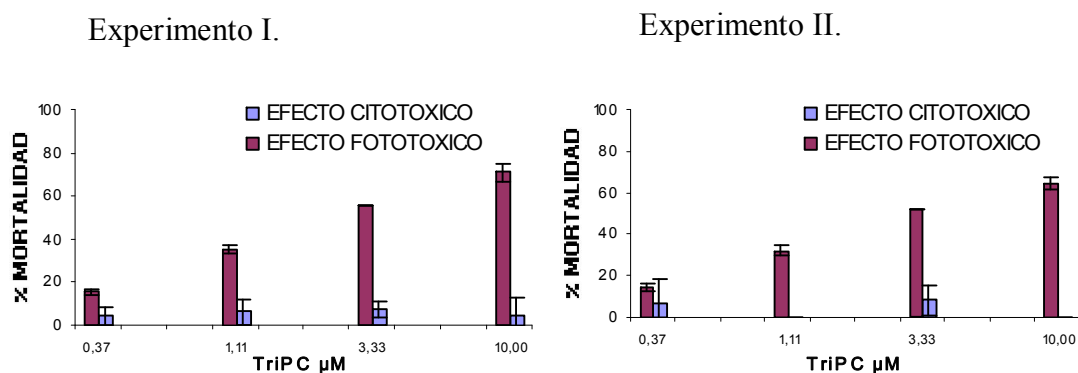
**Figura 15.** Efecto fototóxico de la TriPC en células THP-1.



\* Ajuste de los datos obtenidos en el experimento II a una función sigmoidea mediante el programa XLFIT, la función corresponde al modelo de Weibull la línea roja punteada indica el valor de la CL<sub>50</sub>.

De acuerdo con los resultados de actividad de la TriPC presentados en la Figura 17, los datos de citotoxicidad fueron relativamente muy bajos y no mostraron un comportamiento dependiente de la concentración de ftalocianina. Por el contrario los valores de la fototoxicidad además de ser dependientes de la concentración, fueron reproducibles en los dos experimentos.

Figura 16. Actividad de la Cl<sub>2</sub>PC en macrófagos THP-1.



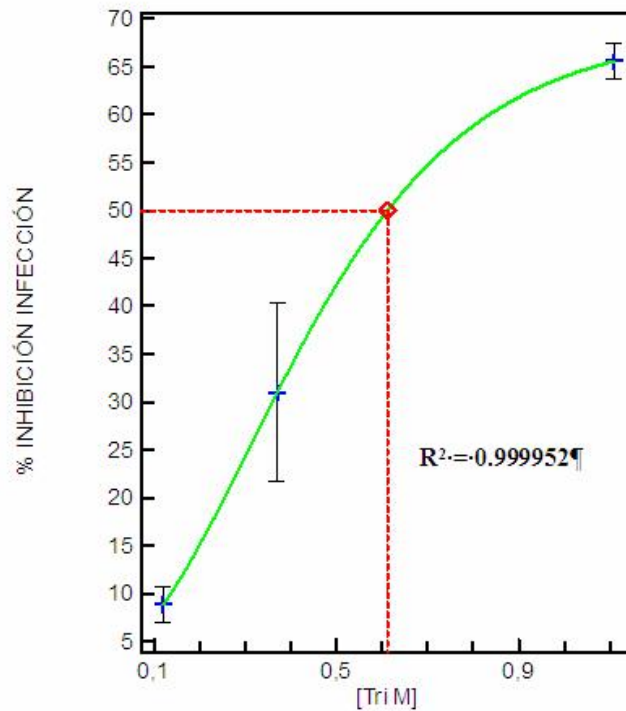
#### 3.4. EFECTO FOTOTÓXICO DE LAS FTALOCIANAS DE SILICIO CONTRA PARÁSITOS INTRACELULARES DE *LEISHMANIA CHAGASI*.

Debido a la baja reproducibilidad de los ensayos en los cuales se utilizó la Cl<sub>2</sub>PC se decidió no utilizar esta ftalocianina en los ensayos con amastigotes intracelulares de *Leishmania chagasi*.

De acuerdo con los resultados de la tabla 6 se encontró que la TriPC indujo inhibición de la infección por *L. chagasi* en células THP-1. Este efecto fototóxico fue dependiente de la concentración de ftalocianina. La formulación libre de esta ftalocianina no mostró actividad fototóxica contra la *L. chagasi*. El valor de la concentración inhibitoria del 50 por ciento (CI<sub>50</sub>) obtenido con el programa XLFIT fue  $6,17 \times 10^{-7}$  M (Figura 18). Este valor fue menor que el encontrado en la investigación realizada por Sereno y colaboradores, en la cual encontraron que la concentración inhibitoria del 50 % para el glucantime en amastigotes axenicos de *L. infantum* se encontraba en un rango entre  $(3.03-4.65) \times 10^{-6}$  M (Sereno et al., 1998).

Aunque se evaluaron concentraciones mayores a  $1.11 \times 10^{-6}$  M estas interfieren en la lectura de los ensayos, puesto que concentraciones mayores lisan un porcentaje mayor del 50 % de las células THP-1, por esta razón los datos se reportan para concentraciones menores de  $1.10 \times 10^{-6}$  M. Esta concentración de TriPC causó solo un 31.83% de mortalidad en los ensayos con células THP-1 no infectadas. Los resultados de fototoxicidad contra amastigotes intracelulares de *L. chagasi* se muestran en la tabla 7.

**Figura 17.** Efecto fototóxico de la TriPC contra amastigotes intracelulares de *L. chagasi*.



\* Función obtenida por XLFIT

Los controles negativos (células infectadas las cuales no fueron tratadas y otras tratadas con liposomas sin ftalocianina BPC) no presentaron inhibición de la

infección. Además, el rango de concentraciones que fue evaluada la actividad de la TriPC contra la *Leishmania* no mostró inhibición de la infección en los ensayos que no fueron irradiados los cultivos.

**Tabla 7.** Efecto fototóxico de la TriPC contra amastigotes de *Leishmania chagasi*.

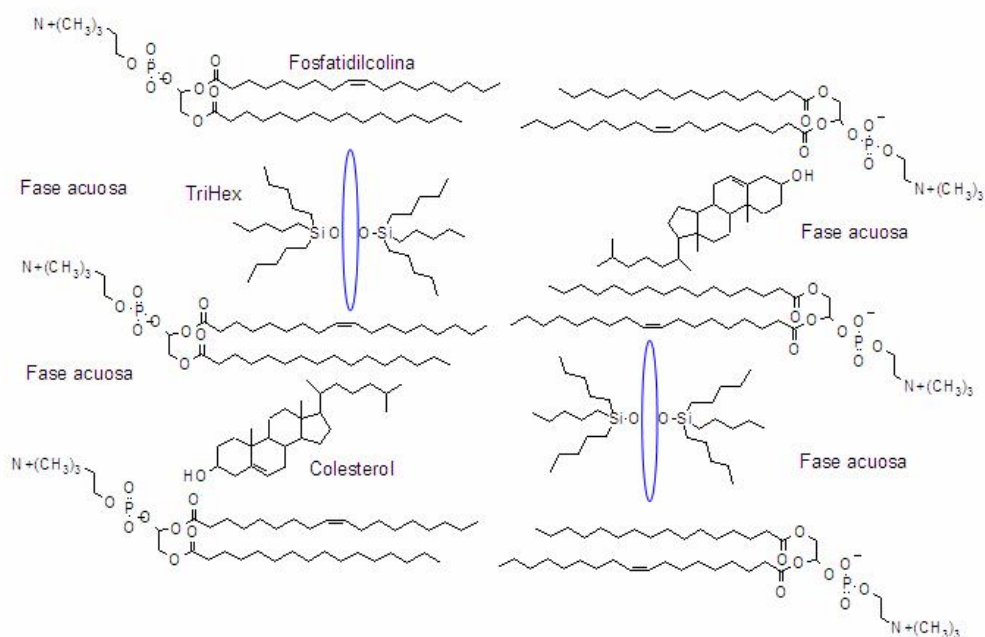
Formulación	Ftalocianina [M]	Porcentaje de fototoxicidad $\pm$ desviación estándar
TriPC	$1.11 \times 10^{-6}$	$60.27 \pm 1.90$
	$3.70 \times 10^{-7}$	$29.37 \pm 9.30$
	$1.20 \times 10^{-7}$	$10.96 \pm 1.90$

La inhibición de la infección por parásitos de *L. chagasi* fue igual a 60.27 % cuando se utilizó una concentración  $1.11 \times 10^{-6}$  M de TriPC.

## 4. DISCUSIÓN

La mayor incorporación de la TriHex en los liposomas posiblemente ocurre debido a un efecto de estabilización dado por las interacciones (fuerzas de Van der Waals) que se pueden presentar entre las cadenas acílicas de la fosfatidilcolina y las cadenas hidrocarbonadas de los grupos tri-n-hexilsiloxi de la ftalocianina de silicio. Este fenómeno ha sido explicado por El Maghraby y colaboradores (El Maghraby et al., 2005), según estos autores las moléculas hidrófobas, clasificación que podemos dar a las PcSi, se localizan en las bicapas lipídicas (Ver Figura 8).

**Figura 18.** Posible conformación de la bicapa lipídica de la TriHex.



\* Los círculos azules representan el anillo de la ftalocianina.

Se utilizó el modelo de la conformación de la membrana de liposomas de L- $\alpha$ -dipalmitoil fosfatidilcolina y colesterol, elucidada con ayuda de la resonancia

electrónica paramagnética por Sulkowski y colaboradores (Sulkowski et al., 2005), para representar la conformación de la membrana de colesterol, fosfatidilcolina y ftalocianina de silicio de los liposomas obtenidos en esta investigación. Se propone entonces, que las moléculas de PcSi se localicen entre la bicapa como se observa para la TriHex en la Figura 8.

Por el contrario la menor incorporación de la  $\text{PcSiCl}_2$  en los liposomas de fosfatidilcolina colesterol, posiblemente se debe a que los átomos de cloro no ofrecen un efecto de estabilización por interacción con las cadenas acílicas de los fosfolípidos. Esto está en concordancia con los datos de la relación lípido:ftalocianina obtenidos, en donde un menor número de moléculas de  $\text{PcSiCl}_2$  se encuentran presentes entre las moléculas de fosfolípidos.

#### **4.1 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LA FORMULACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOTOXICA DE LAS FTALOCIANINAS EN CÉLULAS THP-1**

La actividad de las ftalocianinas libres,  $\text{PcSiCl}_2$  y TriHex fue menor que las respectivas formulaciones liposomales, debido principalmente a la dificultad que tienen las ftalocianinas libres para ingresar a las células THP-1, esto es confirmado con los ensayos de la incorporación de la ftalocianina en las células en los cuales no se observó incorporación de la ftalocianina libre a concentraciones menores de 40  $\mu\text{M}$ . En este caso particular la formación de agregados, los cuales tienen la capacidad de desactivar el estado triplete excitado del fotosensibilizador y por ello disminuir la actividad del fotosensibilizador, no tiene gran influencia en la baja actividad mostrada por estas formulaciones (Decreau et al., 1999; Macdonald y Dougherty, 2001).

Las fotografías de la incorporación de las PcSi fueron obtenidas luego de 24 horas de incubación con cada formulación liposomal y en todos los casos se observó puntos de

fluorescencia correspondiente a la ftalocianina contenida en el interior de los liposomas que fueron fagocitados por la célula, lo que en cierta medida nos indica que estos liposomas son insensibles al pH, ya que en el caso contrario la fluorescencia debería verse uniformemente en todo el citoplasma puesto que, los medicamentos que son transportados por liposomas sensibles al pH son liberados al citoplasma inmediatamente después de ingresar a la células, aproximadamente 15 min., dependiendo de la composición lipídica del liposoma (Morilla, 2005).

El índice de actividad de las PcSi en células THP-1 fue expresado como porcentaje de muerte celular, estos valores fueron aproximadamente el doble para las ftalocianinas liposomales en comparación con las formulaciones libres, este efecto se debe posiblemente a la capacidad que tienen este tipo de transportador de aumentar la solubilidad de los FS en medios acuosos, y a la alta afinidad entre las membranas de la célula y de los liposomas. Esta afinidad aumenta debido a la presencia de ciertos receptores que poseen los macrófagos y que permiten reconocer y fagocitar los liposomas, estos aspectos le permiten a la célula concentrar mayores cantidades de la ftalocianina en la célula (Rudenko, 2002), esto se confirma con las imágenes obtenidas de la incorporación de la TriHex en las células THP-1.

La baja fotocitotoxicidad de las ftalocianinas libres y el inconveniente de la reproducibilidad entre experimentos, posiblemente se debe a la formación de precipitados de la ftalocianina inducidos por el carácter altamente hidrófobo de estos fotosensibilizadores. Este efecto es incrementado por las cadenas alifáticas de los grupos Tri-n-hexilsiloxi en la TriHex.

#### 4.2 INFLUENCIA DE LA NATURALEZA DE LA FORMULACIÓN SOBRE LA ACTIVIDAD FOTOTOXICA DE LAS FTALOCIANINAS EN AMASTIGOTES DE *LEISHMANIA CHAGASI*

La naturaleza lipídica de los liposomas permitió una mayor incorporación de la ftalocianina en la células THP-1 posiblemente debida a la afinidad que tienen estas micro esferas por las membranas celulares, lo cual les permitió traspasar la membrana celular más fácilmente. Los liposomas preparados en esta investigación garantizan que la ftalocianina solo fue liberada en el momento que las células fueron irradiadas, lo cual, posiblemente aumentó la destrucción de los amastigotes de *Leishmania* localizados en los fagolisosomas que es a donde se dirigen los liposomas luego de ser fagocitados por las células (Morilla, 2005).

El índice de actividad el cual corresponde al porcentaje de inhibición de la infección fue dependiente de la concentración para la TriPC, en los cuales es importante resaltar que se logró un porcentaje significativo de la inhibición de la infección con concentraciones relativamente pequeñas de la ftalocianina de silicio.

Los resultados de fototoxicidad de las PcSi contra amastigotes intracelulares de *L. chagasi* permitió confirmar, que la estrategia de encapsular moléculas activas en formulaciones lipídicas incrementa la destrucción del parásito, como ha sido encontrado en otras investigaciones (Yardley y Croft, 2000). Además, estos resultados nos sugieren que muchos de los compuestos orgánicos hidrófobos que no mostraron actividad contra ciertas enfermedades deberían ser nuevamente evaluados empleando formulaciones liposomales para aumentar su actividad.

Este resultado puede ser considerado promisorio, ya que se deja abierta la posibilidad de usar la TFD contra la *Leishmania* (Gardlo et al. 2003).

Finalmente, se realizaron experimentos preliminares de fotocitotoxicidad de las formulaciones de las PcSi en promastigotes de *L. chagasi*. Estos experimentos no se continuaron debido a que las formulaciones liposomales mostraron un efecto tóxico en la oscuridad. Este efecto posiblemente sea debido a la fusión entre las membranas del liposoma y del parásito, lo cual ocasiona la lisis de los parásitos por efecto de la formación de defectos estructurales en la membrana del parásito. En el caso de las ftalocianinas libres no se observó toxicidad ni fotocitotoxicidad en concentraciones menores a 20  $\mu\text{M}$ .

## 5. CONCLUSIONES

Se observó un efecto fototóxico en los ensayos donde estaba presente las ftalocianinas de silicio y la radiación visible en células THP-1 infectadas y no infectadas con *L. chagasi*. Este efecto fue evidenciado por la muerte de las células y la disminución del porcentaje de infección en las células THP-1. Por el contrario, en ausencia de luz las formulaciones de la TriHex no mostraron citotoxicidad en los ensayos realizados con las células THP-1 ni en los ensayos con amastigotes intracelulares. Las formulaciones liposomales mostraron un efecto fototóxico dependiente de la concentración de la ftalocianina.

Al utilizar liposomas como transportadores de la TriHex y  $\text{PcSiCl}_2$ , se obtuvo un mayor efecto fototóxico en células THP-1 comparado con sus respectivas formulaciones libres. Esto está en concordancia con numerosos investigadores, los cuales sugieren que estas formulación permiten incrementar la solubilidad de los compuestos hidrófobos en medios acuosos e incrementar su incorporación en las células debido a la alta afinidad entre las membranas celulares y la de los liposomas.

El efecto fototóxico que ocasiona la inhibición de la infección con *L. chagasi* en células THP-1 es significativa en liposomas de TriHex, este hecho concuerda con los resultados mostrados en la literatura en donde se sugiere que los liposomas incrementan la actividad anti-*Leishmania* de los medicamentos debido a que estos tienen la capacidad de localizarse en los fagolisosomas en donde se encuentra el parásito, y al ser irradiados, las especies que se generan se encontrarían más cerca al parásito incrementado la probabilidad de destrucción del parásito.

Aunque no existe reproducibilidad en los resultados obtenidos para la  $\text{PcSiCl}_2$ , se muestra que la TFD podría ser una herramienta útil en la lucha contra la leishmaniasis. En conclusión, los resultados obtenidos muestran que los liposomas

son sistemas transportadores que pueden encapsular compuestos insolubles como las PcSi y facilitar su incorporación celular. La actividad fototóxica presentada por las formulaciones liposomales de PcSi contra amastigotes intracelulares de *L. chagasi* muestran que la TFD podría ser una herramienta útil en la lucha contra la leishmaniasis. Igualmente por la fototoxicidad encontrada en células tumorales como las THP-1 muestran su aplicabilidad en el tratamiento contra el cáncer

## 6. RECOMENDACIONES

Debido a que las moléculas de colesterol en las membranas celulares y en los liposomas actúan como protectores de la fotooxidación lipídica interfiriendo con la lisis de las bicapas en la liberación de la ftalocianina desde los liposomas (Girotti, 2001), sería interesante preparar liposomas que contengan un menor porcentaje molar de colesterol para facilitar la liberación de la ftalocianina e incrementar aun más la actividad fototóxica de estos FS.

Una estrategia interesante en el diseño de los liposomas es la utilización de lípidos con carga negativa como la fosfatidilserina y la fosfatidiletanolamina. Cuando estas moléculas están en cantidades entre 7-10 % de las moles totales de los lípidos en la superficie de los liposomas, estos liposomas son reconocidos e incorporados por las células fagocitarias en mayores cantidades (Rothkopf et al., 2005). Como se ha indicado en la literatura, este porcentaje de lípidos con carga negativa no afecta el carácter pH insensible de los liposomas (Makino et al, 2003), lo cual garantizaría que la ftalocianina se libere del liposoma solo cuando estos sean irradiados por luz visible. Sería conveniente preparar un transportador liposomal que contenga estos fosfolípidos de carga negativa.

Sería importante determinar el tipo de fotorreacción que estuvo presente en los procesos fototóxicos observados. Una ruta para establecer el tipo de fotorreacción en estos experimentos sería determinando los hidroperóxidos de colesterol generados por la fotooxidación lipídica.

Finalmente, sería interesante estudiar la localización de la PcSi encapsulada y el tipo de muerte celular que estos ocasionan en macrófagos.

## 7. BIBLIOGRAFÍA

AHYAYAUCH, G. AND BENNOUNA M. Interaction of electrically neutral and cationic forms of imipramine with liposome and erythrocyte membranes. *International Journal of Pharmaceutics* 2004; 279;51–58.

AMPUERO, S. Leishmaniasis. Módulos Técnicos Serie Documentos Monográficos N°8 Ministerio de salud instituto nacional de salud Lima 2000.

BAIER, J. Time-resolved investigations of singlet oxygen luminescence in water, in phosphatidylcholine, and in aqueous suspensions of phosphatidylcholine or HT29 cells. *En: J. Phys. Chem. B. Vol. 109 (2005); p. 3041-3046.*

BELICHENKO, I., MORISHIMA, N. AND SEPEROVIC, D. Caspase-resistant vimentin suppresses apoptosis after photodynamic treatment with a silicon phthalocyanine in jurkat cell. *Archives of biochemistry and biophysics.* 2001; 390: 57-63.

BELLNIER. et al. An assay for the quantitation of photofrin in tissues on fluids. *En: Photochemistry and photobiology.*1997; 66: 237-244.

BETZ G. In vivo comparison of various liposome formulations for cosmetic application. *International Journal of Pharmaceutics.* 2005; 296: 44–54.

BOTCHER, VAN GENT AND PRIES C. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Anal. Chim. Acta.* 1961; 24: 203-204.

BOURDON O. et al. A comparative of cellular uptake, localization and phototoxicity of meta-tetra (hydroxyphenyl) chlorin encapsulated in surface-modified submicronic oil/water carriers in HT29 tumor cells. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. 2000; 55: 164-171.

BURSTEIN Z. AND GUILLÉN. Leishmaniasis cutánea y mucocutánea en el Perú. *Rev Perú Med Exp Salud Publica*. 2002; 19: 215-218.

CARUSO D. et al. Identification of 3 $\beta$ -hydroxy-5 $\alpha$ -cholest-6-ene-5-hydroperoxide in human oxidized LDL. *Chemistry and physics of lipids*. 1996; 79: 181-186.

CARCELÉN. et al. Análisis retrospectivo de la utilización de amfotericina B liposomal. *Servicio de farmacia, hospital de Zaragoza*. 1996; 20: 125-128.

CHIEN J., HUANG D. AND CHEN B. Kinetic Studies of Cholesterol Oxidation as Inhibited by Stearylamine during Heating. *J. Agric. Food Chem*. 2004; 52: 7132-7138.

CHIU, S. et al. Phthalocyanine 4 photodynamic therapy-induced apoptosis of mouse L5178Y-R cell results from a delayed but extensive release of cytochrome c from mitochondria. *Cancer letter*. 2001; 165: 51-58.

CHWILKOWSKA A. et al. Uptake of photofrin II, a photosensitizer used in photodynamic therapy, by tumour cells *in vitro*. *Acta Biochimica Polonica*. 2003; 50: 509-513.

CROFT S., BARRETT, M. AND URBINA, J. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in parasitology*. 2005; 21: 508-512.

CROFT S., SEIFERT, K. AND DUCHÊNE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. *Molecular & Biochemical Parasitology*. 2003; 126: 165–172.

CRUZ, E. et al. Liposomal Superoxide Dismutases and Their Use in the Treatment of Experimental Arthritis. *Methods in enzymology*. 2005; 391: 395-413.

CUBA, C. DIAGNOSTICO. Parasitologico de la leishmaniasis tegumentaria americana. *Rev Med Exp*. 2000; 17: 1-4.

DECREAU. et al. Photodynamic activities of silicon phthalocyanines againts achromic M6 melanoma cell and healthy human melanocytes and keratinocytes. *Journal photochemistry and photobiology, B: Biology*. 1999; 48: 48-56.

DESCOTEAUX, A. AND TURCO, S. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta*. 1999; 1455: 341-352.

DUTOIR, A. et al. Endostatin cDNA/Cationic Liposome Complexes as a Promising Therapy to Prevent Lung Metastases in Osteosarcoma: Study in a Human-like Rat Orthotopic Tumor. *MOLECULAR THERAPY*. 2005; 11: 311-319.

EL MAGHRABY, G., WILLIAMS, A. AND BARRY, B. Drug interaction and location in liposomes: correlation with polar surface areas. *International journal of pharmaceutics*. 2005; 292: 179-185.

ESPOSITO, J., LLOYD, J. AND KENNEY, M. The synthesis and physical properties of some organo- and organosiloxysilicon phthalocyanines. *Inorganic Chemistry*. 1966; 5: 1980-1984.

FADOCK et al. A receptor for phosphatidylserine-specific clearance of apoptotic cells. *Nature*. 2000; 405: 85-93.

FOCO A., GASPERLIN M. AND KRISTL J. Investigation of liposomes as carriers of sodium ascorbyl phosphate for cutaneous photoprotection. *International Journal of Pharmaceutics*. 2005; 291: 21–29.

FREITAS, J. et al. Apoptotic mimicry by an obligate intracellular parasite downregulates macrophage microbicidal activity. *Current Biology*. 2001; 11: 1870-1873.

GALVÃO. et al. Therapeutic trial in experimental tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A comparative study between mefloquine and aminosidine. *Revista da sociedade da Brasileira de medicina tropical*. 2000; 33: 377-382.

GAO, L. et al. Tetra-trifluoroethoxyl zinc phthalocyanine: Potential photosensitizer for use in the photodynamic therapy of cancer. *Journal of photochemistry and photobiology B: Biology*. 2001; 65: 35-38.

GARDLO, K. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J. AM. ACD. DERMATOL*. 2003; 48: 893-896.

GELABERT, Y. y DÍAZ, R. Nuevas alternativas de inmovilización de activos antioxidantes. *Rev. Cubana Invest Biomed*. 2001; 20: 70-73.

GIROTTI, A. Photosensitized oxidation of membrane lipids: reaction pathways, cytotoxic effects, and cytoprotective mechanism. *Journal of photochemistry and photobiology B*: 2001; 63: 103-113.

GUIMOND, et al. Modulation of gene expression in *Leishmania* drug resistant mutants as determined by targeted DNA Microarrays. *Nucleic Acids Research*. 2003; 31: 5887-5896.

GUO, X. AND SZOKA, F. Chemical approaches to triggerable lipid vesicles for drug and gene delivery. *Accounts of chemical research I*. 2003; 36: 335-347.

HANSAN, T., MOOR, A. AND ORTEL, B. Photodynamic therapy of cancer. *Principles of radiation oncology section 11*. [on line], [cited 2003-04-25]. Available from internet: <URL:<http://www.future-drugs.com/admin/articlefile/ERA010403.pdf>>.

HEYNE, B. et al. Reactivity towards singlet oxygen of propofol inside liposomes and neuronal cells. *Biochimica et biophysica acta*. 2005; 1724: 100-107.

HOPE, M. et al. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipids vesicles. *Chemistry and physics lipids*. 1986; 40: 89-107.

HSIEH. et al. Subcellular localization of photofrin® determines the death phenotype of human epidermoid carcinoma A431 cells triggered by photodynamic therapy: when plasma membranes are the main targets. *Journal of cellular physiology*. 2003; 194: 363-375.

HUANG, J. et al. Photodynamic activities of a dicationic silicon (IV) phthalocyanine and its bovine serum albumin conjugates. *Tetrahedron Letters*. 2003; 44: 8029-8032.

IGARASHI, A. et al. Liposomal photofrin enhances therapeutic efficacy of photodynamic therapy against the human gastric cancer. *Toxicology letters*. 2003; 145: 133-141.

KASSAB, K. et al. Skin-photosensitizing properties of Zn (II)-2(3), 9(10), 16(17), 23(24)-tetrakis-(4-oxy-N-methylpiperidiny) phthalocyanine topically administered to mice. *Journal Photochemistry photobiology B: Biology*. 2000; 55

KAUSAR, B. H. y ATHAR M. Protoporphyrin-IX accumulation and cutaneous tumor regression in mice using a ferrochelatase inhibitor. *Cancer letter*. 2002; 187: 9-16.

KHARISOV, B., GARZA, L. AND BLANCO, L. Técnicas para la preparación de ftalocianinas. [on line]. [cited 2004-01-12]. Available from internet: <URL:<http://www.uanl.mx/publicaciones/ingenierias/22/tecnicas.pdf>>.

KIMEL, S., ORESNSTEIN. A. AND LAVIE. G. Characteristics of different photosensitizers. En: *Photomedicine in Gynecology and Reproduction*. 2000; 32: 14-38.

KONDURI, K. et al. The Use of Sterically Stabilized Liposomes to Treat Asthma. *Methods in enzymology*. 2005; 391: 413-427

KULIG, M. AND SMITH, L. Sterol Metabolism. XXV. Cholesterol Oxidation by Singlet Molecular Oxygen. *J. Org. Chem*. 1973; 38: 3639-3642.

LEANDRO AND CAMPINO, L. Leishmaniasis: efflux and chemoresistance. *International Journal of Antimicrobial Agent*. 2003; 22: 352-357.

LENIS, A. La respuesta celular inmune en la leishmaniasis cutánea americana. *Biomédica*. 1998;18: 274-284

LEZNOFF and LEVER, A. Phthalocyanines properties and applications. VCH publisher inc., New York. 1989. p. 150-160.

LUKYANETS, E. Phthalocyanines as photosensitizer in the photodynamic therapy of cancer. En: *Journal of phorphyrins and phthalocyanines*. 1999; 3: 424-432.

MACDONALD, I. AND DOUGHERTY, T. Basic principles of photodynamic therapy. Journal of porphyrins and phthalocyanines. 2001; 5: 105-129.

MACDONALD, R. et al. Small-volume extrusion apparatus for preparation of large, unilamellar vesicles. Biochimica and biophysica acta. 1991; 1061: 297-303.

MACHADO, J. et al. Inmunoterapia para la leishmaniasis cutánea: ensayo controlado con una vacuna de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* muerta y compuestos de antimonio. International dermatology dermocosmetic. 2002; 5: 256-262

MACÍAS, C., ROBLES, N., PALACIOS, X., VEGA C., GONZÁLEZ A. AND BALLESTER J. Respuesta inmune celular en enfermos con leishmaniasis cutánea atípica. Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter. 1999; 15: 25-9.

MAKINO et al. Effects of liposomal phosphatidylserine on phagocytic uptake of liposomes by macrophage-like HL-60RG cell. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 2003; 29: 277-284.

MAREE, D. KUZNETSOVA, N. AND NYOKONG, T. Silicon octaphenoxy phthalocyanines: Photostability and singlet oxygen quantum yields. Journal of photochemical and photobiology A: Chemistry. 2001; 140: 117-125.

MARTÍNEZ. et al. Tratamiento de las micosis profundas. Acta medica. 1998; 8: 80-85.

MERLIN, J. L. et al. The multidrug resistance modulator SDZ-PSC 833 Potentiates the photodynamic activity of chlorin e6 independently of p-glycoprotein in multidrug resistant human breast adenocarcinoma cel. International journal of oncology. 2003; 22: 733-739.

MESA. et al. Antileishmania action of organometallic complexes of Pt(II) and Rh(II). Memórias Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 1996; 91: 625-633.

METSELAAR, J. et al. A novel family of L-amino acid-based biodegradable polymer-lipid conjugates for the development of long-circulating liposomes with effective drug-targeting capacity. Bioconjugate Chem. 2003; 14: 1156-1164.

MORILLA, M. et al. Etanidazole in pH-sensitive liposomes: Design, characterization and in vitro/ in vivo anti-*Trypanosoma cruzi* activity. Journal of Controlled Release. 2005; 103: 599-607.

MORILLA M. et al. Etanidazole in pH-sensitive liposomes: Design, characterization and in vitro/in vivo anti-*Trypanosoma cruzi* activity. Journal of Controlled Release. 2005; 103: 599-607.

MOSKOWITZ, P. AND KURBAN, A. Treatment of cutaneous leishmaniasis: retrospectives and advances for the 21<sup>st</sup> century. Clinics in Dermatology. 1999; 17: 305-315.

MOSMAN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxic assay. Journal Immunology Methods. 1983; 65:55-63.

NAGY B., CHIU AND SEPAROVIC D. Fumorisin B1 does not prevent apoptosis in A431 human epidermoid carcinoma cell after photosensitization with a silicon phthalocyanine. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2000; 57: 132-141.

OLIVEIRA, MACHADO AND PESSINE F. Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. Chemistry and Physics of Lipids. 2005; 133: 69-78.

OTAKE. et al. Development of a new preparation method of liposomes using supercritical carbon dioxide. *Langmuir*. 2001; 17: 3898-3901.

PAPAHADJOPOULOS, D. *Pharmacol. Rev.* 1999 ; 5 : 691-743.

PARIS, C. et al. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*. 2004; 48: 852–859.

WHO, 1995 Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. [cited 12 ene., 2005]. Available from internet: <URL: <http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>>.

KING, R., CAMPBELL-LENDRUM D. AND DAVIES, C. Predicting Geographic Variation in Cutaneous Leishmaniasis. *Colombia Emerging Infectious Diseases*. 2004; 10: 258-264.

REDDAN, J. et al. Immunosuppressive effects of silicon phthalocyanine photodynamic therapy. *Photochemistry and photobiology*. 1999; 70: 72-77.

ROMERO, E. et al. On the mechanism of hepatic transendothelial passage of large liposomes. *FEBS Letters*. 1999; 448: 193-196.

ROSE, J., NEAL, J., AND KOPACZ, D. Extended-Duration Analgesia: Update on Microspheres and Liposomes. *Regional Anesthesia and Pain Medicine*. 2005; 30: 275–285.

ROTHKOPF et al. Uptake of phosphatidylserine-containing liposomes by liver sinusoidal endothelial cells in the serum-free perfused rat liver. *Biochimica et biophysica acta*. 2005; 1668: 10-16.

RUDENKO et al. Structure of the LDL receptor extracellular domain at endosomal pH. *Science*. 2002; 298: 2353-2358.

SALEM, I, FLASHER, D., AND DUZGUNES, N. Liposome-Encapsulated Antibiotics. *Methods in enzymology*, 2005; 391: 261-291.

SCARMATO. et al. A vehicle for photodynamic therapy of skin cancer: influence of dimethylsulphoxide on 5-aminolevulinic acid in vitro cutaneous permeation and in vivo protoporphyrin IX accumulation determined by confocal microscopy. *Journal of controlled release*. 2000; 65: 359-366.

SERENO, M. et al. Axenically Grown Amastigotes of *Leishmania infantum* Used as an In Vitro Model To Investigate the Pentavalent Antimony Mode of Action. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 1998; 42: 3097-3102.

SHARMAN, W., ALLEN, C. AND VAN LIER, J. Photodynamic therapeutics: basis principles and clinical applications. *DDT*. 1999; 4: 507-517.

SINICO, C. et al. Liposomes as carriers for dermal delivery of tretinoin: in vitro evaluation of drug permeation and vesicle–skin interaction. *Journal of Controlled Release*. 2005; 103: 123–136.

SULKOWSKI, W. et al. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. *Journal of molecular structure*. 2005; XX: 1-11.

TOLEDO. et al. Immunochemotherapy in american cutaneous leishmaniasis: Immunological aspects before and after treatment. *Memoria instituto Oswaldo Cruz*. Rio de Janeiro. 2001; 96: 89-98.

TRAVI B., TABARES, C., CADENA H., FERRO, C., AND OSORIO, Y. Canine visceral leishmaniasis in Colombia: relationship between clinical and parasitologic status and infectivity for sand flies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 2001; 64: 119–124.

TRIPATHI AND GUPTA, C. Transbilayer translocation of membrane phosphatidylserine and its role in macrophages invasion in *Leishmania* promastigotes. *Molecular & Biochemical parasitology.* 2003; 128: 1-9.

UBHAYASEKERA, S., VERLEYEN, T. AND DUTTA, P. Evaluation of GC and GC-MS methods for the analysis of cholesterol oxidation products. *Food chemistry.* 2004; 84: 149-157.

VARNES, M. et al. Photodynamic therapy-induced apoptosis in lymphoma cell: translocation of cytochrome c causes inhibition of respiration as well as caspase activation. *Biochemical and biophysical research communication.* 1999; 255: 673-679.

VELEZ I., HENDRICKX E., ROBLEDO S. Y AGUDELO S. En: *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro. Leishmaniosis cutânea en Colombia y género.* 2001; 17: 171-180.

VLADIMIROV, Y., OSIPOV, A., AND KLEBANOV, G. Photobiological Principles of Therapeutic Applications of Laser Radiation. *Biochemistry.* 2004; 69: 81-90.

WAINWRIGHT, M., Photodynamic antimicrobial chemotherapy (PACT). *Journal of Antimicrobial Chemotherapy.* 1998; 42: 13.28.

WASZKOWIAK, A. et al. Spectral properties of phthalocyanines incorporated into resting and stimulated human peripheral blood cell. *Acta biochimica polonica.* 2002; 49: 633-641.

WOHRLE, D. et al. Effect of delivery system on the pharmacokinetic and phototherapeutic properties of bis (methoxyethyleneoxy) silicon-phthalocyanine in tumor-bearing mice. *Journal photochemical photobiol: B: Biology*. 1999; 50: 124-128.

WORLD ORGANIZATION OF THE HEALTH. Programme for the surveillance and control of leishmaniasis. [on line]. [cited 2005-06-12]. Available from internet: <URL:<http://www.who.int/emc/diseases/leish/index.html>>.

YÉPEZ, J., SCORZA, J. Quimioterapia de la leishmaniasis cutánea localizada. *Boletín de malariología y salud ambiental*. 2003; XLIII: 893-896.

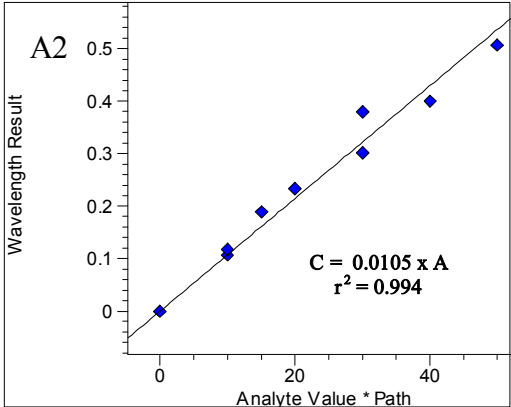
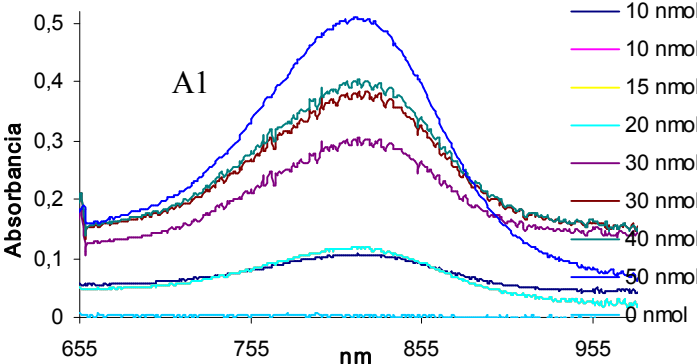
## APÉNDICE 1.

**Cuantificación de fosfolípidos.** Para determinar la relación lipido:ftalocianina de los liposomas se utilizó el método de Bartlett para la cuantificación de fosfatos (Botcher, 1961), consiste en la reacción del molibdeno Mo con los aniones fosfato ( $\text{PO}_4^{-3}$  de los fosfolípidos) para formar heteropoliácidos que a su vez reaccionan en medio ácido con iones tartrato y amonio, formando el molibdofosfato de amonio de coloración azul, el cual es cuantificado por espectrometría a 818 nm.

Procedimiento: Se coloca de 1-5  $\mu\text{L}$  de muestra en un tubo de ensayo, agregar 0.2 mL de  $\text{HClO}_4$  al 70 %. Calentar durante 30 minutos a 180-190  $^\circ\text{C}$ , luego se dejan enfriar durante 15 minutos, luego adicionar 2 mL de una solución de  $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (preparado con 2.2 g de este reactivo, 14,3 mL de  $\text{H}_2\text{SO}_4$  y aforada a 1 litro con agua destilada) y 0.25 mL de ácido ascórbico al 10 %. Calentar en baño María durante 10 minutos.

Luego se retiran los tubos y enfriar con agua de la llave, finalmente se mide la absorbancia a 818 nm. Para cuantificar las concentración de fosfatos se elaboró una curva de calibración a partir de una solución de fosfatos (596,6 mg de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  en 100 mL de agua destilada) en un rango de concentraciones entre 10-50 nmol la cual fue tratada de igual forma que la muestra de liposomas.

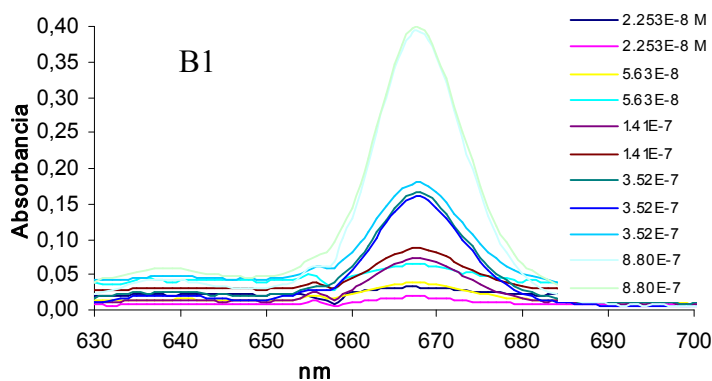
**Figura A.** Curva de calibración de fosfolípidos (A1) Espectro de absorción UV/vis del complejo molibdofosfato de amonio a diferentes concentraciones;  $\lambda_{\text{máx}} = 818 \text{ nm}$ . (A2) Curva de calibración de fosfatos (fosfolípidos).

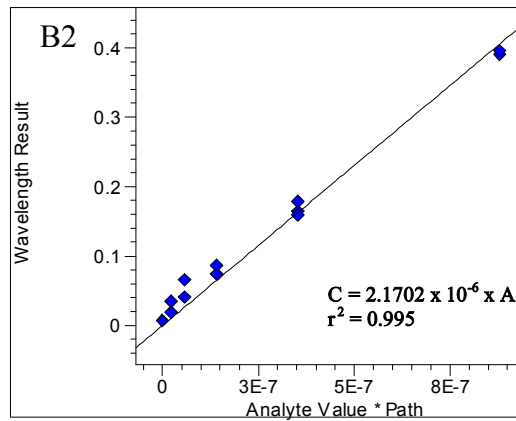


## APÉNDICE 2.

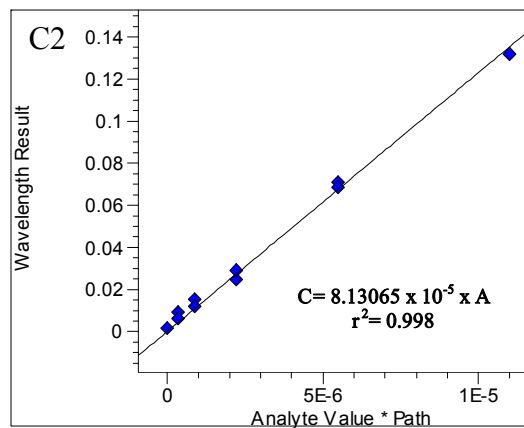
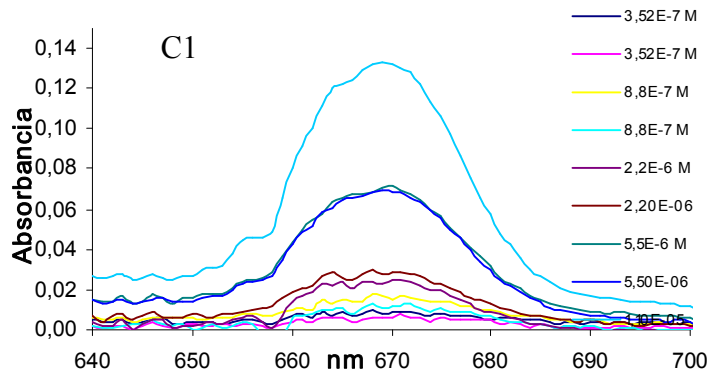
**Cuantificación de la ftalocianina incorporada en los liposomas.** Se determinó la relación lípido: ftalocianina a partir de la concentración de la ftalocianina en las suspensiones liposomales. Para determinar la concentración de la ftalocianina en estas suspensiones se determinó previamente la concentración de fosfolípidos en cada una de ellas. Luego se preparó una curva de calibración de la ftalocianina en solvente orgánico (THF para la TriHex y DMF para la PcSiCl<sub>2</sub>) en un rango de concentraciones entre  $2.25 \times 10^{-8}$  a  $8.80 \times 10^{-7}$  M en el caso de la TriHex y de  $3.57 \times 10^{-7}$  a  $1 \times 10^{-5}$  M para la PcSiCl<sub>2</sub>, adicionando a cada patrón de TriHex, 192  $\mu$ L de la suspensión liposomal que no contiene ftalocianina (BPC) y 253  $\mu$ L para la PcSiCl<sub>2</sub>, estos liposomas son adicionados para restar el efecto que tiene los lípidos que están presentes en la muestra de cada formulación liposomal que se quiere analizar.

**Figura B.** Curva de calibración de TriHex (B1) Espectro de absorción UV/vis de la TriHex a diferentes concentraciones;  $\lambda_{\text{máx}} = 670$  nm. (B2) Curva de calibración para la cuantificación de TriHex a 670 nm.





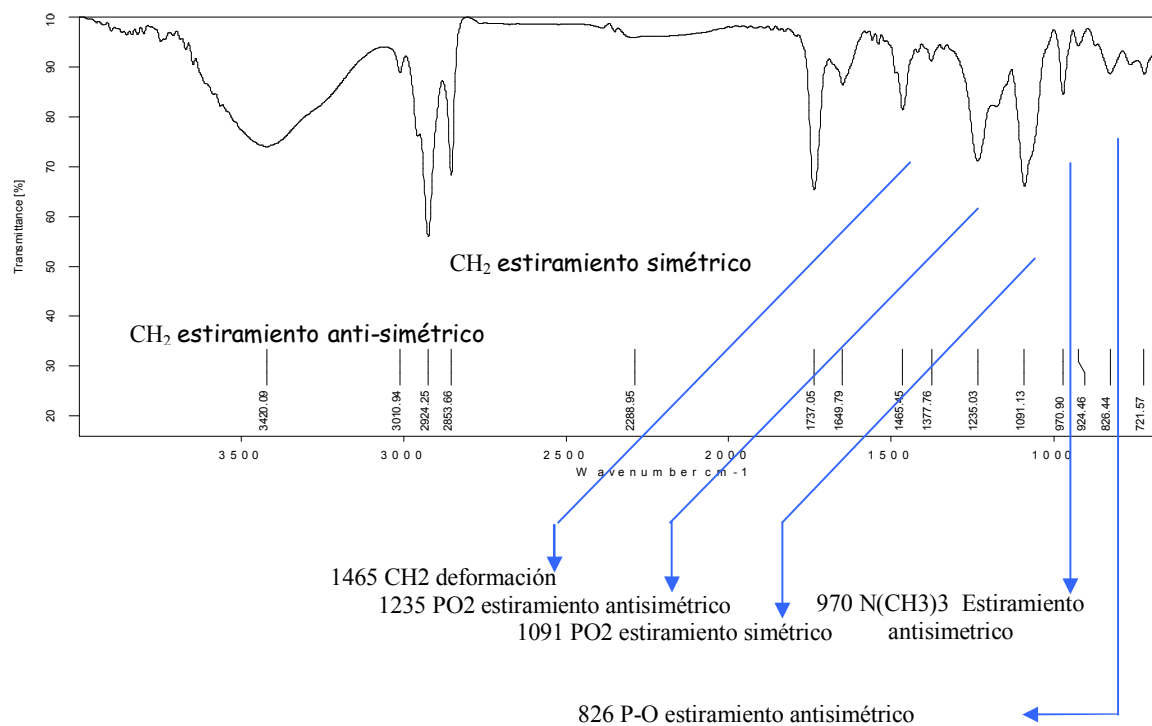
**Figura C.** Curva de calibración de la  $\text{PcSiCl}_2$  (C1) Espectro de absorción UV/vis de la a  $\text{PcSiCl}_2$  a diferentes concentraciones;  $\lambda_{\text{máx}} = 670 \text{ nm}$ . (C2) Curva de calibración para la cuantificación de  $\text{PcSiCl}_2$  a 670 nm.



### APÉNDICE 3.

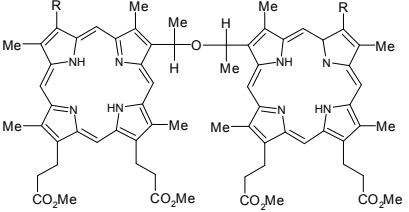
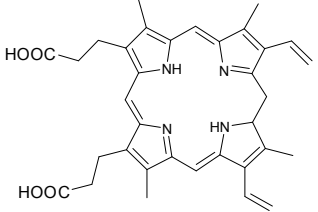
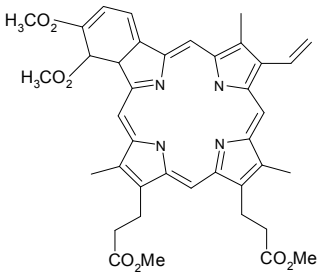
**Purificación de la fosfatidilcolina.** Debido a que la fosfatidilcolina contenía 35 % de impurezas, estas se trataron de eliminar lavando varias veces este lípido con acetona. Se tomó 1 g de fosfatidilcolina y gel de sílice, aproximadamente el doble del volumen de la fosfatidilcolina. Estos sólidos fueron depositados en un vaso de precipitados y se adiciono 5 mL de acetona, con una varilla de agitación se homogenizó esta mezcla y posteriormente se retiró la acetona. A la fracción de acetona se le tomó un espectro Uv/Vis y se continuó adicionando porciones de acetona pura, hasta que desaparecieron las bandas en la región visible del espectro Uv / Vis correspondientes a un porcentaje de impurezas. Inmediatamente después, la fosfatidilcolina fue disuelta en cloroformo y filtrada para retirar el gel de sílice. Finalmente se tomó un espectro infrarrojo con el que comprobamos que fosfatidilcolina no había sufrido ninguna modificación.

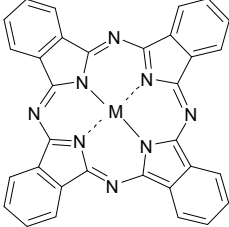
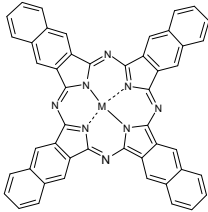
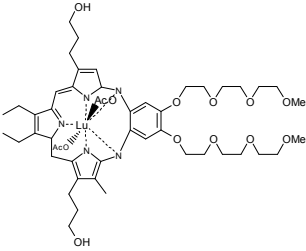
**Figura D.** Espectro infrarrojo de la fosfatidilcolina.



## APÉNDICE 4.

**Tabla A.** Fotosensibilizadores de primera y segunda generación

Fotosensibilizadores “ primera generación”	λ de máxima absorción	Coeficiente e extinción M <sup>-1</sup> cm <sup>-1</sup>	Duración del fotosensibilizador en la piel
<p><b>Fotofrin</b></p> 	630 nm	$3.0 \times 10^3$	2-3 meses
<p><b>Protoporfirinogeno IX</b></p> 	630 nm	$3.0 \times 10^3$	2-3 meses
<p><b>Verteporfina</b></p> 	630 nm	$3.0 \times 10^3$	2-3 meses

fotosensibilizadores “segunda generación”	$\lambda$ de máxima absorción	Coeficiente e extinción $M^{-1}$ $cm^{-1}$	Duración del fotosensibilizador en la piel			
<p data-bbox="350 396 651 428">Ftalocianinas metálicas</p> 	670-680 nm	$2.5 \times 10^5$	8-10 días			
<p data-bbox="399 711 602 743">Naftalocianinas</p> 				750-780 nm	$>2.5 \times 10^5$	----
<p data-bbox="428 1005 574 1037">Texaprinas</p> 				730 nm	$4.2 \times 10^4$	Mínimo