

**ACTIVIDAD FOTOTÓXICA *IN VITRO E IN VIVO* DE FTALOCIANINA DE  
ALUMINIO CLORADA CONTRA *Leishmania amazonensis***

**INDIRA PAOLA HERNÁNDEZ PEÑARANDA**

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

**ACTIVIDAD FOTOTÓXICA *IN VITRO E IN VIVO* DE FTALOCIANINA DE  
ALUMINIO CLORADA CONTRA *Leishmania amazonensis***

**INDIRA PAOLA HERNÁNDEZ PEÑARANDA**

**Tesis de grado como requisito para optar al título de  
MAESTRO EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS**

**Directora:**

**PATRICIA ESCOBAR RIVERO  
BACTERIÓLOGA, M.Sc., Ph.D.**

**Asesora:**

**SARA MARIA ROBLEDO RESTREPO  
BACTERIÓLOGA, M.Sc., Ph.D.**

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

## **AGRADECIMIENTOS**

A mi familia por su amor incondicional y la fe depositada en mí a pesar de las adversidades.

A Patricia Escobar por su voto de confianza e invaluable compromiso con mi formación científica.

A Diana Zamora, Wilfredo Valdivieso, Henry Gómez, Sandra Sanabria, Jairo Bayona, Sergio Gómez y Sandra Leal por la amistad construida a través de todos estos años.

Al CINTROP por proporcionar el espacio y los elementos necesarios para el desarrollo de la tesis y por la calidad humana de sus integrantes.

A Sara María Robledo y a todo el equipo del PECET por su excelente trabajo, responsabilidad y acompañamiento durante el proceso de formación.

Al Instituto Colombiano Francisco José de Caldas “COLCIENCIAS”, a la Vicerrectoría de Investigación y Extensión y a la maestría en ciencias básicas biomédicas de la UIS por el apoyo financiero para la realización de la maestría, la asistencia al 4to Congreso Mundial de Leishmaniasis y la pasantía realizada en el PECET de la Universidad de Antioquia.

A los profesores Rafael Cabanzo, Julio Cesar Mantilla, Luis Carlos Orozco y Hernando Arias Páez por sus valiosas asesorías las cuales fueron fundamentales en la fase experimental y en el análisis de los datos.

## CONTENIDO

	Pág.
INTRODUCCION	17
1. OBJETIVOS	19
1.1 OBJETIVO GENERAL	19
1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	19
2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE	20
2.1 LEISHMANIASIS	20
2.1.1 Generalidades	20
2.1.2 Ciclo de Vida.	22
2.2 TRATAMIENTO EN LEISHMANIASIS	23
2.3 TRATAMIENTOS TÓPICOS	27
2.4 TRATAMIENTOS FÍSICOS	30
2.5 LA TERAPIA FOTODINÁMICA (TFD)	32
2.5.1 Fundamento	32
2.5.2 Fotosensibilizadores	33
2.5.3 Modelos experimentales in vivo utilizados en cáncer para el estudio de la TFD	35
2.5.4 Estudios de la TFD en leishmaniasis.	37
2.5.4.1 PpIX	37
2.5.4.2 Fenotiazinas	38
2.5.4.3 Ftalocianinas.	38
3. METODOLOGÍA	40

3.1 MATERIALES	40
3.1.1 Parásitos	40
3.1.2 Células	42
3.1.3 Compuestos	42
3.1.4 Preparación de soluciones stocks y formulaciones	42
3.1.5 Sistema de irradiación	44
3.2 ENSAYOS <i>IN VITRO</i>	45
3.2.1 Actividad fototóxica de los FS en células THP-1	45
3.2.2 Actividad fototóxica de los FS en promastigotes	46
3.2.3 Actividad fototóxica de los FS en amastigotes axénicos	46
3.2.4 Actividad fototóxica en amastigotes intracelulares	47
3.2.5 Detección de especies reactivas de oxígeno (ERO)	47
3.2.6 Análisis estadístico	48
3.2.6.1 Actividad de los FS en parásitos y células	48
3.2.6.2 Actividad de la PcAlCl en el número de amastigotes por células (APC).	49
3.2.6.3 Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).	49
3.3 ENSAYOS <i>IN VIVO</i>	49
3.3.1 Animales.	49
3.3.2 Infección	50
3.3.3 Grupos experimentales	50
3.3.4 Tratamiento	50
3.3.5 Evaluación de la eficacia del tratamiento con la PcAlCl	51
3.3.5.1 Eficacia clínica	51

3.3.5.2 Eficacia parasitológica	53
3.3.6 Toxicidad y efectos adversos de la PcAlCl en hámsteres	53
3.3.7 Registro fotográfico de lesiones	54
3.3.8 Análisis Estadístico	54
3.3.8.1 Eficacia clínica	54
3.3.8.2 Eficacia parasitológica y toxicidad de la PcAlCl	54
3.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS	54
4. RESULTADOS	56
4.1 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS FOTOSENSIBILIZADORES (FS)	56
4.1.1 Soluciones utilizadas en los experimentos in vitro	56
4.1.2 Formulaciones utilizadas en los experimentos in vivo	57
4.2 ESPECTRO DE EMISIÓN DEL SISTEMA DE IRRADIACIÓN	59
4.3 MONITOREO DE LA TEMPERATURA DURANTE EL PERIODO DE IRRADIACIÓN	59
4.4 ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE LOS FS	60
4.4.1 Las células THP-1 fueron fotosensibles al tratamiento con los FS.	60
4.4.2 Los promastigotes y amastigotes axénicos de <i>L. amazonensis</i> fueron fotosensibles al tratamiento con los FS.	60
4.4.3 Los amastigotes intracelulares de <i>L. amazonensis</i> infectando células THP-1 fueron fotosensibles al tratamiento con PcAlCl.	60
4.4.4 La Anfotericina B fue activa contra los parásitos	63
4.4.5 Efecto de la irradiación sobre las células y los parásitos	64
4.4.6 Efecto de los FS sobre células y parásitos en condiciones de oscuridad	64
4.4.7 Índice de Fototoxicidad	64

4.5 EL TRATAMIENTO CON LOS FS INDUCE LA FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXGENO (ERO)	64
4.6 ACTIVIDAD FOTOTÓXICA <i>IN VIVO</i> DE LA PcAICI	65
4.6.1 Eficacia clínica	66
4.6.1.1 La TFD con la PcAICI-S fue efectiva para todos los animales con lesiones de LC.	66
4.6.1.2 La TFD- PcAICI con gel no fue efectiva para todos los animales.	67
4.6.1.3 Actividad del glucantime en los hámsteres infectados con LC	72
4.6.1.4 Análisis de los resultados	72
4.6.2 Eficacia parasitológica	72
4.6.3 Toxicidad del tratamiento en hámsteres	73
5. DISCUSION	76
6. CONCLUSIONES	86
7. RECOMENDACIONES	88
BIBLIOGRAFIA	89

## LISTA DE TABLAS

	<b>Pág.</b>
Tabla 1. Especies de <i>Leishmania</i> y manifestaciones clínicas	21
Tabla 2. Esquema de tratamientos utilizados en Colombia para la leishmaniasis	27
Tabla 3. Fotosensibilizadores usados actualmente con aplicaciones clínicas	36
Tabla 4. Estructura química de los compuestos utilizados en este trabajo	43
Tabla 5. Actividad <i>in vitro</i> de los compuestos en estudio	62
Tabla 6. Eficacia clínica en los grupos experimentales evaluados	69
Tabla 7. Registro individual del tamaño de la lesión (mm <sup>2</sup> ) y el porcentaje de reducción de los hámsteres incluidos en el estudio.	70
Tabla 8. Efecto del tratamiento en niveles séricos de ALT, creatinina y BUN en los hámsteres infectados con <i>L. amazonensis</i>	75

## LISTA DE FIGURAS

	Pág.
Figura 1. Ciclo de vida de <i>Leishmania sp</i>	23
Figura 2. Diseño experimental	41
Figura 3. Lámpara de luz visible LumaCare	45
Figura 4. Grupos experimentales evaluados <i>in vivo</i>	52
Figura 5. Espectro de absorción de la PcAICI y la PcAICIS <sub>2</sub>	56
Figura 6. Espectro de absorción de la PcAICI en una solución de Agua tipo I: DMSO: Tween 80	57
Figura 7. Espectro de absorción de la PcAICI en una solución de Agua tipo I: DMSO: Tween 80: Isopropanol: Propilenglicol	58
Figura 8. Espectro de emisión de la lámpara LUMACARE.	59
Figura 9. Efecto del tratamiento con PcAICI en el número de amastigotes por célula (APC)	63
Figura 10. Efecto de la PcAICI y PcAICIS <sub>2</sub> en la inducción de ERO en promastigotes	65
Figura 11. Aspecto de las lesiones en hámsteres tratados e irradiados con la PcAICI-S	68
Figura 12. Aspecto de las lesiones en hámsteres tratados con PcAICI-S sin irradiar y con el vehículo-S	69
Figura 13. Eficacia parasitológica de la PcAICI-S y PcAICI-G en hámsteres infectados con <i>L. amazonensis</i>	73
Figura 14. Efecto en el peso de hámsteres que recibieron tratamiento con PcAICI (solución y gel) y Glucantime.	74

## ABREVIATURAS

ALA	Ácido delta aminolevulínico
ALT	alanino-aminotransferasa
AnB	anfotericina B
APC	amastigotes por célula
ABC	área bajo la curva
BUN	nitrógeno ureico en sangre
c.m.	campo microscópico
CC <sub>50</sub>	Concentración citotóxica 50
CC <sub>90</sub>	Concentración citototóxica 90
CI <sub>50</sub>	Concentración inhibitoria 50
CI <sub>90</sub>	Concentración inhibitoria 90
DCFH	2',7' -diclorofluorescein diacetato
DE	desviación estándar
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERO	Especies reactivas de oxígeno
FS	Fotosensibilizador
HpD	Derivado de hematoporfirina
IF	Índice Fototóxico
IM	Intramuscular
IS	Índice de Selectividad
J/cm <sup>2</sup>	Julios/centímetro cuadrado
LC	Leishmaniasis cutánea
LCD	Leishmaniasis cutánea difusa
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LV	Leishmaniasis visceral
MTT	Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-difeniltetrazolio)
N.D.	No determinada

nm	nanometro
OMS	Organización mundial de la salud
$O_2^-$	Anión superóxido
$^1O_2$	Oxígeno singlete
PBS	Bufer fosfato salino
PcAlCl	ftalocianina de aluminio clorada
PcAlCl-G	ftalocianina de aluminio clorada en gel
PcAlCl-S	ftalocianina de aluminio clorada en solución
PcAlClS <sub>2</sub>	ftalocianina de aluminio clorada disulfonada
PM	Paromomicina
PMA	Forbol miristato acetato
PpIX	Protoporfirina IX
PpIX-ALA	Protoporfirina IX producida a partir de ALA
SBFi	Suero bovino fetal inactivado
Sb <sup>V</sup>	Antimonio pentavalente
Sb <sup>III</sup>	Antimonio trivalente
TFD	Terapia fotodinámica
TFD-PcAlCl	Terapia fotodinámica utilizando ftalocianina de aluminio clorada
U.A.	Unidades arbitrarias
UV-Vis	Ultravioleta visible
Vehículo-G	vehículo en gel.
Vehículo-S	vehículo en solución.

## RESUMEN

**TITULO:** ACTIVIDAD FOTOTÓXICA *IN VITRO* E *IN VIVO* DE FTALOCIANINA DE ALUMINIO CLORADA CONTRA *Leishmania amazonensis*

**AUTORES:** HERNANDEZ PEÑARANDA, Indira Paola; ROBLEDO RESTREPO, Sara María; ESCOBAR RIVERO, Patricia\*\*

**PALABRAS CLAVES:** *Leishmania*, terapia fotodinámica, ftalocianina de aluminio clorada, tratamiento tópicos, hámsteres, leishmaniasis cutánea,

### DESCRIPCIÓN:

La terapia fotodinámica (TFD) constituye una alternativa terapéutica en leishmaniasis. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de la TFD utilizando ftalocianina de aluminio clorada (TFD-PcAlCl) *in vitro* y en hámsteres infectados con *Leishmania amazonensis*.

Parásitos de *L. amazonensis* y células THP-1 fueron tratados con la PcAlCl y la PcAlClS<sub>2</sub> e irradiados con 3 J/cm<sup>2</sup>. La actividad de los compuestos fue determinada por MTT y recuento microscópico, los resultados fueron expresados en concentración inhibitoria 50 y 90 (CI<sub>50</sub> y CI<sub>90</sub>). Hámsteres dorados infectados con *L. amazonensis* fueron tratados tópicamente con 100 µg de PcAlCl (en solución y gel) e irradiados con 50 J/cm<sup>2</sup> en cuatro sesiones. Luego de 12 semanas se determinó el porcentaje de cura de las lesiones y el número de amastigotes en biopsias de piel. Los efectos tóxicos inducidos por la TFD-PcAlCl en hámsteres fueron determinados.

La TFD-PcAlCl fue fototóxica en promastigotes, amastigotes axénicos e intracelulares con actividades de CI<sub>50</sub> de 0,014; 0,004 y 0,377 µM respectivamente. La TFD-PcAlClS<sub>2</sub> fue menos fotoactiva que la TDF-PcAlCl. En los experimentos *in vivo*, el 100% de los hámsteres tratados con TFD-PcAlCl en solución curaron las lesiones. El 40% del grupo tratado con PcAlCl no irradiado y el 29 % del grupo tratado con el vehículo curaron. La PcAlCl en gel curó en el 20% de hámsteres. Se observó una reducción en el número de parásitos en las biopsias de piel en los grupos tratados con TFD-PcAlCl en solución y en gel, No hubo alteraciones en el peso y en las pruebas de función hepática y renal en ninguno de los grupos tratados.

El trabajo muestra el potencial de la TFD-PcAlCl para el tratamiento de la Leishmaniasis cutánea. La optimización en esquemas de tratamiento y elaboración de nuevas formulaciones deben tenerse en cuenta para ensayos clínicos futuros.

---

\* Tesis de grado. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

\*\* Facultad de Salud. Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas. Director de tesis: PATRICIA ESCOBAR RIVERO BACTERIÓLOGA, M.SC., PH.D.

## ABSTRACT

**TITLE:** *IN VITRO* AND *IN VIVO* PHOTOTOXIC ACTIVITY OF ALUMINUM PHTHALOCYANINE CHLORIDE AGAINST *Leishmania amazonensis*

**AUTHORS:** HERNANDEZ PEÑARANDA, Indira Paola; ROBLEDO, Sara María; ESCOBAR RIVERO, Patricia\*

**KEYWORDS:** *Leishmania*, photodynamic therapy, aluminium phthalocyanine chloride, *in vivo* assays, *in vitro* assays

### ABSTRACT

Photodynamic therapy (PDT) is a therapeutic alternative on Leishmaniasis. In this work we evaluated the *in vitro* and *in vivo* PDT with Aluminium phthalocyanine chloride P<sub>6</sub>AlCl<sub>4</sub> (PDT-AIPcCl) against *L. amazonensis*.

*L. amazonensis* parasites and THP-1 cells were treated with AIPcCl and AIPcCl<sub>2</sub> irradiated with 3 J/cm<sup>2</sup>. The inhibition parasite and cell cytotoxicity was determinate by MTT assay and microscopic recount. The results were expressed as inhibitory concentration 50 and 90 (IC<sub>50</sub> y IC<sub>90</sub>). Golden hamsters infected with *L. amazonensis* were treated topically with AIPcCl (solutions and gel) and irradiated with 50 J/cm<sup>2</sup>. After 12 weeks post-treatment the cure percent of lesions was determinated and the amastigote number on skin biopsies. The toxic effects induced by PDT-AIPcCl in hamsters were also determinate.

PDT- AIPcCl was phototoxic on promastigotes, axenic and intracellular amastigotes with activity IC<sub>50</sub> 0,014; 0,004 and 0,377 μM respectively. PDT-AIPcCl<sub>2</sub> was less phototoxic than PDT-AIPcCl. On *in vivo* experiments, the 100% hamsters with lesions treated with PDT-AIPcCl on solutions were healed. The 40% of treated group with AIPcCl no irradiated and the 29% of treated group with vehicle were healed. The 20% hamsters treated with AIPcCl in gel were healed. A reduction in the parasite number on skin biopsies of group treated with AIPcCl on solution and gel was observed. No changes were observed in the weight of the animals and in liver and renal function in either treatment group.

This work shows the potential of PDT-AIPcCl for treatment of cutaneous leishmaniasis. The optimization on treatment regimens and development of new formulations should be considered for future clinical trials.

---

\* Thesis of grade of Master in Basic Biomedical Science

\*\* Faculty of Health, Master in Basic Biomedical Science, Thesis director. PATRICIA ESCOBAR RIVERO BACTERIOLOGA, M.SC., PH.D.

## INTRODUCCION

La leishmaniasis es considerada un grave problema de salud pública que afecta a millones de personas en todo el mundo (Desjeux, 2004). Existen pocas alternativas terapéuticas para esta enfermedad siendo estas inapropiadas en costos, toxicidad, efectos adversos y resistencia (Croft *et al.*, 2006, Ameen, 2010). El desarrollo de medicamentos seguros, eficaces y económicos ha sido propuesto como uno de los mecanismos de control de la enfermedad (OMS, 2006). Sin embargo, el bajo poder adquisitivo de los pacientes enfermos y de los países en donde esta es endémica desalienta la inversión de la industria farmacéutica para la investigación de los mismos (<http://www.dndi.org>)

La terapia fotodinámica (TFD) es una modalidad terapéutica utilizada en enfermedades neoplásicas y de la piel (Fien & Oseroff, 2007, Kendall & Morton, 2003). En ella la interacción de un fotosensibilizador (FS) excitado con luz visible y oxígeno molecular conllevan a la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO) y final destrucción de la célula blanco (Hopper, 2000). Los reportes de TFD en *Leishmania* sp son escasos. Algunos estudios *in vivo* con FS como fenotiazinas, porfirinas y ácido delta aminolevulínico (ALA) demuestran el potencial terapéutico de la TFD contra esta enfermedad (Akilov *et al.*, 2006a, Gardlo *et al.*, 2003, Asilian & Davami, 2006). Sin embargo, a la fecha no se cuenta con un FS ideal para el tratamiento. La ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) es un FS químicamente estable, fácil de sintetizar y con un excelente margen de seguridad en ensayos preclínicos (Chan *et al.*, 1997, Pushpan *et al.*, 2002). Nosotros encontramos previamente que promastigotes de *L. panamensis* y *L. chagasi* eran altamente fotosensibles a la TFD utilizando la PcAlCl (TFD-PcAlCl) (Escobar *et al.*, 2006). Hasta este trabajo no se conocía la actividad de la TDF utilizando formulaciones tópicas de PcAlCl en Leishmaniasis cutánea (LC) experimental. Para determinar el uso potencial de la TFD-PcAlCl en LC, se planteó como

objetivo evaluar el efecto fototóxico de la PcAICI contra los diferentes estadios del parásito y en hámsteres infectados con *L. amazonensis*.

El manuscrito presenta inicialmente una breve revisión sobre aspectos generales de la enfermedad, su agente etiológico y el panorama actual del tratamiento para la leishmaniasis enfocado hacia los tratamiento tópicos. Posteriormente define aspectos importantes de la TFD, su mecanismo de acción y muestra la aplicación y desarrollo que esta ha tenido en el tratamiento de la leishmaniasis en los últimos tiempos.

Como observaran en los resultados encontrados, este trabajo contribuye al propósito de implementar la TFD-PcAICI como alternativa terapéutica en leishmaniasis. Así mismo proporciona información importante a la comunidad científica sobre el potencial uso de la PcAICI en el tratamiento de la LC y fija algunas las pautas necesarias para la optimización del tratamiento en ensayos posteriores.

## 1. OBJETIVOS

### 1.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto fototóxico de la ftalocianina de aluminio clorada en *Leishmania amazonensis*.

### 1.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

Determinar el efecto fototóxico *in vitro* de la ftalocianina de aluminio clorada en promastigotes, amastigotes axénicos e intracelulares de *Leishmania amazonensis* y en células THP-1.

Evaluar la eficacia clínica y parasitológica de la terapia fotodinámica con ftalocianina de aluminio clorada en hámsteres infectados con *Leishmania amazonensis*.

## 2. MARCO TEORICO Y ESTADO DEL ARTE

### 2.1 LEISHMANIASIS

**2.1.1 Generalidades.** La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades causada por más de 20 especies de protozoarios hemoflagelados del género *Leishmania* sp (Tabla 1), los cuales son transmitidos al humano por más de 30 especies de vectores del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* en el Viejo y Nuevo Mundo respectivamente (Herwaldt, 1999, Reithinger *et al.*, 2007). Pertenece al grupo de las llamadas “enfermedades olvidadas” ya que no dispone de tratamientos adecuados y existe poco interés por empresas del sector público y privado en implementar actividades de investigación, prevención y control ya que la mayoría de personas que la padecen son de bajo poder adquisitivo (<http://www.dndi.org>)

La leishmaniasis se considera un grave problema de salud pública a nivel mundial donde 350 millones de personas están en riesgo de contraer la enfermedad, 12 millones se encuentran actualmente infectados y se estima que ocurren 2 millones de casos nuevos anuales. Es endémica en aproximadamente 88 países. El 90% de los casos de leishmaniasis visceral (LV) ocurren en India, Bangladesh, Nepal, Sudan, Brasil y Etiopía, mientras que el 90% de los casos de leishmaniasis cutánea (LC) son reportados en Afganistán, Algeria, Brasil, Irán Perú, Arabia Saudí y Siria, Colombia, Perú y Bolivia (Desjeux, 2004, Modabber *et al.*, 2007).

En Colombia la situación es alarmante debido al incremento de casos de LC. En el 2005 el número de casos con respecto al 2004 había aumentado en un 21%, siendo LC la manifestación clínica más común de la enfermedad en nuestro país con un 99,34% producida principalmente por *L. panamensis* (Zambrano, 2006). El notorio aumento de casos en los últimos años es atribuible al aumento de las actividades humanas en ambientes silvestres en donde existe transmisión enzoótica; a cambios en los entornos de transmisión que ahora incluyen el

peridomicilio y el domicilio y zonas periurbanas, así como a factores sociales y de orden público que favorecen el riesgo de la infección en la población (Saravia & Nicholls, 2006, Beyrer *et al.*, 2007).

**Tabla 1. Especies de Leishmania y manifestaciones clínicas**

<b>Especie implicada</b>	<b>Manifestación clínica</b>
<b><i>Leishmania del Nuevo Mundo</i></b>	
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LC, LMC
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LC, LMC
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LC
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LC
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	LC
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LC, LV, LCD
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LC, LCD
<i>L. (Leishmania) pifanoi</i>	LC
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	LC
<i>L. (Leishmania) garnhami</i>	LC
<b><i>Leishmania del Viejo Mundo</i></b>	
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	LC, LCD
<i>L. (Leishmania) major</i>	LC
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LC
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	LV, LC
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	LV, LC
<b><i>Leishmania del Nuevo Viejo Mundo</i></b>	
<i>L. (Leishmania) infantum</i>	LV, LC

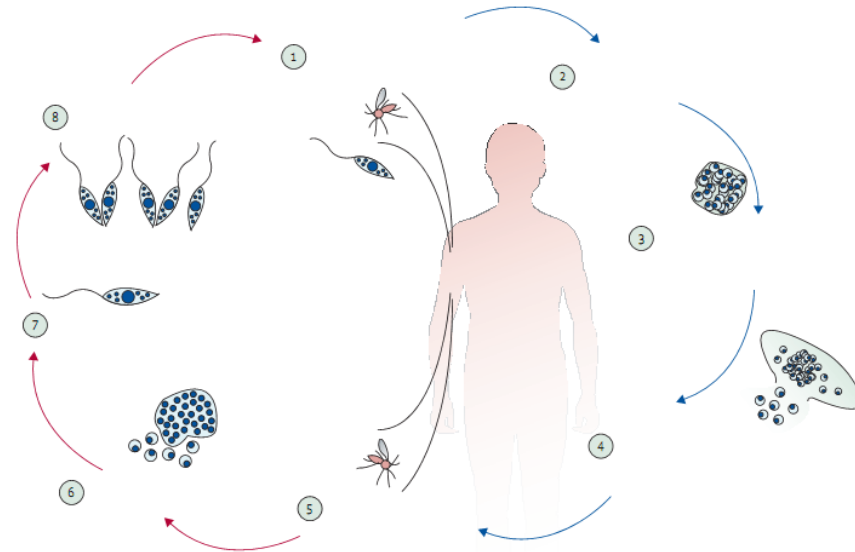
**LC:** Leishmaniasis cutánea, **LMC:** Leishmaniasis mucocutánea, **LCD:** Leishmaniasis cutánea difusa, **LV:** Leishmaniasis visceral.

Fuente: Modificado de Reithinger *et al.*, 2007

La leishmaniasis produce una gama de manifestaciones clínicas las cuales incluyen la leishmaniasis cutánea (LC) caracterizada por el desarrollo de lesiones ulcerativas en piel, que pueden ser únicas o múltiples y en algunos casos curan de manera espontánea mientras que en otros llegan a ser discapacitantes ó dejan cicatrices en el paciente. La leishmaniasis mucocutánea (LMC) causa inflamación destructiva de las mucosas, con lesiones desfigurativas en cara por destrucción de las cavidades oral-nasal y faríngea, es causada en su mayoría por especies del Nuevo Mundo como *L. braziliensis* y *L. guyanensis*. La leishmaniasis cutánea difusa (LCD) se presenta en pacientes con deficiencia en la respuesta inmune mediada por células, se caracteriza por la aparición de nódulos no ulcerativos en piel y la leishmaniasis visceral (LV) conocida como “kala azar” que es la forma más severa de la enfermedad y puede causar la muerte en pacientes que no son tratados, se caracteriza por la presencia de esplenomegalia, hepatomegalia, pérdida de peso, fiebre, linfadenopatía y anemia. Algunos pacientes luego de su recuperación pueden desarrollar una LC crónica conocida como leishmaniasis dérmica post Kala azar (Desjeux, 2004, Herwaldt, 1999).

**2.1.2 Ciclo de Vida.** El ciclo de vida del parásito inicia cuando el vector regurgita los promastigotes metacíclicos (forma infectiva) al alimentarse de la sangre del hospedero mamífero los cuales son fagocitados por los macrófagos u otro tipo de células fagocíticas mononucleares. El parásito accede a los fagolisosomas y habita en la vacuola parasitófora de las células. En este sitio pierden su flagelo, se transforman en amastigotes y pueden replicarse por fisión binaria. Luego, los amastigotes son liberados de la célula hospedera y pueden infectar otras células contiguas y/o acceder a otros órganos. Cuando el vector hembra se alimenta de la sangre de un hospedero infectado, toma células infectadas que llegan hasta el intestino (en el intestino posterior para *Leishmania* del subgénero Viannia, en el intestino medio para el subgénero Leishmania), donde los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos (forma flageada replicativa) y luego migran a la proboscis donde finaliza su ciclo de vida (Figura 1).

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



(1) Un vector infectado al alimentarse de la sangre del hospedero regurgita los promastigotes de *Leishmania* (2) Los cuales son fagocitados por los macrófagos, (3) y luego se convierten en amastigotes en el fagolisosoma, donde se replican por fisión binaria e (4) infectan otros macrófagos. (5 y 6) Un vector sano se alimenta de un hospedero infectado e ingiere células parasitadas. (7) Los amastigotes ingeridos se transforman en promastigotes en el intestino del mosquito se replican y (8) migran a la proboscis hasta la próxima infección.

Fuente: Modificado de Reithinger *et al.*, 2007.

## 2.2 TRATAMIENTO EN LEISHMANIASIS

Los antimonios pentavalentes ( $Sb^V$ ) como el antimonio de meglumina o Glucantime<sup>®</sup> ó el estibogluconato de sodio ó Pentostam<sup>®</sup> han sido utilizados desde hace más de 60 años como los medicamentos de primera línea. A la fecha, no se conoce la estructura exacta de estas moléculas y el mecanismo de acción no ha sido bien definido. Se ha reportado que los  $Sb^V$  se comportan como una prodroga

que al ingresar a la célula es reducido a su forma trivalente  $Sb^{III}$  la cual es tóxica para la *Leishmania* sp (Frezard *et al.*, 2009). Se ha reportado que inhibe la síntesis de ADN, ARN y proteínas del parásito; reduce los niveles de tripanotión y glutatión e induce la fragmentación de ADN y la expresión de fosfatidilserina (Serenio *et al.*, 2001, Berman *et al.*, 1985, Wyllie *et al.*, 2004). Los  $Sb^V$  son utilizados para el tratamiento de todas las formas clínicas de leishmaniasis. Un meta-análisis de 23 estudios mostró que el 76 % de los pacientes con LC del Nuevo Mundo responden a la terapia con  $Sb^V$  siendo la *L. braziliensis* la especie más prevalente en un 87,5% de los casos (Tuon *et al.*, 2008).

Se han observado diferencias en la respuesta al tratamiento con Glucantime según la región estudiada, como en el caso de 310 pacientes en Brasil que mostraron un promedio de cura del 71,3% mientras que en 449 pacientes en Colombia fue del 91,0%. No se han observado diferencias en la actividad entre el Glucantime y el Pentostam (Tuon *et al.*, 2008). La dosis de  $Sb^V$  administrada a los pacientes se ha incrementado en un 612% en los últimos 30 años. A mediados de los 70's la dosis total para un paciente adulto de 65 Kg era de 4,25 g de antimonio (~6,5mg/Kg x 10 días). En 1984 la OMS aumentó la dosis y recomendó que se administrara a un paciente de 65 Kg un total de 26 g (20 mg/Kg por día durante 20 días), criterio que se mantiene vigente hasta el día de hoy (WHO, 1984) Las mayores desventajas que ha presentado este tratamiento son la aparición de cepas resistentes a los antimoniales como es el caso de Bihar en India que en algunas regiones sobrepasa el 50% (Sundar, 2001) y los numerosos efectos adversos como: el dolor en el sitio de la aplicación durante la inyección intramuscular, vómito, náuseas, elevación de transaminasas, mialgias, artralgias, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad, cefalea y diarrea. También se han reportado alteraciones electrocardiográficas, fallas cardíacas y muerte asociada a fibrilación ventricular (Laguna *et al.*, 1999, Oliveira *et al.*, 2009, Sampaio *et al.*, 1997).

En Colombia el tratamiento se basa en el uso del Glucantime el cual es administrado parenteralmente en dosis de 20 mg/Kg durante 20 días para el tratamiento de la LC y 28 días para LMC y LV (Tabla 2). Cuando se presenta falla terapéutica, se administra nuevamente Sb<sup>V</sup> 20 mg/kg por 20 días más. Como medicamento de segunda opción se utiliza el isotianato de pentamidina (Pentacarinat<sup>®</sup>) a una dosis de 3mg/Kg/día que se aplica cuatro veces en días alternos para LC, mientras que en LMC el tratamiento debe aplicarse durante 22 días lo que aumenta los riesgos de toxicidad. En los tratamientos de mayor complejidad se aplica la Anfotericina B (Fungizone<sup>®</sup>), un antibiótico polieno-macrólido producido por *Streptomyces nodosus*. Su mecanismo de acción está relacionado con la afinidad del medicamento por los esteroides que causan la permeabilidad de la membrana celular por la formación de poros acuosos (Brajtburg & Bolard, 1996). Esta se aplica en caso de falla terapéutica con los Sb<sup>V</sup> y para el tratamiento de LMC y LV. La dosis es de 0,5-1,0 mg/Kg durante 20-40 días por administración intravenosa según la respuesta clínica del paciente. La Anfotericina B presenta una excelente actividad leishmanicida y ha sido de gran utilidad en el tratamiento de LMC, LCD y LV (Jha *et al.*, 1995, Rodriguez *et al.*, 1995, Morrison *et al.*). Las mayores limitantes de la Anfotericina B son el costo, la hospitalización del paciente para el tratamiento y los efectos adversos ya que pueden llegar a ser cardiotoxico y nefrotóxico (Clements & Peacock, 1990). El desarrollo de formulaciones lipídicas para el transporte de la anfotericina B ha permitido la reducción de la toxicidad. A la fecha existen 3 formulaciones lipídicas disponibles de Anfotericina B i) en liposomas unilamelares (AmBisome<sup>®</sup>) ii) en dispersión coloidal (Amphocil<sup>TM</sup>) iii) en complejo lipídico (Abelcet<sup>®</sup>). Estas formulaciones han sido evaluadas en todas las formas clínicas de leishmaniasis con excelentes resultados, al igual que la reducción en el número de días de tratamiento (5 -14 días vs 20-40 días de la Anfotericina no liposomal) y la disminución de los efectos adversos con ausencia de nefrotoxicidad (Dietze *et al.*, 1993, Sundar *et al.*, 1999, Solomon *et al.*, 2007)

Recientemente la miltefosina (Impavido®) ha sido incluida en el tratamiento y constituye la primera opción de tratamiento oral para esta enfermedad. Es un alkylfosfolípido desarrollado originalmente contra el cáncer, sin embargo, estudios posteriores demostraron su actividad antiprotozoaria en *T. cruzi*, *T. brucei*, *E. histolytica* y *Leishmania* sp exhibiendo un alto potencial microbicida (Croft *et al.*, 1996, Seifert *et al.*, 2001). Diversos reportes señalan que su mecanismo de acción está relacionado con la interferencia en vías de señalización celular, activación de macrófagos citotóxicos, alteraciones en la membrana lipídica y apoptosis (Lux *et al.*, 2000, Lira *et al.*, 2001, Paris *et al.*, 2004) Resultados satisfactorios han sido obtenidos en ensayos clínicos en pacientes con LV en India y LC en Colombia y Guatemala (Bhattacharya *et al.*, 2007, Soto *et al.*, 2004). Pacientes colombianos infectados con *L. panamensis* han mostrado una tasa de curación del 94% con dosis de 2.2 mg/Kg/día durante cuatro semanas por administración oral (Soto *et al.*, 2004). Debido a que la actividad de la miltefosina depende del tipo de especie involucrada (Soto *et al.*, 2004, Soto *et al.*, 2008), se ha sugerido establecer el comportamiento de la miltefosina frente a la infección causada por *L. braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. mexicana* para garantizar la efectividad del medicamento en las formas clínicas de leishmaniasis producidas por otras especies en nuestro país (Soto & Soto, 2006a). Efectos teratogénicos y reacciones adversas han sido reportados (Berman, 2005), y se ha sugerido que el desarrollo de cepas resistentes a miltefosina puede estar favorecido por la larga vida media del compuesto en el organismo humano (Perez-Victoria *et al.*, 2006).

**Tabla 2. Esquema de tratamientos utilizados en Colombia para la leishmaniasis**

Medicamento	Dosis (mg/Kg/día)	Vía	Duración del tratamiento	Frecuencia
Sb <sup>v</sup>	20,0	IM/IV	20 días (LC) 28 días (LMC/LV)	Diaria
Isiocianato de Pentamidina	3,0	IM	8 días (LC) 22 días (LMC)	Días alternos
AmB	0,5 -1,0	IV	20-40 días según respuesta clínica (LMC y LV)	Diaria
Miltefosina	2.2	Oral	32 días (LC)	Diaria

Fuente: Guías de promoción de la salud y prevención de enfermedades en la salud pública Ministerio de protección social, 2007.

### 2.3 TRATAMIENTOS TÓPICOS

El uso de tratamientos tópicos proporciona algunas ventajas como la reducción de efectos adversos, fácil administración y bajo costo. Muchos de los medicamentos potenciales que se encuentran en estudio son aconsejables para el tratamiento de LC del viejo mundo debido a que las lesiones con frecuencia son únicas y relativamente pequeñas. Mientras que se tiene precaución en el tratamiento tópico con lesiones de LC del nuevo mundo ya que son más severas y pueden dejar cicatrices para toda la vida afectando la apariencia estética del paciente ó pueden evolucionar a LMC causando lesiones desfigurantes e incluso comprometer la vida del paciente. Sin embargo, el tratamiento tópico en LC puede ser utilizado en pacientes con lesiones tempranas, que presenten lesiones pequeñas y únicas o cuando los tratamientos sistémicos no puedan ser administrados (mujeres

embarazadas, pacientes con fallas cardíacas y renales) (Garnier & Croft, 2002, Blum *et al.*, 2004)

La paromomicina (PM) es un antibiótico amino glucósido de amplio espectro derivado del *Streptomyces spp* con actividad demostrada en LC y LV. Se ha reportado que la PM interfiere con la respiración celular y disminuye el potencial de membrana de la mitocondria (Maarouf *et al.*, 1997). La PM posee una biodisponibilidad oral pobre y la evaluación de la efectividad de la PM por vía de administración parenteral se están llevando a cabo (Croft *et al.*, 2006), siendo la administración tópica de la PM una opción considerada para el tratamiento de la LC. La evaluación de diferentes formulaciones con PM ha buscado mejorar la actividad y reducir los efectos locales adversos. Actualmente se cuentan con dos formulaciones tópicas: Una con 15% de PM y 12% de clorhidrato de *metil* bencetonio (CMB) que ha sido efectivo para el tratamiento de la LC en Israel (el-On & Hamburger, 1987), Guatemala (Arana *et al.*, 2001), Ecuador (Armijos *et al.*, 2004) y Belice (Weinrauch *et al.*, 1993). Sin embargo, esta formulación ha mostrado signos de irritación en el sitio de aplicación. La otra corresponde a 15% de PM y 10% de urea el cual ha mostrado una menor eficacia en el tratamiento en pacientes con LC del viejo mundo (Neva *et al.*, 1997; Asilian *et al.*, 1995; Irají *et al.*, 2005) (Asilian *et al.*, 1995, Neva *et al.*, 1997) (Irají & Sadeghinia, 2005). En un estudio clínico reciente en fase II han evaluado la seguridad y eficacia de una formulación hidrofílica de 15% de PM con 0.5% de gentamicina (WR279,396) en pacientes con LC causada por *L. major*. Cuando WR279,396 fue aplicado dos veces al día durante 20 días mostró una efectividad del 94% frente al 71% del grupo placebo (Ben Salah *et al.*, 2009)

El Imiquimod (Aldara<sup>®</sup>) es una molécula sintética con potente actividad inmunomoduladora utilizado al 5% en crema para el tratamiento de verrugas genitales y perianales de infecciones causadas por el virus del papiloma humano (VPH) (Slade *et al.*, 1998, Edwards *et al.*, 1998). En *Leishmania sp*, se ha demostrado que el Imiquimod puede activar la síntesis del óxido nítrico en el

macrófago infectado induciendo la muerte de los amastigotes intracelulares. Igualmente, se ha demostrado en ratones Balb/c la reducción en los niveles de infección con *L. major* (Buates & Matlashewski, 1999). En estudios clínicos ha sido reportado el efecto transitorio en pacientes con LC tratados tópicamente con 5% Imiquimod, en ellos ha sido observada una reducción en el tamaño de las lesiones y reepitelización inicial en las primeras dos semanas y progresión de las mismas a partir de la cuarta semana (Seeberger *et al.*, 2003). Estos resultados sugieren que la actividad de este inmunomodulador en *Leishmania* sp es insuficiente y que debe ser utilizada en combinación con otros medicamentos. Los mayores avances con Imiquimod han sido vistos en terapias combinadas con los antimonios pentavalentes. En un ensayo clínico abierto, 12 pacientes con LC del nuevo mundo que no habían respondido a la terapia convencional con Glucantime fueron sometidos a una terapia combinada de Glucantime e Imiquimod obteniendo una tasa de curación cercana al 90%. Escasos efectos secundarios locales como eritema, edema y sensación de ardor fueron observados y bien tolerados por los pacientes (Arevalo *et al.*, 2001).

La formulación tópica de miltefosina, conocida comercialmente como Miltex, es utilizada en el tratamiento de cáncer de seno con metástasis en piel (Terwogt *et al.*, 1999) esta fue desarrollada debido a efectos adversos de la miltefosina en pacientes con cáncer. Schmidt-Ott *et al* reportaron la actividad de miltefosina tópica en modelos murinos infectados con *L. major* y *L. mexicana* obteniendo la cura en lesiones causadas por este parásito. Sin embargo, la reactivación de la enfermedad en ratones infectados con *L. mexicana* con aparición de lesiones en el sitio inicial y en otras partes del cuerpo fue observado (Schmidt-Ott *et al.*, 1999). Mientras que en los modelos experimentales Miltex ha reducido las lesiones de LC, los ensayos clínicos no han mostrado resultados satisfactorios. En Colombia, un estudio en pacientes infectados con *L. panamensis* y tratados con miltefosina tópica fue suspendido debido a los pobres resultados y a la presencia de irritación

(Soto & Soto, 2006b). Mientras que en Siria, en un estudio que involucró a 19 pacientes con LC tampoco mostró resultados satisfactorios (Garnier & Croft, 2002)

El tratamiento tópico con Anfotericina B ha sido explorado utilizando una mezcla de dispersión coloidal de Anfotericina B (Amphocil®) en 5% de etanol y 95% de agua destilada. En un estudio, 7 de 11 pacientes israelíes con LC tratados con Anfotericina B tópica (1.5 a 3.75 mg/mL) presentaron mejoría clínica de la lesión con un tiempo de tratamiento que varió entre 11 a 64 días según el paciente (Vardy *et al.*, 1999). Luego, en el 2001, Vardi *et al.*, mostró que 16 de 17 pacientes con LC habían curado más rápido que lo observado en aquellos que fueron tratados con el placebo utilizando un esquema de tratamiento similar al trabajo anterior (Vardy *et al.*, 2001)

La efectividad en el tratamiento intralesional con antimonios pentavalentes ha sido similar a la obtenida con administración parenteral (Alkhawajah *et al.*, 1997) Diversos trabajos muestran además que el tratamiento intralesional ha sido eficaz en pacientes infectados con *L. braziliensis*, *L. panamensis* y *L. major*. (Solano *et al.*, 1984, Alkhawajah *et al.*, 1997, Oliveira-Neto *et al.*, 1997). Se ha observado que reduce la toxicidad causada por el medicamento, el tiempo de cura y costos del tratamiento. Dentro de sus efectos adversos se encuentra el dolor en el sitio de la lesión e hiperpigmentación, infecciones observadas en la región cefálica e intolerancia (Masmoudi *et al.*, 2006, Faris *et al.*, 1993).

## **2.4 TRATAMIENTOS FÍSICOS**

El uso de tratamientos físicos resulta ser atractivo ya que al igual que los tratamientos tópicos reducen los efectos adversos y son de bajo costo. La crioterapia, la termoterapia y la TFD se han constituido en opciones que pueden ser utilizadas solas o en combinación con otros medicamentos. Sin embargo, la mayoría de los estudios se encuentran en una fase inicial en el cual se requiere

profundizar para determinar su impacto en el tratamiento contra la Leishmaniasis (Ameen, 2010)

La crioterapia es una modalidad terapéutica utilizada para el tratamiento de múltiples lesiones cutáneas. Esta terapia consiste en la reducción de la temperatura en el sitio de la lesión mediante el uso de criógenos (nitrógeno líquido, dióxido de carbono, freón, óxido nítrico) el cual permite la destrucción del agente infeccioso o de la célula maligna (Abramovits *et al.*, 2006). El mecanismo de acción incluye el daño a la célula por la formación de cristales de hielo intra y extracelulares que causan alteraciones a nivel de la membrana celular, mitocondria y retículo endoplásmico, esto produce cambios en la osmolaridad celular permitiendo el paso de solutos, pérdida de electrolitos y alteración en el pH celular (Davalos & Rubinsky, 2004, Abramovits *et al.*, 2006). En LC las lesiones son sometidas a temperaturas subcero produciendo alteraciones estructurales en la *Leishmania* sp el cual es termosensible (Mosleh *et al.*, 2008, Leibovici & Aram, 1986). Se ha considerado que la crioterapia puede ser utilizada en LC como tratamiento único en pacientes con lesiones pequeñas (< 3 cm) o en estadios tempranos de la enfermedad (< 3 meses) en donde se ha observado que presenta un porcentaje de curación del 100% (Salmanpour *et al.*, 2006). Mosleh *et al* obtuvo una tasa de curación de un 84% en un grupo de 120 pacientes jordanos infectados con *L. major* que fueron sometidos a cuatro sesiones de crioterapia; en este ensayo clínico fueron reportados muy buenos resultados cosméticos, leves efectos adversos y ausencia de relapso de las lesiones en los pacientes tratados luego de tres años de seguimiento (Mosleh *et al.*, 2008). En cuanto a la terapia combinada de crioterapia y Sb<sup>v</sup> intralesional, se ha observado que hay mayores tasas de curación que las obtenidas en grupos de pacientes tratados únicamente con crioterapia ó con Glucantime (Salmanpour *et al.*, 2006, Asilian *et al.*, 2004, Gurei *et al.*, 2000).

En la termoterapia se genera calor de manera controlada en el sitio de la lesión (~ 50°C) mediante el uso de un generador de ondas de radio-frecuencia. El tratamiento por termoterapia en LC se basa en el concepto de que los amastigotes de *Leishmania* sp son susceptibles a temperaturas mayores a 39°C (Sacks *et al.*, 1983) . Porcentajes de curación del 90% en un grupo de pacientes con LC causada por *L. tropica* y tratados con termoterapia resolvieron las lesiones luego de 8 semanas post-tratamiento con una aplicación en el cual se produjo una temperatura de 50°C por 30 segundos en el sitio de la lesión (Velasco-Castrejon *et al.*, 1997). En un ensayo clínico controlado pacientes con LC causadas por especies del nuevo mundo que recibieron tratamiento con termoterapia obtuvieron una eficacia comparable a la obtenida en pacientes tratados con glucantime (73% Vs 73%) (Navin *et al.*, 1990).

## **2.5 LA TERAPIA FOTODINÁMICA (TFD)**

**2.5.1 Fundamento.** La TFD es una alternativa terapéutica utilizada desde hace más de 30 años para el tratamiento de numerosos cánceres de pulmón(Kato, 1998), próstata (Nathan *et al.*, 2002), vejiga (Jichlinski & Leisinger, 2001), esófago (Prosst *et al.*, 2003), tracto gastrointestinal (Puolakkainen & Schroder, 1992), cáncer de piel no melanoma (Zeitouni *et al.*, 2003) y queratosis actínica (Pariser *et al.*, 2003). De igual forma, ha sido utilizado en el tratamiento de enfermedades no neoplásicas como la degeneración macular relacionada con la edad (Rechtman *et al.*, 2002). En la terapia antimicrobiana ha encontrado aplicación para la eliminación de bacterias, virus, hongos y protozoarios. Ha sido utilizado en la esterilización de productos sanguíneos y tratamientos de infecciones orales (Wainwright, 1998).

La TFD se fundamenta en la administración de un Fotosensibilizador (FS) en el tejido blanco que al ser activado con un haz de luz de una longitud de onda específica desencadena la formación de especies reactivas de oxígeno (ERO)

(Hopper, 2000). En el proceso fotodinámico pueden generarse reacciones de tipo I ó II. En la tipo I el FS excitado es transformado a su estado triplete excitado y pueden formar radicales libres que interaccionen con el oxígeno produciendo anión radical superóxido ( $O_2^-$ ). En las reacciones tipo II el estado triplete del FS transfiere su energía al oxígeno molecular formando oxígeno singlete ( $^1O_2$ ). Las ERO producidas interaccionan con múltiples sustratos celulares como lípidos, proteínas y ácidos produciendo daños en diversas estructuras celulares que llevan a la muerte celular inducida por diferentes mecanismos (Buytaert *et al.*, 2007)

**2.5.2 Fotosensibilizadores.** El FS se define como un compuesto químico que al absorber radiación en una longitud de onda definida es capaz de inducir una alteración química ó física en un organismo. Un FS debe poseer ciertas características que lo hagan un buen candidato para ser utilizado en TFD. Para ello, debe localizarse en el sitio de la acción fotodinámica, absorber una apropiada longitud de onda y producir una respuesta biológica deseada. El FS ideal debe 1) Ser químicamente puro y de composición conocida 2) No mostrar toxicidad en condiciones de oscuridad y ser citotóxico solo en presencia de luz 3) ser retenido preferencialmente por el órgano blanco 4) ser eliminado rápidamente del cuerpo para proporcionar baja toxicidad sistémica. 5) Tener un alto rendimiento cuántico para la generación de oxígeno singlete ó anión superóxido 6) Tener una fuerte absorción con un alto coeficiente de extinción en el rango de 600 – 800 nm para que la luz tenga un mayor penetración en los tejido 7) no producir fotosensibilidad cutánea (Detty *et al.*, 2004)

Existe un amplio rango de FS los cuales han sido clasificados según el orden de aparición y complejidad como FS de primera, segunda y tercera generación. El estudio de los FS de primera generación comenzó con las porfirinas que son una clase de compuestos que poseen en su estructura un anillo tetrapirrol y un átomo metálico en el centro. El derivado de hematoporfirina (HpD) fue de los primeros FS utilizados para el tratamiento clínico en TFD. El HpD es una mezcla de

compuestos que incluyen monómeros, dímeros y oligómeros de hematoporfirina. La purificación parcial de esta mezcla es el producto que se conoce comercialmente como Photofrin (AxcanPharma, Inc) (Dougherty, 1987), el cual es utilizado para el tratamiento de cáncer de cérvix, cáncer de vejiga, cáncer gástrico y cáncer endobronquial. Sin embargo, el HpD es una delicada y compleja mezcla de componentes la cual es difícil de reproducir, penetra ligeramente los tejidos, presenta un rendimiento cuántico moderado y presenta fotosensibilidad cutánea que puede persistir durante varias semanas. A pesar de ello, ha tenido muy buenos resultados en el tratamiento de cáncer de estómago, pulmón, cuello y cabeza (Nyman & Hynninen, 2004). Los FS de segunda generación son compuestos que a raíz de las desventajas observadas con HpD mejoraron su actividad presentando períodos más cortos de fotosensibilidad cutánea, una mayor penetración de la luz en los tejidos y selectividad por tejidos tumorales (Allison *et al.*, 2004, O'Connor *et al.*, 2009, Hopper, 2000). En este grupo encontramos compuestos derivados de porfirinas como las clorinas, ftalocianinas, protoporfirinas, metaloporfirinas, purpurinas entre otros. Así como, compuestos no derivados de porfirinas como los Psolarenos, colorantes, cyaninas y antraciclinas (O'Connor *et al.*, 2009). Las ftalocianinas, FS de interés en nuestro estudio, son compuestos de fácil preparación que se caracterizan por absorber en la región roja del espectro entre 670-780 nm. Se conoce que la ftalocianina de zinc, aluminio y silicio son eficientes generadores de oxígeno singlete y han mostrado actividad fotodinámica en sistemas biológicos (Colussi *et al.*, 1999, Boyle *et al.*, 1992). Los FS de tercera generación son compuestos que están siendo desarrollados para mejorar la afinidad de los FS por el tejido tumoral y desarrollar la orientación selectiva por organelas subcelulares (Josefsen & Boyle, 2008).

Numerosos FS han sido desarrollados para uso clínico en TFD (Tabla 3), entre los más conocidos se encuentra el ácido delta aminolevulínico (ALA) el cual es un precursor metabólico de la PpIX que es utilizado en el tratamiento de la queratosis actínica y carcinoma de células basales (Freeman *et al.*, 2003, Morton, 2004); el

derivado de benzoporfirina conocido comercialmente como Verteporfin<sup>®</sup>, el cual es utilizado en tratamiento de la degeneración muscular relacionada con la edad, así como en otras patologías (Blinder *et al.*, 2003) y la Temoporfin distribuido como Foscan<sup>®</sup> ha sido utilizado especialmente en tumor en cabeza y cuello (Dilkes *et al.*, 2003, Fan *et al.*, 1997).

**2.5.3 Modelos experimentales in vivo utilizados en cáncer para el estudio de la TFD.** Múltiples modelos experimentales han sido utilizados en diversas patologías para el tratamiento con TFD. En el modelo cáncer se realiza la inducción del tumor a través del implante de células cancerígenas en el animal ó por exposición a sustancias carcinógenas para luego someter a los animales al tratamiento de interés. El modelo animal pretende que bajo condiciones de laboratorio se reproduzca fielmente la enfermedad en estudio, para tal caso se ha reportado el uso de ratones, ratas, hámsteres, cerdos, etc. La TFD utilizando la administración tópica de los FS ha sido aplicada en el tratamiento de enfermedades cutáneas dentro de los que se incluyen cáncer de piel, carcinoma de piel no melanoma, melanomas, etc. (Kyriazi *et al.*, 2008, Abels *et al.*, 1997, van den Akker *et al.*, 2000). El efecto fototóxico de ALA en tratamientos tópicos han sido ampliamente evaluado, mientras que ftalocianinas metálicas como ftalocianina de zinc y de aluminio son escasamente reportadas (Kassab *et al.*, 2000, Rodriguez *et al.*). La mayoría de trabajos realizados con la ftalocianina de aluminio han mostrado su efecto en diferentes tipos de cánceres en el cual el FS es administrado de forma sistémica. El tratamiento tópico con PcAlCl solo se ha reportado en un estudio para el tratamiento de carcinoma de piel no melanoma, en el cual se observó una buena absorción y penetración en el tejido tumoral de la PcAlCl. También se observó que un 60% de los ratones mostró remisión completa del tumor (Kyriazi *et al.*, 2008), demostrando que la PcAlCl tópica es una opción terapéutica que puede ser explorada.

**Tabla 3. Fotosensibilizadores usados actualmente con aplicaciones clínicas**

Nombre comercial	Nombre químico	Aprobado	Indicaciones
Hexvix	ácido aminolevulínico hexilo	δ Si <sup>a</sup>	Cáncer de vejiga
Levulan	ácido aminolevulínico	δ Si <sup>b</sup> No <sup>c</sup>	Queratosis actínica Tumores en cabeza y cuello, tumores ginecológicos.
Metvix	ácido aminolevulínico metilo	δ Si <sup>d</sup>	Carcinoma de células basales
Pc-4	Ftalocianina-4	No <sup>c</sup>	Lesiones cutáneas y subcutáneas de tumores sólidos de diverso origen
Photofrim, Porfimer	Derivados de hematoporfirina	Si <sup>e</sup> Si <sup>f</sup> Si <sup>g</sup> Si <sup>h</sup> Si <sup>f</sup>	Displasia de alto grado de Barret Displasia cervical y cáncer cervical Cáncer endobronqueal Cáncer esofágico Cáncer gástrico
Photosense	Ftalocianina de aluminio	Si <sup>i</sup>	Cáncer en cabeza y cuello
Foscan, Temoporfin	Meso-tetrahydroxy-phenylchlorine	Si <sup>j</sup> No <sup>c</sup>	Cáncer en cabeza y cuello Cáncer de próstata, cáncer de páncreas
Visudyne, Verteporfin	Benzoporphyrin derivative monoacid Ringa	No <sup>c</sup>	Carcinoma de células basal

<sup>a</sup> Unión Europea (UE) <sup>b</sup> UE, Estados Unidos (EU) <sup>c</sup> no aprobado <sup>d</sup> UE, Australia <sup>e</sup> Canadá, UE, Reino Unido, EU <sup>f</sup> Japón <sup>g</sup> Canadá, Dinamarca, Finlandia, Francia, Alemania, Irlanda, Japón, Países Bajos, Reino Unido, EU <sup>h</sup> Canadá, Dinamarca, Finlandia, Francia, Irlanda, Japón, Países Bajos, Reino Unido, EU <sup>i</sup> Canadá <sup>j</sup> Rusia.

Fuente: (Plaetzer *et al.*, 2009)

**2.5.4 Estudios de la TFD en leishmaniasis.** El estudio de la TFD contra la LC ha presentado un creciente interés en los últimos años. Diferentes FS han sido evaluados *in vitro* e *in vivo* contra especies de *Leishmania* y ensayos clínicos con ALA han sido llevados a cabo en pacientes infectados con *L. major* y *L. donovani*. Sin embargo, aún no se cuenta con un FS ideal para el tratamiento de la leishmaniasis. Se hace necesario profundizar en mecanismos de acción y respuesta inmune. Así como, evaluar la eficacia de la TFD frente a otros medicamentos, determinar posibles combinaciones terapéuticas y optimizar los esquemas de tratamiento. A continuación se presentan algunos FS que han mostrado actividad fototóxica contra *Leishmania* sp en diferentes modelos experimentales.

**2.5.4.1 PpIX.** La mayoría de trabajos publicados en TFD para LC han sido realizados con la PpIX producida a partir de ALA (PpIX-ALA). Uno de los primeros reportes fue realizado por Gardlo en el 2003, donde un paciente con múltiples lesiones cutáneas causadas por *L. donovani* presentó cura clínica y parasitológica después de la TDF con ALA (Gardlo et al., 2003). Un estudio clínico posterior demostró que el 93,5% de 20 de pacientes con LC causada por *L. major* y tratados con TFD con ALA presentaba mejoría clínica frente a un 41,2% de 19 pacientes tratados con paramomicina (Asilian & Davami, 2006) . Los efectos secundarios reportados incluían eritema, edema, picazón, sensación de ardor durante la irradiación e hiperpigmentación (Gardlo et al., 2003, Asilian & Davami, 2006).

En contraste a lo reportado en pacientes, en estudios *in vitro* se había observado que parásitos de *Leishmania* sp en formas libres e intracelulares no eran susceptibles al efecto fotodinámico con PpIX-ALA (Akilov et al., 2006a, Mateus et al., 2007) esto debido principalmente a que *Leishmania* sp carece de las enzimas requeridas para la síntesis de la PpIX (Sah et al., 2002). Experimentos posteriores en un modelo murino permitieron sugerir que la efectividad de la TFD con ALA *in vivo* podía ser debido a que la muerte del parásito era causada indirectamente por

la destrucción del sistema vascular y de la matriz intracelular en el sitio de la lesión, lo cual causaba la muerte de la célula hospedera y por lo tanto de los amastigotes de *L. major* (Akilov *et al.*, 2007a).

**2.5.4.2 Fenotiazinas.** Las fenotiazinas son un grupo de FS que han mostrado actividad fototóxica *in vitro* e *in vivo* contra *L. major*. Su potencial leishmanicida ha sido atribuido a sus propiedades fisico-químicas que incluyen su fuerte atracción por la membrana del parásito, un alto rendimiento cuántico y la eficacia en la internalización de los compuestos en organelas intracelulares (Akilov *et al.*, 2006a). La TFD con PPA904 (compuesto fenotiazínico de aplicación tópica) ha mostrado la reducción en la carga parasitaria en ratones infectados con *L. major* acompañada de una modulación favorable de la respuesta inmune (Akilov *et al.*, 2007b). En un estudio posterior fueron evaluados diferentes parámetros para mejorar la actividad *in vivo* de la PPA904, con el cual se determinó que las condiciones más favorables para obtener un mejor resultado terapéutico con PPA904 incluía la elección del tiempo de pre-irradiación ideal que permitiera al FS llegar a todos los sitios en la piel y el número de sesiones con TFD (Akilov *et al.*, 2009).

**2.5.4.3 Ftalocianinas.** Como se había comentado anteriormente, las ftalocianinas son FS de segunda generación con excelentes propiedades fotofísicas. Las ftalocianinas son dependientes del metal ión, el cual les confiere propiedades electrónicas importantes en su potencial fototóxico. Las ftalocianinas metálicas de Zinc (PcZn) y Aluminio (PcAlCl) son fototóxicas contra *Leishmania* sp. Sin embargo, PcZn es un compuesto con baja solubilidad en medio acuoso.

La actividad fototóxica de la PcAlCl ha sido evaluada en modelos *in vitro* en diferentes especies de *Leishmania* del nuevo mundo, los resultados obtenidos han demostrado la muerte en promastigotes, amastigotes intracelulares y amastigotes axénicos (Escobar *et al.*, 2006, Dutta *et al.*, 2005). La actividad en modelos

experimentales de leishmaniasis aún no se conoce. Se considera que la PcAlCl es un buen candidato para los ensayos de experimentación *in vivo* contra *Leishmania* sp ya que es un FS químicamente estable, fácil de sintetizar, con efectividad evaluada exitosamente en cáncer y excelente margen de seguridad en ensayos clínicos (Chan et al., 1997, Pushpan et al., 2002).

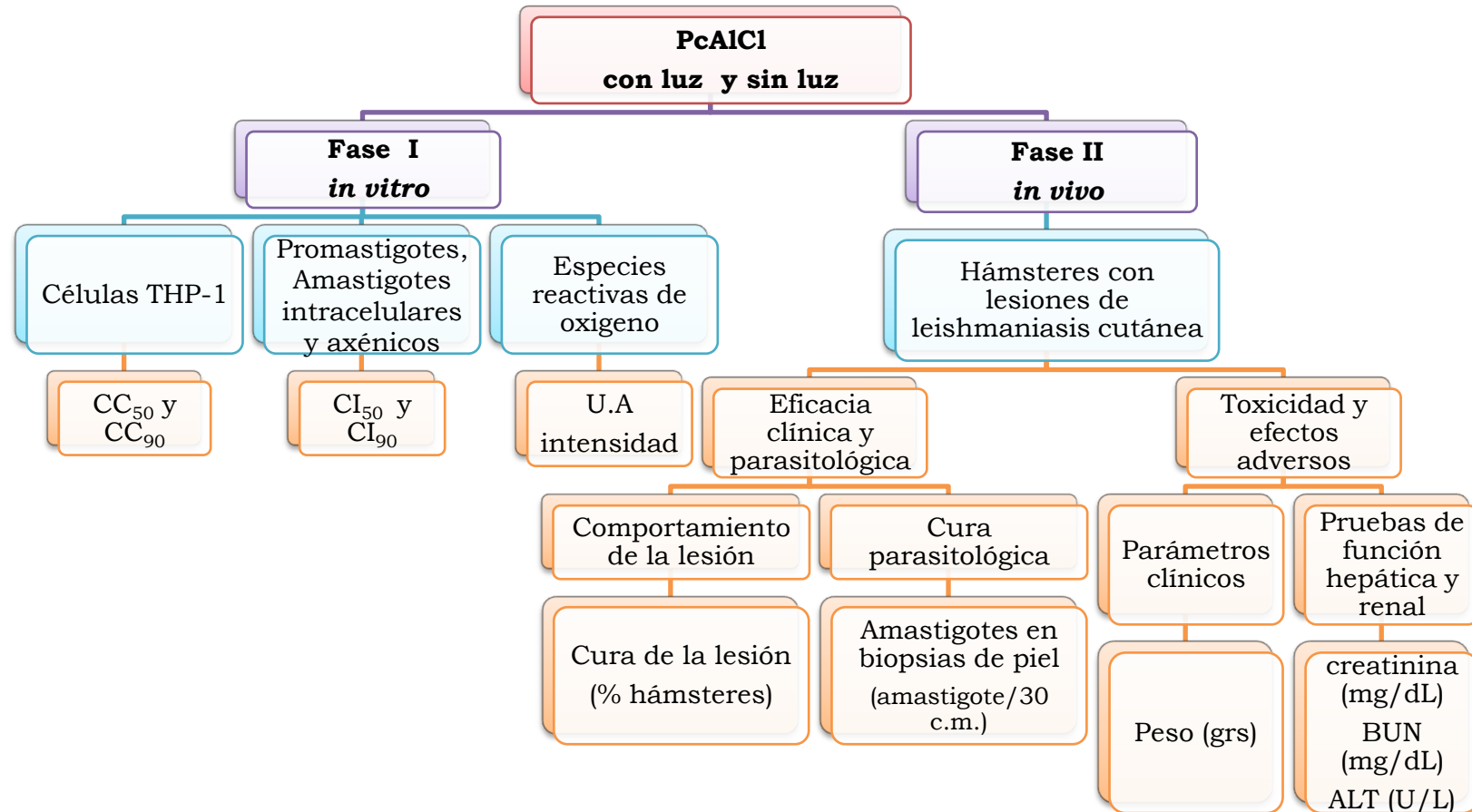
### 3. METODOLOGÍA

La presente metodología se realizó en dos fases. La primera consistió en la evaluación *in vitro* de la actividad de la PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> en células de mamífero THP-1 y en las formas extracelulares e intracelulares de *L. amazonensis* tanto en células irradiadas y como en no irradiadas. Adicionalmente se determinó la generación de especies reactivas de oxígeno (ERO). En una segunda fase se evaluó el efecto de la TFD en el modelo de leishmaniasis cutánea en hámsteres. Se utilizaron dos formulaciones de PcAlCl (en solución y en gel) aplicadas tópicamente y se determinaron la eficacia clínica, parasitológica y toxicidad de la PcAlCl. El diseño experimental se muestra en la figura 2. Los experimentos *in vitro* fueron realizados en los laboratorios del Centro de Investigaciones en Enfermedades Tropicales (CINTROP) de la UIS. Los experimentos *in vivo* fueron realizados en el laboratorio del Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales (PECET) de la Universidad de Antioquia (UdeA) bajo la dirección y coordinación de la doctora Sara María Robledo.

#### 3.1 MATERIALES

**3.1.1 Parásitos.** Las cepas de *L. amazonensis* MHOM/BR/73/LV78 y IFLA/BR/67/PH8 fueron utilizadas en los experimentos *in vitro* e *in vivo* respectivamente. Los promastigotes fueron cultivados en medio Schneider suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (SBFi), pH 7,2 a 28°C. Los amastigotes axénicos fueron cultivados en Schneider suplementado con 20% de SBFi, pH 5,0 a 34°C.

Figura 2. Diseño experimental



**CC<sub>50</sub>**: Concentración citotóxica 50, **CC<sub>90</sub>**: Concentración citototóxica 90, **CI<sub>50</sub>**: Concentración inhibitoria 50, **CI<sub>90</sub>**: Concentración inhibitoria 90, **U.A**: unidades arbitrarias, **c.m.**: campo microscópico

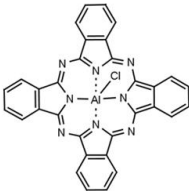
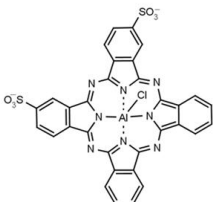
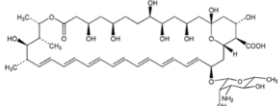
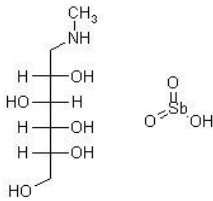
**3.1.2 Células.** Se utilizaron las células monocíticas humanas THP-1 (ATCC TIB 202) las cuales fueron mantenidas en RPMI 1640 suplementado con 10% de SBFi e incubadas a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub> y 95% de mezcla de aire. Las células fueron diferenciadas a su fenotipo adherente utilizando 10 ng/mL de forbol miristato acetato (PMA) por 72 horas.

**3.1.3 Compuestos.** Como FS se utilizaron la ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl, Sigma) y la ftalocianina de aluminio clorada disulfonada (PcAlClS<sub>2</sub>, Frontier Scientific). La anfotericina B (AnB, Sigma) y el Glucantime de Aventis fueron utilizados como medicamentos de referencia. La estructura química de los compuestos es mostrada en la tabla 4.

**3.1.4 Preparación de soluciones stocks y formulaciones.** Las soluciones stock de PcAlCl y AnB fueron preparadas en dimetilsulfóxido (DMSO). La PcAlClS<sub>2</sub> fue disuelta en PBS pH 7,2 (buffer fosfato salino). Las soluciones de trabajo fueron realizados en medio de cultivo RPMI 1640 ó Schneider inmediatamente antes de cada ensayo. La concentración final de DMSO en medio de cultivo fue menor a 0.1% v/v y no fueron tóxicas para las células ni para los parásitos.

Para los experimentos *in vivo* se prepararon dos formulaciones: La PcAlCl en solución (PcAlCl-S) y la PcAlCl en gel (PcAlCl-G), ambas con una concentración de 2.5 mg/mL. La formulación de la PcAlCl-S fue preparada según lo descrito por Kyriazi *et al*, 2007. Brevemente, 2,5 mg de PcAlCl fueron disueltos en una mezcla de DMSO: Tween 80: Agua Tipo I (35.7: 21.4:42.9). La solución se mantuvo en agitación constante durante una hora a temperatura ambiente. La PcAlCl en solución fue mantenida en refrigeración hasta el momento de su uso.

**Tabla 4. Estructura química de los compuestos utilizados en este trabajo.**

Compuesto	Estructura química	Formula molecular	Peso molecular
<b>PcAlCl</b>		$C_{32}H_{16}AlClN_8$	574,96
<b>PcAlClS<sub>2</sub></b>		$C_{32}H_{16}AlClN_8O_6S_2$	735,08
<b>AnB</b>		$C_{47}H_{73}NO_{17}$	924,08
<b>Glucantime</b>			366,00

La formulación de PcAlCl-G se preparó utilizando 80 miligramos de carbopol 940 que fueron mezclados en 10 mL de agua tipo I durante 30 minutos. Posteriormente se adicionó 80  $\mu$ L de trietanolamina hasta su gelificación y se agregó una solución

de 37,5 mg de la PcAlCl en 5 mL de DMSO: Tween 80: Isopropanol: propilenglicol (33,4: 33,4:16,6:16,6) hasta obtener un aspecto homogéneo y uniforme. La mezcla se mantuvo en agitación durante una hora y luego fue mantenido en refrigeración hasta su uso. Para elaborar la formulación en gel se contó con la asesoría del doctor Hernando Arias Páez, Químico, PhD, profesor de la Universidad Nacional de Colombia.

Para determinar la estabilidad de los compuestos se realizaron mediciones en los días 1, 4, 7 y 10 post-preparación. Los espectros de UV-Visible de las soluciones stocks y de las formulaciones fueron realizados en el espectrofotómetro Hewlett Packard 8453.

**3.1.5 Sistema de irradiación.** Se utilizó como fuente de luz la lámpara LumaCare® (LC-122A); equipada con una fibra óptica que filtra y conduce un haz de luz con la longitud de onda específica de  $\lambda$  672  $\pm$  40 nm apta para excitar las moléculas de PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> (Figura 3). Se determinó el espectro de emisión y la fluencia utilizando un medidor de potencia Ophir (sensor 3A). Estos ensayos fueron realizados con la asesoría del profesor Rafael Cabanzo de la Escuela de Física de la UIS.

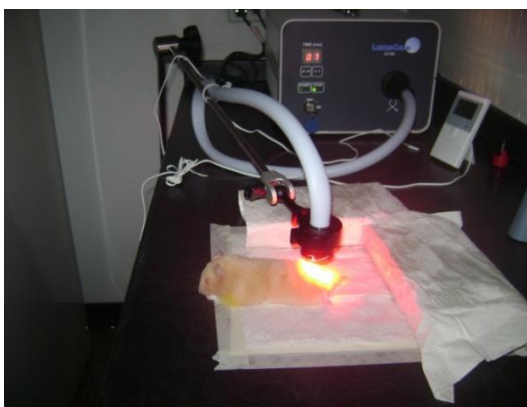
Las fluencias utilizadas fueron de 3 J/cm<sup>2</sup> para los ensayos *in vitro* y de 50 J/cm<sup>2</sup> para los ensayos *in vivo*. Estas fluencias fueron asignadas teniendo en cuenta la fototoxicidad *in vitro* de PcAlCl reportada contra *Leishmania* sp (Escobar et al., 2006, Dutta et al., 2005) y la fluencia reportada previamente en la literatura en ensayos *in vivo* con TFD (Veenhuizen & Stewart, 1995). Igualmente se determinó antes de los experimentos que estas fluencias no eran tóxicas para los parásitos, células de mamífero y animales utilizados en el estudio.

La temperatura fue monitoreada en todos los ensayos, la medición fue realizada con un termómetro digital que permitió la lectura de la temperatura al inicio y al final de cada irradiación.

## 3.2 ENSAYOS *IN VITRO*

### 3.2.1 Actividad fototóxica de los FS en células THP-1

**Figura 3. Lámpara de luz visible LumaCare®**



Las células THP-1 a una concentración de  $8 \times 10^4$  células/mL fueron diferenciadas con PMA y tratadas con diluciones seriadas 1:9 de PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> (0,00084 a 5  $\mu$ M) y de AmB (0,066 a 45  $\mu$ M) a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>-95% mezcla de aire por 24 horas. Células controles fueron mantenidas sin compuesto. Las células fueron irradiadas con una fluencia de 3 J/cm<sup>2</sup>. La actividad de los compuestos en células THP-1 no irradiadas también fue evaluada. Después de 24 horas se determinó la toxicidad de los compuestos por el método colorimétrico de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2-difeniltetrazolio) (Mosmann, 1983). Brevemente, 20  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) fueron adicionados a cada pozo e incubados por 4 horas. Luego, 100  $\mu$ L de DMSO/ pozo fueron agregados para diluir los cristales de formazan. Las absorbancias fueron determinadas espectrofotométricamente a  $\lambda$  580 nm

utilizando un lector de microplacas Anthos 20/20. El porcentaje de toxicidad de cada concentración se calculó mediante la siguiente ecuación:

% toxicidad:  $1 - (\text{absorbancia de células con compuesto con luz} / \text{absorbancia de células sin compuesto con luz}) \times 100$ .

**3.2.2 Actividad fototóxica de los FS en promastigotes.** Los promastigotes de *L. amazonensis* en fase exponencial de crecimiento a una concentración de  $4 \times 10^6$  parásitos/mL fueron tratados con diluciones seriadas 1:9 de PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> (0,00084 a 5  $\mu$ M) y diluciones seriadas 1:3 de AnB (0,037 a 1  $\mu$ M), a 28°C en. Parásitos controles fueron mantenidos sin compuestos. Después de 24 horas los promastigotes fueron irradiados con una fluencia de 3 J/cm<sup>2</sup> e incubados por 24 horas más. La actividad de los compuestos en promastigotes no irradiados también fue evaluada. La toxicidad de los compuestos fue determinada por el método colorimétrico de MTT. Las placas fueron centrifugadas por 30 minutos a 2500 r.p.m; se retiró el sobrenadante y se adicionaron 20  $\mu$ L de MTT (5 mg/mL) diluido en 180  $\mu$ L de PBS suplementado con 5% de SBFi. Después de 4 horas, las placas se centrifugaron, se retiró el sobrenadante y se adicionaron 200  $\mu$ L de sodio dodecil sulfato (SDS)/pozo fueron agregados para diluir los cristales de formazan. Las absorbancias fueron medidas a  $\lambda$  580 nm espectrofotométricamente. Los porcentajes de toxicidad fueron calculados según lo descrito en el numeral 2.2.1.

**3.2.3 Actividad fototóxica de los FS en amastigotes axénicos.** Los amastigotes axénicos de *L. amazonensis* a una concentración de  $4 \times 10^6$  parásitos/mL fueron tratados con diluciones seriadas 1:4 de PcAlCl (0,0005 a 0,510  $\mu$ M) y PcAlClS<sub>2</sub> (0,1 a 102  $\mu$ M) a 34°C. Parásitos controles fueron mantenidos sin compuesto. Después de 24 horas los amastigotes fueron irradiados con una fluencia de 3 J/cm<sup>2</sup> e incubados por 24 horas más. La actividad de los compuestos en amastigotes axénicos no irradiados también fue determinada. La toxicidad de los compuestos fue evaluada por citometría de flujo.

Para tal efecto, 10 µg de diacetato de fluoresceína/pozo fueron adicionados e incubados durante 30 minutos. Luego, se realizó la detección por citómetro de flujo (Beckman-Coulter Epics XL). Cerca de 10.000 eventos fueron examinados en cada pozo y los resultados obtenidos fueron procesados en el software WinMDI. Los porcentajes de toxicidad fueron calculados según lo descrito en el numeral 2.2.1.

**3.2.4 Actividad fototóxica en amastigotes intracelulares.** Las células THP-1 diferenciadas fueron infectadas con promastigotes en fase estacionaria de *L. amazonensis* con un radio de infección célula: parásito de 1:10 por 24 horas a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>-95% mezcla de aire. Los amastigotes intracelulares fueron tratados diluciones seriadas 1:3 de PcAlCl, PcAlClS<sub>2</sub> (0,0007 a 0,55 µM) y AnB (0,037 a 1 µM) a 34°C y 5% de CO<sub>2</sub>-95% mezcla de aire durante 24 horas. Parásitos controles fueron mantenidos sin compuesto. Después de 24 horas las células infectadas fueron irradiadas con una fluencia de 3 J/cm<sup>2</sup> e incubadas por 24 horas más. La actividad de los compuestos en amastigotes intracelulares no irradiados también fue evaluada. Luego de 72 horas, las láminas fueron fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa. La actividad de los compuestos fue determinada microscópicamente en objetivo de 100x determinando tanto el porcentaje de células infectadas como el número de amastigotes por célula (APC). El porcentaje de células infectadas fue calculado contando las células infectadas (con más de un amastigote) en 300 células. EL APC fue calculado contando el número de amastigotes en 50 células, cada concentración fue evaluada por triplicado.

**3.2.5 Detección de especies reactivas de oxígeno (ERO).** Las formación de ERO en promastigotes tratados con la PcAlCl y la PcAlClS<sub>2</sub> fueron detectados por fluorimetría utilizando la sonda 2',7' -diclorofluorescein diacetato (DCFH). Los promastigotes en fase exponencial de crecimiento a una concentración de 2 x 10<sup>7</sup> promastigotes/mL fueron tratados con PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> a concentraciones de 1,6

y 5,0  $\mu\text{M}$  a 28°C. Parásitos controles fueron mantenidos sin los compuestos. Después de 1 hora, la placa fue centrifugada a 2500 r.p.m. por 30 minutos; el sobrenadante fue retirado y 10  $\mu\text{M}$  de DCFH en 200  $\mu\text{L}$  de PBS por pozo fue adicionado. Después de 30 minutos, las placas nuevamente se centrifugaron, el sobrenadante fue descartado y se adicionaron 200  $\mu\text{L}$  de PBS. Los promastigotes fueron irradiados con una fluencia de 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Inmediatamente después de irradiar las ERO fueron detectadas utilizando el espectrofluorómetro Varioskan Flash 40053 ( $\lambda$  emisión= 528 nm /  $\lambda$  excitación= 485 nm). Los resultados fueron expresados en unidades arbitrarias de intensidad (U.A). Cada concentración del FS fue evaluada por triplicado en dos experimentos realizados de manera independiente.

### **3.2.6 Análisis estadístico**

**3.2.6.1 Actividad de los FS en parásitos y células.** Las actividades de los compuestos en células THP-1 fueron expresadas en concentraciones citotóxicas 50 y 90 ( $\text{CC}_{50}$  y  $\text{CC}_{90}$ ) y en los parásitos en concentraciones inhibitorias 50 y 90 ( $\text{CI}_{50}$  y  $\text{CI}_{90}$ ). Las  $\text{CI}_{50}$  y  $\text{CI}_{90}$  así como las  $\text{CC}_{50}$  y  $\text{CC}_{90}$  fueron calculadas por análisis de regresión sigmoide a partir de los porcentajes de toxicidad ó de inhibición obtenidos con cada una de las concentraciones evaluadas. El análisis fue realizado a través del software estadístico *MSX/fit4*. La prueba *t* de Student fue utilizada para comparar las  $\text{CI}_{50}$  ó  $\text{CC}_{50}$  de los compuestos evaluados. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo. Cada concentración de los compuestos y del medicamento de referencia fue evaluada por triplicado en tres experimentos realizados de manera independiente ( $n=9$ ). Los resultados fueron expresados en término del promedio aritmético de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar.

A partir de las actividades encontradas se determinó el Índice Fototóxico (IF) y el Índice de Selectividad (IS).

El IF se definió como la relación entre la actividad del compuesto en las células no irradiadas y la actividad del compuesto en las células irradiadas. Los compuestos con  $IF \geq 2$  fueron considerados específicamente fotoactivos (Lock & Friend, 1986). Se calculó de la siguiente fórmula:  $IF = \frac{CC_{50} \text{ células ó } CI_{50} \text{ parásitos no irradiadas (0 J/cm}^2)}{CC_{50} \text{ células ó } CI_{50} \text{ parásitos irradiadas (3 J/cm}^2)}$ .

El IS se definió como la relación entre la actividad de compuesto en las células THP-1 y la actividad del compuesto en los parásitos. Los compuestos con  $IF \geq 2$  fueron considerados con actividad selectiva para el parásito. Se calculó de la siguiente fórmula:  $IS = \frac{CC_{50} \text{ en células THP-1}}{CI_{50} \text{ del parásito (promastigotes, amastigotes axénicos e intracelulares)}}$ .

**3.2.6.2 Actividad de la PcAlCl en el número de amastigotes por células (APC).** Para comparar el número de APC de los grupos tratados con la PcAlCl frente al grupo no tratado se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis y el test de comparaciones múltiples de Dunns. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

**3.2.6.3 Generación de especies reactivas de oxígeno (ERO).** Para comparar la generación de ERO en grupos tratados con la PcAlCl y la PcAlClS<sub>2</sub> frente al grupo no tratado se utilizó el análisis de varianza (ANOVA) de una vía fue utilizada. El análisis post Hoc fue realizado con el test de Bonferroni para detectar diferencias significantes entre los subgrupos. Un valor de  $p < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

### **3.3 ENSAYOS *IN VIVO***

**3.3.1 Animales.** Se utilizaron hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) de 6 semanas de edad. Tanto hembras como machos fueron incluidos para evitar el sesgo que se pudiera generar por el sexo de los animales. Los hámsteres fueron

mantenidos en el bioterio de la Sede de Investigaciones Universitaria (SIU) de la Universidad de Antioquia (UdeA) bajo condiciones estándar de alojamiento y nutrición cumpliendo con las regulaciones de la Ley 84 de 1989 y la Resolución 008430 de 1993. Los hámsteres fueron debidamente codificados y marcados.

**3.3.2 Infección.** Los hámsteres fueron infectados intradérmicamente en la base de la cola con  $1 \times 10^7$  promastigotes en fase estacionaria de *L. amazonensis* en 100  $\mu$ L de PBS. La evolución de las lesiones fue monitoreada semanalmente para observar la aparición de la induración y úlcera. El tamaño de las lesiones fue determinada con un calibrador digital que permitía medir el ancho y el largo de cada una de las induraciones y las úlceras. Con los datos obtenidos fue calculada el área de cada lesión el cual se expresó en  $\text{mm}^2$ .

**3.3.3 Grupos experimentales.** La asignación de los hámsteres a cada grupo experimental fue al azar. El número de animales por grupo fue designado según la disponibilidad de animales en el momento de los experimentos y lo reglamentado por el comité de ética animal de la UdeA.

Los grupos experimentales son descritos en la figura 4. Todos los hámsteres estaban infectados con *L. amazonensis*. Los grupos 1 y 2 fueron tratados con la PcAlCl-S y los grupos 3 y 4 con la PcAlCl-G. Los grupos 1 y 3 fueron expuestos a la luz, mientras que los grupos 2 y el 4 fueron mantenidos en condiciones de oscuridad. Los grupos 5, 6, 7 y 8 fueron utilizados como grupos controles. Los grupos 5 y 6 fueron tratados con el vehículo en solución y en gel respectivamente. El grupo 7 fue tratado con una dosis curativa de Glucantime de 120 mg/Kg y el grupo 8 no fue tratado.

**3.3.4 Tratamiento.** El tratamiento fue aplicado tópicamente con PcAlCl-S (100  $\mu$ g/40  $\mu$ L a partir de la solución de 2.5 mg/mL) y con PcAlCl-G (se cubrió un área de 5  $\text{cm}^2$  a partir del gel de 2.5 mg/mL / 0.25%) en 4 sesiones y directamente

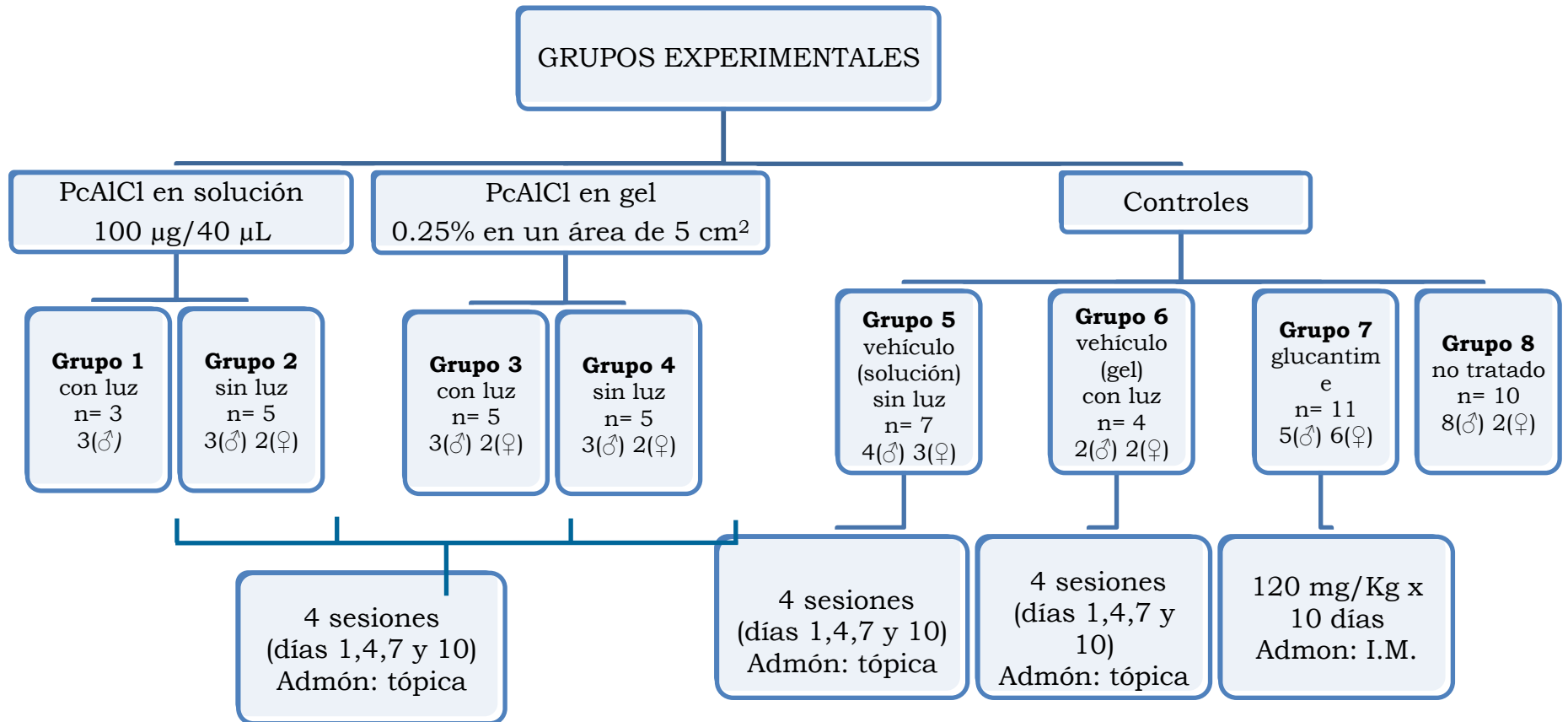
sobre las lesiones de los hámsteres que desarrollaron lesiones típicas de LC luego de 6 a 11 semanas de infección. En cada sesión los animales fueron tratados con las formulaciones y mantenidos en oscuridad durante 3 horas.

Posteriormente los hámsteres de los grupos 1 y 3 fueron anestesiados y expuestos a la luz con una fluencia de 50 J/cm<sup>2</sup>. Los grupos 2 y 4 fueron mantenidos en condiciones de oscuridad. Las sesiones se realizaron los días 1, 4, 7 y 10. Los hámsteres controles tratados con el vehículo en solución ó en gel recibieron el esquema de tratamiento similar al anteriormente descrito. Los hámsteres tratados con Glucantime recibieron una dosis diaria de 120 mg/Kg por administración intramuscular durante 10 días.

**3.3.5 Evaluación de la eficacia del tratamiento con la PcAICI.** Dos parámetros fueron evaluados en los grupos tratados y no tratados para determinar la eficacia del tratamiento con la PcAICI: i) La eficacia clínica definida como el efecto del tratamiento sobre la cura de las lesiones y ii) La eficacia parasitológica definida como el efecto del tratamiento en el número de amastigotes de *L. amazonensis* presentes en el sitio de la lesión.

**3.3.5.1 Eficacia clínica.** Se realizó el seguimiento clínico a los hámsteres durante todo el período del experimento mediante el registro semanal del área de la lesión (mm<sup>2</sup>). Luego de doce semanas post-tratamiento se determinó la eficacia clínica de la PcAICI calculando el porcentaje de hámsteres que mostraron cura de la lesión la cual fue definida como ausencia total de induración y úlcera en el sitio de la infección. Adicionalmente se determinó el tamaño (mm<sup>2</sup>) y el porcentaje de reducción de cada lesión (induración y úlcera) al final del experimento.

**Figura 4. Grupos experimentales evaluados *in vivo***



*n*= número de animales por grupo, **DMSO** dimetilsulfóxido, **admón** administración, **I.M.** intramuscular

**3.3.5.2 Eficacia parasitológica.** Los hámsteres fueron sacrificados en cámara de CO<sub>2</sub> luego de doce semanas post-tratamiento. Se obtuvieron muestras de las lesiones en piel con un espesor de 3 a 5 mm los cuales fueron fijados en formol buferado al 10%. Las muestras fueron procesadas y embebidas en bloques de parafina. Se realizaron cortes histológicos con un micrótopo y las láminas fueron coloreadas con hematoxilina-eosina (H-E). Los datos fueron obtenidos a partir del recuento microscópico en objetivo de 100x de los amastigotes de *Leishmania* en 30 campos de una lámina histológica. Los resultados fueron expresados en número de amastigotes/30 c.m. Para el procedimiento, la lectura e interpretación de las láminas histopatológicas se contó con el apoyo técnico del laboratorio de patología de la UIS y la asesoría del Doctor Julio Cesar Mantilla, profesor adscrito al Departamento de Patología de la Escuela de Medicina de la UIS.

**3.3.6 Toxicidad y efectos adversos de la PcAICI en hámsteres.** La toxicidad y los efectos adversos de la PcAICI fue evaluada en términos del comportamiento del peso y de las alteraciones de las funciones hepáticas y renal.

El peso (gramos) de los hámsteres fue registrado semanalmente desde el inicio hasta la finalización del experimento. Se calculó el área bajo la curva (ABC) del peso de cada hámster incluido en el estudio. El ABC proporcionó un valor único que representó el comportamiento del peso en gramos de cada animal desde el día de inicio de tratamiento hasta el día del sacrificio del hámster. Para el cálculo del ABC se utilizaron los registros de peso realizados semanalmente durante el periodo de estudio.

La alteración de la función hepática y renal fue determinada luego de las doce semanas post-tratamiento, para tal efecto, se obtuvieron muestras sanguíneas por punción intracardiaca y se determinó las concentraciones de creatinina, BUN y aminotransferasas en el suero de los animales, las muestras fueron enviadas al laboratorio clínico donde fueron procesadas.

**3.3.7 Registro fotográfico de lesiones.** Los registros fotográficos de la evolución de las lesiones fueron realizados con la cámara digital Sony. Las evoluciones de las lesiones fueron fotografiadas cada 15 días desde el inicio de la infección hasta el punto final del experimento. Las imágenes fueron procesadas con el software ADOBE Photoshop CS4.

### **3.3.8 Análisis Estadístico**

**3.3.8.1 Eficacia clínica.** La eficacia clínica fue expresada en porcentaje de hámsteres con cura de la lesión. Se utilizó el test exacto de Fischer para comparar los porcentajes de cura de la lesión obtenidos en cada grupo de tratamiento. El Chi cuadrado con corrección de Yates fue utilizado cuando el número de hámsteres en el grupo fue igual a 3 (PcAICI-S irradiado).

Adicionalmente se mostró el tamaño de la lesión ( $\text{mm}^2$ ) y el porcentaje de reducción de las lesiones a las 12 semanas post-tratamiento de cada uno de los animales.

**3.3.8.2 Eficacia parasitológica y toxicidad de la PcAICI.** Para la eficacia parasitológica, el comportamiento del peso y pruebas de función hepática y renal los resultados fueron expresados en términos del promedio aritmético de cada grupo  $\pm$  la desviación estándar. ANOVA de una vía fue utilizada para comparar los grupos en estudio, el análisis post Hoc fue realizado con la prueba de Bonferroni para detectar diferencias significantes entre los subgrupos. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos.

## **3.4 CONSIDERACIONES ÉTICAS**

El manejo de animales de experimentación se realizó teniendo en cuenta las disposiciones exigidas en la ley 84 de 1989, en el Título V de la Resolución No

008430 de 1993 y la aprobación del comité de ética para la experimentación con animales de la Universidad de Antioquia. Los experimentos *in vitro* e *in vivo* fueron realizados en los laboratorios del CINTROP y el PECET el cual cumplen con las instalaciones y los equipos de laboratorio adecuados para llevar a cabo las pruebas experimentales. Las personas involucradas en este trabajo conocían debidamente las técnicas y metodologías estipuladas en el manual de procedimientos y las normas de bioseguridad para el manejo de microorganismos patógenos y material biológico.

No se realizó ninguna clase de investigación con seres humanos ni tampoco se utilizaron muestras de este origen, por lo tanto no se determina la categoría de riesgos a los humanos estipulados en la Resolución No 008430 de 1993 ni se consideran las normas éticas para la investigación médica estipuladas en la declaración de Helsinki.

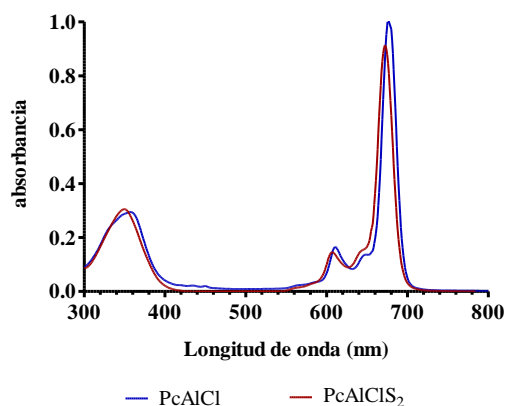
## 4. RESULTADOS

### 4.1 ESPECTROS DE ABSORCIÓN DE LOS FOTSENSIBILIZADORES (FS)

A continuación se muestra los espectros UV-Vis de los FS y/o formulaciones de FS utilizados en los ensayos *in vitro* e *in vivo*. Dependiendo del experimento y naturaleza de los FS estos fueron diluidos en diferentes solventes.

**4.1.1. Soluciones utilizadas en los experimentos *in vitro*.** La PcAlCl y la PcAlClS<sub>2</sub> diluidas en DMSO y PBS pH 7,2 respectivamente, presentaron picos máximos de absorción a 677 nm y 673 nm respectivamente. (Figura 5). El espectro de absorción de ambos FS fue similar, conservaron su estado monomérico en solución y mostraron las bandas características Soret (300-400 nm) y Q (600 -700 nm) en la región ultravioleta visible.

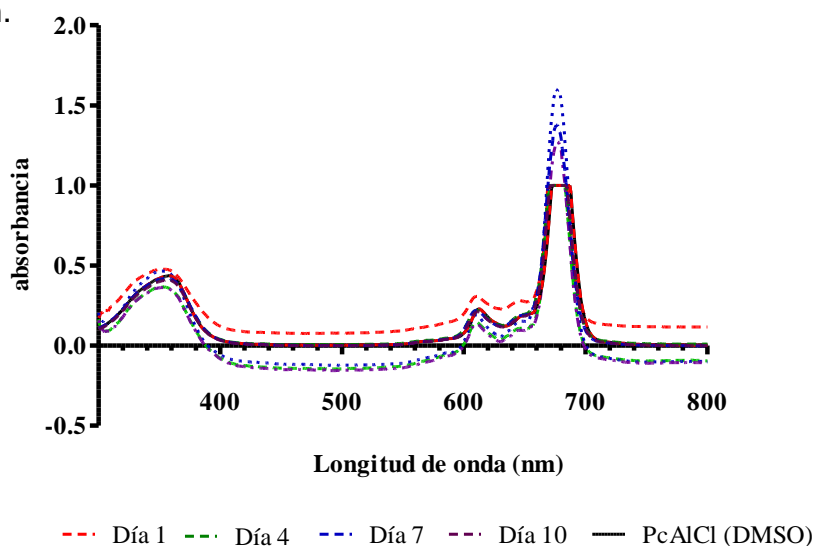
**Figura 5. Espectro de absorción de la PcAlCl y la PcAlClS<sub>2</sub>**



Fotosensibilizador	$\lambda$ máxima	Absorbancia
PcAlCl (DMSO)	677 nm	1.020
PcAlClS <sub>2</sub> (PBS pH 7,2)	673 nm	0.911

**4.1.2 Formulaciones utilizadas en los experimentos in vivo.** Se utilizaron dos formulaciones: la PcAlCl en solución (PcAlCl-S) y la PcAlCl en gel (PcAlCl-G). Los espectros UV-Vis de la formulación de PcAlCl-S (en agua tipo I: DMSO: Tween 80) realizados los días 1, 4, 7 y 10 post-preparación mostraron picos máximos de absorción entre 669 y 687 nm (Figura 6). No se observó dimerización de la PcAlCl ni alteraciones ó cambios en las bandas Q y Soret. Al compararse con el espectro de la PcAlCl en DMSO no se encontraron diferencias apreciables.

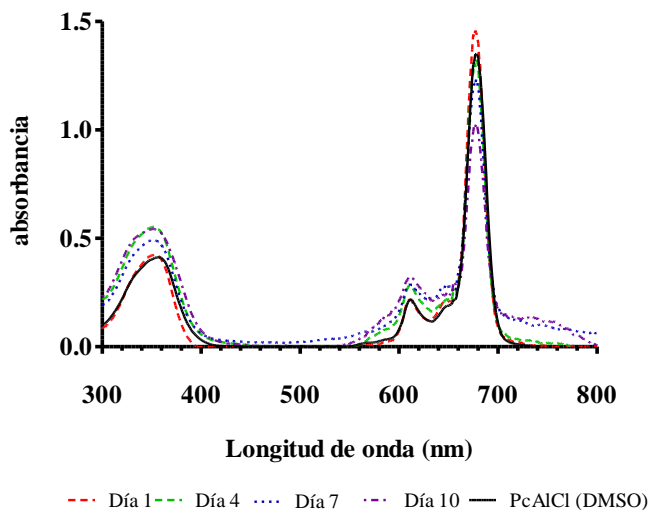
**Figura 6. Espectro de absorción de la PcAlCl en una solución de Agua tipo I: DMSO: Tween 80.** Se muestran los espectros de PcAlCl-S (líneas punteadas) y los de la PcAlCl en DMSO (línea continua) determinados los días 1, 4, 7 y 10 post-preparación.



Día post-preparación PcAlCl-S	$\lambda$ máxima nm	Absorbancia
1	669-685	1.000
4	671-683	1.000
7	676	1.600
10	677	1.277

Los espectros UV-Vis de la formulación de PcAlCl-G (agua tipo I: DMSO: Tween 80: Isopropanol: Propilenglicol.) fueron similares a los observados anteriormente. La formulación de la PcAlCl-G mostró picos máximos de absorción en 677 y 678 nm (Figura 7). Hacia el día 10 se observó una ligera reducción de la PcAlCl-G. No se observó alteraciones apreciables en las bandas Q y Soret.

**Figura 7. Espectro de absorción de la PcAlCl en una solución de Agua tipo I: DMSO: Tween 80: Isopropanol: Propilenglicol.** Los espectros fueron realizados los días 1, 4, 7 y 10 (líneas punteadas) y comparados con un espectro de PcAlCl en DMSO (línea continua).

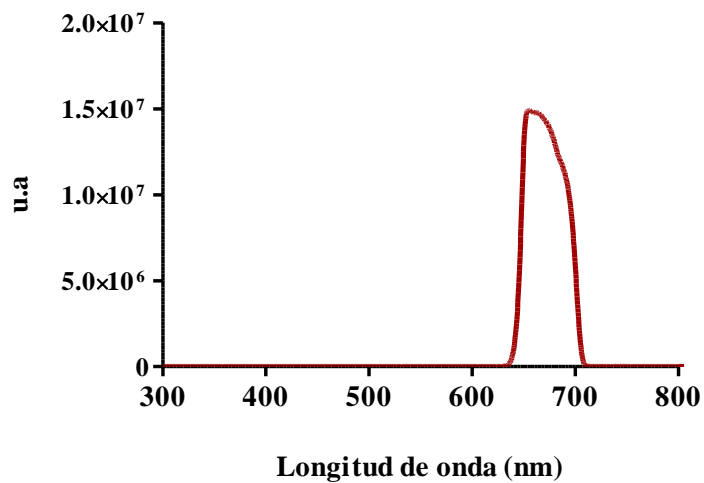


Día post-preparación PcAlCl-G	$\lambda$ máxima nm	Absorbancia
1	677	1.458
4	678	1.323
7	678	1.234
10	678	1.030

## 4.2 ESPECTRO DE EMISIÓN DEL SISTEMA DE IRRADIACIÓN

La lámpara de irradiación LUMACARE utilizada en este estudio presentó un espectro de emisión entre 640 a 705 nm con un pico máximo de 672 nm (Figura 8). El espectro de emisión obtenido correspondió al descrito por la casa comercial.

**Figura 8. Espectro de emisión de la lámpara LUMACARE.**



## 4.3 MONITOREO DE LA TEMPERATURA DURANTE EL PERIODO DE IRRADIACIÓN

En los experimentos *in vitro* no se registraron fluctuaciones de temperatura cuando los parásitos y las células THP-1 fueron irradiados a fluencias de hasta 3 J/cm<sup>2</sup>.

En los experimentos *in vivo*, un ensayo preliminar mostró que luego de irradiar a una fluencia de 50 J/cm<sup>2</sup> la temperatura inicial de 28°C aumentó a 38°C. Teniendo en cuenta lo anterior, se adaptó un sistema de ventilación para mantener una temperatura óptima (32°C) durante el periodo de irradiación.

#### 4.4 ACTIVIDAD *IN VITRO* DE LOS FS

**4.4.1 Las células THP-1 fueron fotosensibles al tratamiento con los FS.** El tratamiento con la PcAlCl y la PcAlClS<sub>2</sub> después de irradiar a una fluencia de 3 J/cm<sup>2</sup> fue fototóxico para las células THP-1 con actividades de CC<sub>50</sub> 0,01 μM ± 0,002 y CC<sub>50</sub> 0,003 μM ± 0,0005 respectivamente (Tabla 5). La PcAlClS<sub>2</sub> fue más fototóxica para las células THP-1 que la PcAlCl ( $p = 0,0001$ ).

**4.4.2 Los promastigotes y amastigotes axénicos de *L. amazonensis* fueron fotosensibles al tratamiento con los FS.** El tratamiento con PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> después de irradiar a una fluencia de 3 J/cm<sup>2</sup> fue fototóxico para los promastigotes de *L. amazonensis* con actividades de CI<sub>50</sub> de 0,046 μM ± 0,018 y CI<sub>50</sub> de 4,101 μM ± 0,136 respectivamente (Tabla 5). Los FS también fueron fototóxicos para los amastigotes axénicos con actividades para PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> de CI<sub>50</sub> de 0,004 ± 0,000 y CI<sub>50</sub> de 5,67 μM ± 0,019 respectivamente (Tabla 5). La PcAlCl fue más fototóxica que la PcAlClS<sub>2</sub> en ambos estadios de *L. amazonensis* ( $p < 0,05$ ).

La PcAlCl fue más fototóxica para las células THP-1 que para los promastigotes mostrando un IS de 0,85. Sin embargo, la PcAlCl fue menos fototóxica para las células THP-1 que para los amastigotes axénicos con un IS igual a 3.

La PcAlClS<sub>2</sub> fue mas fototóxica para las células THP-1 que para los parásitos mostrando unos IS bastante bajos (IS: 0,001 en promastigotes e IS: 0,00052 en amastigotes axénicos).

**4.4.3 Los amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* infectando células THP-1 fueron fotosensibles al tratamiento con PcAlCl.** El tratamiento con la PcAlCl después de irradiar a 3 J/cm<sup>2</sup> fue fototóxico para amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* presentando actividades de CI<sub>50</sub> 0,254 μM ± 0,009 (Tabla 5). Se observó una reducción en el número de amastigotes por célula (APC) en las

células tratadas e irradiadas con 5 y 0,185  $\mu\text{M}$  de PcAlCl mostrando promedios de 3,6 y 2,3 APC frente a 12,3 APC del grupo control (Figura 9). Los amastigotes intracelulares fueron menos fotosensibles al tratamiento con la PcAlCl que las formas libres de los parásitos ( $p=0,001$ ) (Tabla 5). El rango de actividades de la PcAlCl de mayor a menor en los parásitos fue: amastigotes axénicos > promastigotes > amastigotes intracelulares. La PcAlCl fue más fototóxica para las células THP-1 que para los amastigotes intracelulares mostrando un IS de 0,03. El tratamiento con concentraciones menores a 0,06  $\mu\text{M}$  de PcAlClS<sub>2</sub> no inhibieron el número de células infectadas con el parásito después de irradiar. Concentraciones mayores no pudieron ser cuantificadas debido al efecto fototóxico del compuesto sobre la célula hospedera (Tabla 5).

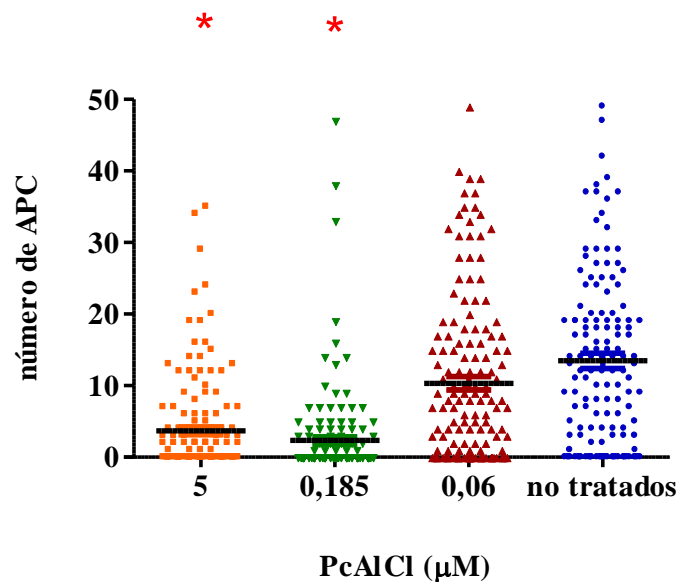
**Tabla 5. Actividad *in vitro* de los compuestos en estudio**

Compuestos	Fluencia (J/cm <sup>2</sup> )	µM ± DS							
		Células THP-1		Promastigotes		Amastigotes intracelulares		Amastigotes axénicos	
		CC <sub>50</sub>	CC <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>90</sub>
PcAICI	0	>5*	>5	>5	>5	>5	>5	>130*	>130
	3	0,012 ± 0,002	0,079 ± 0,02	0,014 ± 0,008	0,429 ± 0,000	0,377 ± 0,001	N.D.	0,004 ±0,000	0,006 ±0,000
PcAICIS <sub>2</sub>	0	>5	>5	>5	>5	>5	>5	>130	>130
	3	0,003 ± 0,000	0,020 ± 0,004	1,685 ± 0,262	>5	N.D.	N.D.	5,67 ±0,019	23,97 ±0,120
Amfotericina B	0	12,171 ± 0,423	>45*	0,065 ± 0,001	0,124 ± 0,000	0,272 ±0,020	0,350 ±0,003	0,1455 ±0,017	0,008 ± 0,002
	3	5,603 ± 1,226	>45	0,086 ± 0,005	0,115 ± 0,005	0,231 ±0,007	0,386 ± 0,017	0,08 ± 0,01	0,025 ± 0,005

La actividad de los compuestos se determinó en células sin irradiar (0 J/cm<sup>2</sup>) y células irradiadas (3 J/cm<sup>2</sup>). **DE**: desviación estándar **CC<sub>50</sub>**: concentración citotóxica 50; **CC<sub>90</sub>**: concentración citotóxica 90; **CI<sub>50</sub>**: concentración inhibitoria 50; **CI<sub>90</sub>**: concentración inhibitoria 90. Los resultados mostrados corresponden a un experimento representativo de tres realizados de manera independiente. \* El >X indica que a la máxima concentración evaluada de X no se pudo calcular la CC ó CI 50 ó 90. **N.D.**: No determinada ya que la CI<sub>50</sub> ó CI<sub>90</sub> no pudieron ser cuantificadas debido a la destrucción observada en las células hospederas después del tratamiento.

**4.4.4 La Anfotericina B fue activa contra los parásitos.** La AnB fue activa contra promastigotes, amastigotes axénicos y amastigotes intracelulares de *L. amazonensis* (Ver Tabla 2). No se observaron diferencias significativas entre la actividad de la AnB en células irradiadas y células no irradiadas ( $p>0,05$ ). La AnB fue más tóxica para los parásitos que para las células THP-1 mostrando IS: 65, IS: 24,5 e IS: 70 en promastigotes, amastigotes intracelulares y axénicos respectivamente.

**Figura 9. Efecto del tratamiento con PcAlCl en el número de amastigotes por célula (APC)**



Cada punto representa el número de APC en cada una de las 150 células contadas después del tratamiento con PcAlCl (0,06-5 μM) e irradiación. \*Muestra los grupos que son significativamente diferentes ( $p< 0,05$ ) con el grupo no tratado e irradiado.

**4.4.5 Efecto de la irradiación sobre las células y los parásitos.** La irradiación no indujo efecto tóxico sobre las células THP-1, formas libres e intracelulares de *L. amazonensis* no tratados.

**4.4.6 Efecto de los FS sobre células y parásitos en condiciones de oscuridad.** Células THP-1 y formas libres e intracelulares de *L. amazonensis* no fueron susceptibles al tratamiento con PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> sin irradiar en ninguna de las concentraciones utilizadas en el estudio (Tabla 5).

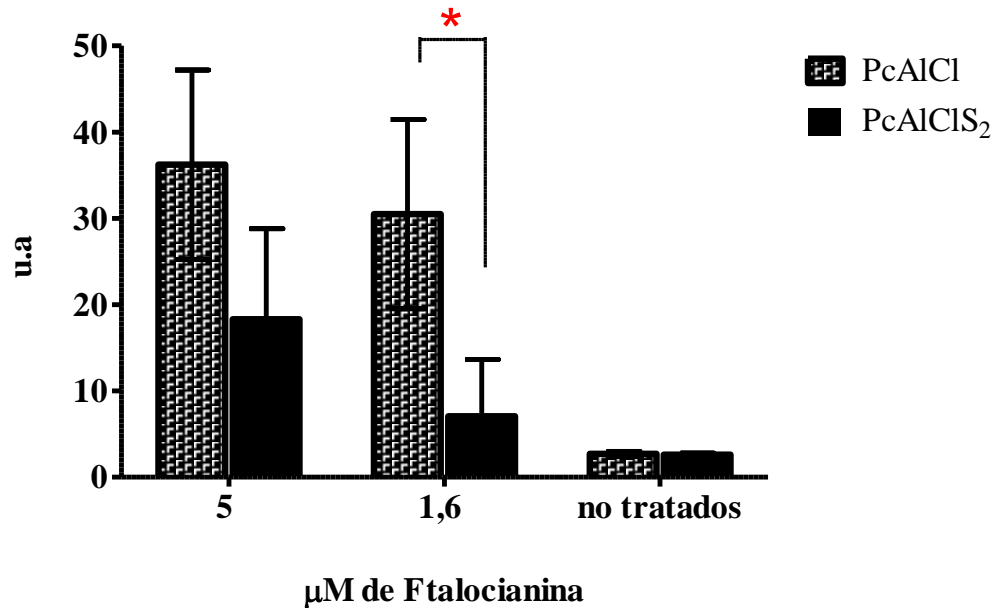
**4.4.7 Índice de Fototoxicidad.** El IF calculado para la actividad de las PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> en células y parásitos irradiados y no irradiados fue en todos los casos igual o mayor a 2 mostrando que la toxicidad de los FS fue superior en las células irradiadas que en las células no irradiadas.

Para la AnB, el IF fue menor a 2 en parásitos mostrando que la actividad de este medicamento no fue dependiente de la luz.

#### **4.5 EL TRATAMIENTO CON LOS FS INDUCE LA FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DE OXGENO (ERO)**

Se observó la formación de ERO en promastigotes tratados con 5 y 1,6  $\mu\text{M}$  de PcAlCl después de irradiar a una fluencia de 1  $\text{J}/\text{cm}^2$ . La formación de ERO inducida por la PcAlClS<sub>2</sub> fue menor que la inducida por PcAlCl a concentraciones de 1,6  $\mu\text{M}$  ( $p < 0,05$ ) (Figura 10).

**Figura 10. Efecto de la PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> en la inducción de ERO en promastigotes**



Los promastigotes fueron tratados con los FS por una hora e irradiados. Los valores fueron expresados en unidades arbitrarias (U.A.) de fluorescencia y representan el promedio  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo de dos realizados de manera independiente. Cada concentración del FS fue evaluada por triplicado. \* representa la significancia entre las ERO inducidas por PcAlCl y PcAlClS<sub>2</sub> con 1,6  $\mu$ M ( $p=0.03$ ).

#### **4.6 ACTIVIDAD FOTOTÓXICA *IN VIVO* DE LA PcAlCl**

La TFD con PcAlCl (TFD-PcAlCl) fue evaluada en hámsteres dorados infectados con *L. amazonensis* utilizando dos formulaciones: la PcAlCl en solución (PcAlCl-S) y la PcAlCl en gel (PcAlCl-G). Los resultados son mostrados en términos de: i) la eficacia clínica del tratamiento definida como el efecto del tratamiento en la cura de las lesiones; ii) la eficacia parasitológica definida como el efecto del tratamiento en el número de amastigotes en el sitio de la lesión; y iii) la toxicidad del

tratamiento definida como el efecto del tratamiento en el peso y en algunos parámetros bioquímicos (BUN, creatinina y alanino aminotransferasa)

**4.6.1 Eficacia clínica.** En la tabla 6 se muestran el porcentaje de hámsteres curados en cada grupo de tratamiento. En la tabla 7 se muestran los registros individuales del tamaño de la lesión (mm<sup>2</sup>) y el porcentaje de reducción de la lesión (úlceras e induración) luego de 12 semanas post-tratamiento.

Los hámsteres fueron tratados con la PcAICI-S y con la PcAICI-G, al igual que los vehículos utilizados para la preparación de los mismos. Se evaluó la eficacia del tratamiento tanto en presencia de luz (hámsteres irradiados) como en animales que no fueron expuestos a la luz (animales no irradiados) después de la aplicación del tratamiento. El glucantime fue utilizado en un grupo de animales como control de medicamento de la LC. Hámsteres controles permanecieron sin tratamiento durante el experimento.

**4.6.1.1 La TFD con la PcAICI-S fue efectiva para todos los animales con lesiones de LC.** El 100% (3/3) de los hámsteres sometidos a TFD con la PcAICI-S curaron las lesiones de LC (induración y úlcera) luego de 12 semanas post-tratamiento. (Tabla 6 y 7). El tratamiento con la PcAICI-S sin irradiación y el tratamiento con el vehículo (vehículo-S) indujo la cura en el 40% y el 29% de los hámsteres respectivamente (Tabla 6). De los cinco hámsteres tratados tópicamente con la PcAICI-S sin irradiación, dos curaron y tres mostraron aumento en el tamaño de las lesiones con respecto al tamaño de la lesión al inicio del tratamiento (Tabla 7). Mientras que, de los siete hámsteres tratados con el vehículo-S, dos curaron, cuatro aumentaron el tamaño de sus lesiones y uno redujo la úlcera en un 39% (Tabla 7).

Las lesiones de los hámsteres tratados con la PcAICI-S e irradiados mostraron durante el tratamiento un aumento en el tamaño de la úlcera, ligero enrojecimiento

y cambio del color hacia el centro de la lesión (Figura 11). Finalizado el tratamiento, las lesiones marcaron una tendencia a la reducción que culminó con la ausencia total de la úlcera e induración. Cuando finalizó el experimento los hámsteres no mostraban signos de lesiones previas en el antiguo sitio de infección (Figura 11). Hámsteres tratados con la PcAICI-S sin irradiación no mostraron cambios en el aspecto de la lesión durante el tratamiento y su aspecto fue similar a lo observado por el grupo no tratado (Figura 11).

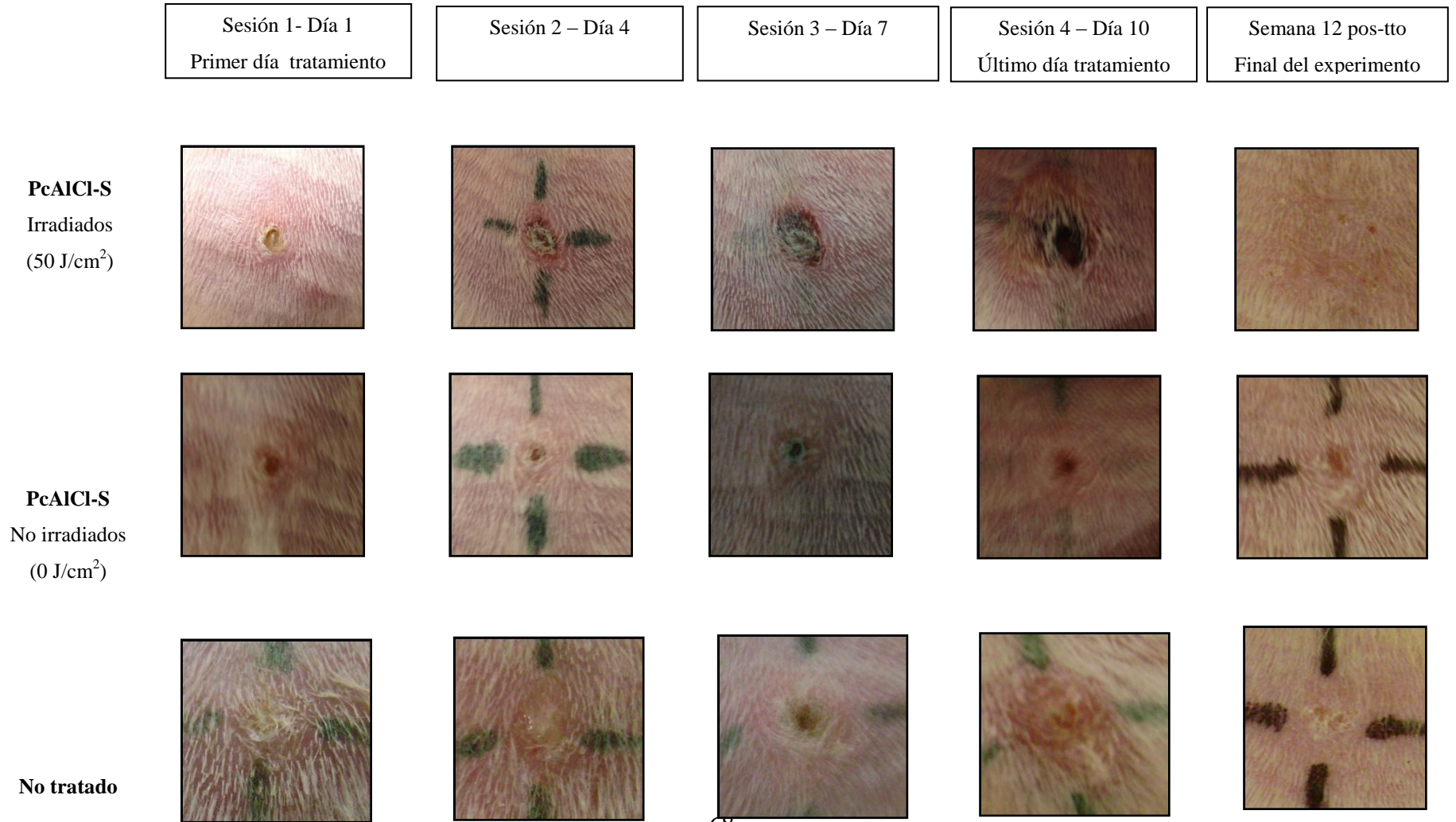
Los hámsteres que resolvieron las lesiones y que habían sido tratados con la PcAICI-S sin irradiación y con el vehículo-S tampoco mostraron signos de lesiones previas en el antiguo sitio de infección. Los hámsteres que no curaron y que también fueron tratados con PcAICI-S sin irradiar y vehículo-S mostraron lesiones ulceradas con bordes indurados correspondiente a LC (Figura 12).

**4.6.1.2 La TFD- PcAICI con gel no fue efectiva para todos los animales.** Sólo el 20% (1/5) de los hámsteres sometidos a TFD con la PcAICI-G curó las lesiones al final del experimento. De los cuatro restantes, dos mostraron reducción en las úlceras mayor al 50% pero no en las induraciones. Mientras que los otros dos hámsteres exhibieron lesiones de mayor tamaño que al inicio del tratamiento (Tabla 6 y 7).

No se observó cura en los hámsteres tratados con la PcAICI-G sin irradiación o de los tratados con el vehículo-G. En la mayoría de ellos las lesiones fueron de mayor tamaño que al inicio del tratamiento (Tabla 6 y 7).

El aspecto de la lesión en los hámsteres tratados con las formulaciones en gel que curaron y que no curaron mostró características similares a las enunciadas anteriormente con los grupos tratados con la formulación en solución (Figura 12).

**Figura 11. Aspecto de las lesiones en hámsteres tratados e irradiados con la PcAlCl-S.**



**Figura 12. Aspecto de las lesiones en hámsteres tratados con PcAlCl-S sin irradiar y con el vehículo-S. Cuando resolvieron las lesiones (12A) y cuando no resolvieron las lesiones (12B).**



**Tabla 6. Eficacia clínica en los grupos experimentales evaluados.**

Tratamiento /dosis	Irradiados	Hámsteres (n)	% de hámsteres curados a las 12 semanas post-tratamiento
PcAlCl-S (100 µg/40 µL)	si	3	100*
	no	5	40
PcAlCl-G (0.25% / 5 cm <sup>2</sup> )	si	5	20
	no	5	0
Vehículo-S	no	7	29
Vehículo-G	si	4	0
No tratados	no	10	0
Glucantime (120 mg/Kg)	no	11	56**

Se muestra la eficacia clínica del tratamiento en animales irradiados (50 J/cm<sup>2</sup>) y no irradiados (0 J/cm<sup>2</sup>). (**n**): número. **% de hámsteres curados**: se define como aquellos hámsteres que mostraron ausencia total de úlcera e induración en el sitio de la lesión.\* PcAlCl-S irradiado muestra diferencias con el grupo no tratado ( $p=0,004$ ) \*\* Glucantime muestra diferencias con el grupo no tratado ( $p=0,028$ ). **PcAlCl-S**: Ftalocianina de aluminio clorada en solución. **PcAlCl-G**: Ftalocianina de aluminio clorada en gel. **Vehículo-S**: vehículo en solución. **Vehículo-G**: vehículo en gel.

**Tabla 7. Registro individual del tamaño de la lesión (mm<sup>2</sup>) y el porcentaje de reducción de los hámsteres incluidos en el estudio.**

Tratamiento /dosis	Irradiados	No. de hámster	Tamaño y % de reducción de las lesiones a las 12 semanas post- tratamiento			
			Induración		Úlcera	
			mm <sup>2</sup>	% de reducción	mm <sup>2</sup>	% de reducción
PcAlCl-S (100 µg/40 µL)	si	1	0	100	0	100
		2	0	100	0	100
		3	0	100	0	100
	no	1	545	NR*	0	100
		2	0	100	0	100
		3	0	100	0	100
		4	0	100	7	NR
	5	872	NR	256	NR	
PcAlCl-G (0.25%/ 5 cm <sup>2</sup> )	si	1	0	100	0	100
		2	115	59	5	81
		3	41	81	2	95
		4	309	NR	53	NR
		5	480	NR	311	NR
	no	1	681	NR	42	76.62
		2	115	36	3	88.34
		3	162	NR	0	100.00
		4	916	NR	441	NR
		5	426	NR	33	NR
Vehículo-S	no	1	207	NR	8	NR
		2	695	NR	92	NR
		3	0	100	0	100
		4	0	100	0	100
		5	363	NR	65	NR
		6	147	NR	34	39
		7	903	NR	29	NR
Vehículo-G	si	1	430	NR	8	89.72
		2	781	NR	71	50.77
		3	1963	NR	133	NR
		4	671	NR	31	NR

Tratamiento /dosis	Irradiados	No. de hámster	Tamaño y % de reducción de las lesiones a las 12 semanas post- tratamiento			
			Induración		Úlcera	
			mm <sup>2</sup>	% de reducción	mm <sup>2</sup>	% de reducción
No tratados	no	1	47	NR	4	63
		2	170	16.54	24	5
		3	205	NR	14	NR
		4	552	NR	0	100
		5	342	NR	51	18
		6	444	NR	135	NR
		7	599	NR	89	NR
		8	944	NR	16	63
		9	732	NR	246	NR
		10	788	NR	42	NR
Glucantime (120 mg/Kg)	no	1	316	NR	41	NR
		2	0	100	0	100
		3	1102	NR	178	NR
		4	0	100	0	100
		5	0	100	0	100
		6	0	100	0	100
		7	179	NR	0	100
		8	211	NR	22	NR
		9	0	100	0	100
		10	476	NR	55	NR
		11	0	100	0	100

Se muestra la respuesta individual al tratamiento. Irradiados (50 J/cm<sup>2</sup>) y no irradiados (0 J/cm<sup>2</sup>). NR: no hubo reducción en el tamaño de la induración ó la úlcera. % de reducción: corresponde al porcentaje de reducción de la lesión con respecto al tamaño de la lesión al inicio del tratamiento. **PcAICI-S**: Ftalocianina de aluminio clorada en solución. **PcAICI-G**: Ftalocianina de aluminio clorada en gel. **Vehículo-S**: vehículo en solución. **Vehículo-G**: vehículo en gel.

**4.6.1.3 Actividad del glucantime en los hámsteres infectados con LC.** El 56% de los hámsteres tratados intramuscularmente con 120 mg/kg de glucantime curaron las lesiones de LC al final del experimento. Cinco hámsteres no redujeron el tamaño de las induraciones y las úlceras presentando lesiones de mayor tamaño que al inicio del tratamiento (Tabla 6 y 7).

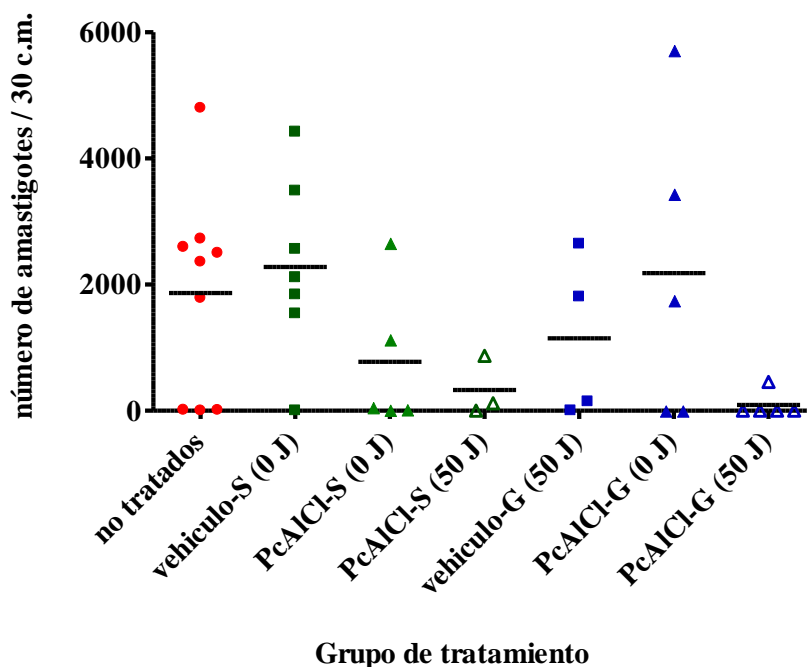
**4.6.1.4 Análisis de los resultados.** El grupo tratado e irradiado con la PcAICI-S ( $p=0,004$ ) y el glucantime ( $p= 0,028$ ) mostraron diferencias significativas con el grupo no tratado.

Ninguno de los hámsteres que fueron mantenidos sin tratamiento curaron. En la mayoría de ellos las lesiones fueron de mayor tamaño que al inicio del tratamiento (Tabla 6 y 7).

**4.6.2 Eficacia parasitológica.** El tratamiento fotodinámico con la PcAICI-S y con la PcAICI-G no permitió eliminar por completo el número de amastigotes en el sitio de las lesiones, sin embargo se observó una tendencia a la reducción en el número de los amastigotes.

Los hámsteres tratados con TFD-PcAICI-S y PcAICI-G mostraron un promedio de  $330\pm 472$  y  $91,6\pm 204,8$  amastigotes/30 c.m. respectivamente al final del tratamiento. Estos valores fueron 5,1 y 18,6 veces menores que los encontrados en los hámsteres no tratados (promedio de  $1697\pm 1614$  amastigotes/30 c.m.) (Figura 13). Sin embargo no se encontraron diferencias significativas ( $p>0,100$ ) entre los grupos estudiados. Esto podría deberse a que en todos los grupos estudiados uno a más animales mostraron ausencia o un escaso número de amastigotes/c.m.

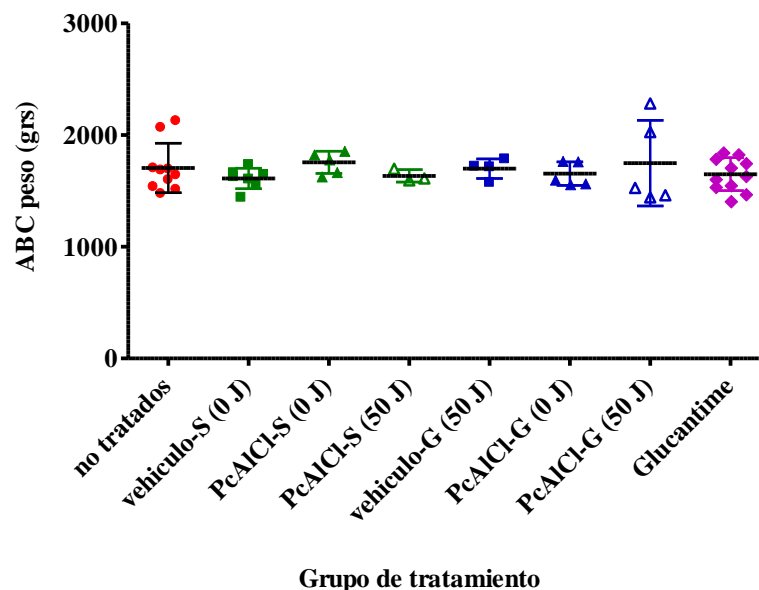
**Figura 13. Eficacia parasitológica de la PcAlCl-S y PcAlCl-G en hámsteres infectados con *L. amazonensis***



La figura muestra el resultado del recuento de amastigotes encontrados en 30 campos microscópicos (1000x) al final del tratamiento en cada uno de los hámsteres de los grupos: no tratados; tratados con **Vehículo-S**: vehículo en solución; con **PcAlCl-S (0 J)**: PcAlCl en solución no irradiados; con **PcAlCl-S (50 J)**: PcAlCl en solución irradiados; **Vehículo-G**: vehículo en gel; con **PcAlCl-G (0 J)**: PcAlCl en gel no irradiados; con **PcAlCl-G (50 J)**: PcAlCl en gel irradiados.

**4.6.3 Toxicidad del tratamiento en hámsteres.** La TFD utilizando preparaciones tópicas de PcAlCl-S ó PcAlCl-G no afectó el peso de los hámsteres durante todo el tratamiento. Se encontró que el peso de los hámsteres en cada grupo a través del tiempo (desde el inicio del tratamiento hasta el día del sacrificio) presentó un promedio de peso (expresado como área bajo la curva, ABC) de  $1635 \pm 55,8$  y  $1749 \pm 383,6$  gramos respectivamente. El cual fue similar al grupo de animales no tratados ( $1706 \pm 221,8$  gramos) ( $p > 0,5$ ) (Figura 14).

**Figura 14. Efecto en el peso de hámsteres que recibieron tratamiento con PcAlCl (solución y gel) y Glucantime.**



La figura 14 muestra el efecto del tratamiento en el peso de cada uno de los hámsteres. El área bajo la curva (ABC) proporciona un valor único que representa el comportamiento del peso en gramos de cada uno de los animales durante el tratamiento y las doce semanas post-tratamiento. El ABC fue calculado teniendo en cuenta los registros de peso realizados semanalmente durante el periodo de estudio. **PcAlCl-S:** Ftalocianina de aluminio clorada en solución. **PcAlCl-G:** Ftalocianina de aluminio clorada en gel. **Vehículo-S:** vehículo en solución. **Vehículo-G:** vehículo en gel.

La TFD utilizando preparaciones tópicas de PcAlCl-S no afectó la función hepática y renal de los hámsteres durante todo el tratamiento. Los niveles séricos de la enzima alanino-aminotransferasa (ALT), la creatinina y el nitrógeno ureico en sangre (BUN) en los grupos evaluados (tratados con PcAlCl en solución, vehículo en solución) no mostraron variaciones considerables con respecto a los valores normales encontrados en el grupo control (Tabla 8).

**Tabla 8. Efecto del tratamiento en niveles séricos de ALT, creatinina y BUN en los hámsteres infectados con *L. amazonensis***

Tratamiento	Irradiados	Creatinina (mg/dL)	BUN (mg/dL)	ALT (U/L)
PcAlCl-S [100 µg/ 40 µL]	si	0,40 ± 0,00	21,00 ± 0,00	63,00 ± 18,68
	no	0,34 ± 0,05	18,60 ± 2,07	56,20 ± 8,79
PcAlCl-G [0.25% / 5 cm <sup>2</sup> ]	si	N.M	N.M	N.M
	no	N.M	N.M	N.M
Vehículo-S	no	0,36 ± 0,17	20,14 ± 0,89	63,29 ± 12,65
		N.M	N.M	N.M
Vehículo-G	si	N.M	N.M	N.M
No tratados	no	0,35 ± 0,05	20,00 ± 2,28	68,00 ± 17,62
Glucantime [120 mg/Kg]	no	N.M	N.M	N.M
<b>P=</b>		0,895	0,256	0,614

Las pruebas de función hepática y renal los resultados fueron expresados en términos del promedio aritmético de cada grupo ± la desviación estándar. ANOVA de una vía fue utilizada para comparar los grupos en estudio, el análisis post Hoc fue realizado con la prueba de Bonferroni para detectar diferencias significantes entre los subgrupos. Valores de  $p < 0,05$  fueron considerados estadísticamente significativos. **N.M:** No mostrado.

## 5. DISCUSION

La TDF-PcAICI ha mostrado resultados interesantes en los modelos *in vitro* de *Leishmania* sp evaluados por nuestro grupo (Escobar et al., 2006, Valdivieso et al., 2008) . En este trabajo el rango de especies susceptibles se extendió a *L. amazonensis* (parasito implicado en LC en nuestro medio) y se encontraron resultados que evidencian la actividad y la baja toxicidad de la PcAICI en el modelo experimental de hámsteres con LC.

En los experimentos *in vitro*, los parásitos de *L. amazonensis* fueron susceptibles a la TDF-PcAICI. Un efecto similar había sido mostrado en *L. panamensis* y *L. chagasi* (Escobar et al., 2006) y en promastigotes y amastigotes axénicos de *L. amazonensis* transfectada con proteína verde fluorescente (Dutta et al., 2005). Otros FS del grupo de las fenotiazinas y derivados de porfirinas también han sido activos contra diversas formas de *Leishmania* sp (Akilov et al., 2006a, Morgenthaler et al., 2008, Gardner et al., Bristow et al., 2006). Las diferentes condiciones experimentales utilizadas en la evaluación de los FS (tiempo de incubación del FS, sistema de irradiación, fluencia, etc.) contra *Leishmania* sp hace difícil comparar los resultados obtenidos con cada uno de ellos. De todas maneras la TDF-PcAICI frente a los otros FS exhibe una alta fototoxicidad contra el parásito. Este FS posee propiedades químicas y fotofísicas ideales ya que presenta un alto coeficiente de extinción molar, buena capacidad de producción oxígeno singlete en medios biológicos y un mayor tiempo de vida media del estado excitado singlete y triplete de oxígeno (Bachowski et al., 1991, Nyman & Hynninen, 2004, Rosenthal, 1991). Por otro lado, la ausencia de toxicidad del tratamiento con la PcAICI en condiciones de oscuridad le permite presentar un buen índice fototóxico (IF>2) en todas las formas del parásito demostrándose que la actividad del FS es dependiente de la presencia de luz. Esto es una característica muy importante en un buen FS y constituye un filtro para continuar a una siguiente fase de estudio *in vivo*.

Las células THP-1, los promastigotes y amastigotes axénicos (formas “libres”) fueron más fotosensibles a la TFD-PcAICI que los amastigotes intracelulares de *L. amazonensis*. Esto podría deberse a que las formas libres de *Leishmania* así como la célula THP-1 internalizaron con mayor eficiencia la ftalocianina que lo realizado por el amastigote intracelular. Se ha observado que la PcAICI puede ser internalizada tanto en promastigotes como en células infectadas y no infectadas con los parásitos. Se podría sugerir que el acceso de la PcAICI a los amastigotes intracelulares podría ser menor ya que el FS debe atravesar dos membranas biológicas (la celular y la del fagolisosoma) antes de llegar al sitio donde reside el parásito. Por otra parte se conoce que los FS según sus propiedades estructurales muestran una localización subcelular determinada (ya sea mitocondrias, lisosomas, citoplasma, etc)(Castano *et al.*, 2004). La importancia de esto radica en que las ERO producidas por el FS, dado que tienen un período de vida muy corto (nanosegundos), actuarían preferencialmente en el sitio donde fueron generados (Castano *et al.*, 2004). Una ubicación de la PcAICI en compartimentos diferentes al fagolisosoma induciría un acceso limitado del las ERO en el sitio donde se aloja el amastigote dificultando su inhibición y posiblemente causaría daños a la célula hospedera si es internalizado en otras organelas. Hasta la fecha no se ha reportado una localización preferencial de la PcAICI en los lisosomas. Por el contrario una distribución de la PcAICI citoplasmática ha sido observada en células de menangioma (Malhan *et al.*, 1996) y mitocondrial tanto en células THP-1 no infectadas como infectadas con *L. chagasi* (datos no mostrados).

La TFD ha sido efectiva en la destrucción de diferentes patógenos extracelulares que incluye a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (Demidova & Hamblin, 2005). El uso de la TFD en eliminar microorganismos de localización intracelular es una alternativa que recién empieza a explorarse y resulta más compleja por el compromiso que puede causar en la célula hospedera (Akilov *et al.*, 2006b). Los bajos índices de selectividad encontrados en este trabajo demuestran que la TFD-PcAICI fue fototóxica tanto para el parásito como para la célula hospedera. La

actividad de la TFD-PcAICI ha sido demostrada en células tumorales mostrando una fototoxicidad preferencial por células de leucemia frente a células no tumorales (Daziano *et al.*, 1998). La alta fotosensibilidad de las THP-1 a la TFD-PcAICI puede atribuirse a que estas células provienen de un paciente con leucemia monocítica aguda. Un modelo intracelular utilizando macrófagos de origen no tumoral (como los derivados de sangre periférica humana o de exudado peritoneal en animales de experimentación) podría dar una respuesta más cercana sobre la selectividad de la PcAICI contra el parásito y su efecto fototóxico sobre la célula hospedera.

Una opción para mejorar la selectividad de la PcAICI sobre el parásito es el uso de sistemas de liberación controlada de fármacos (Romero & Morilla, 2008, Cassidy *et al.*, 2009). En un primer intento, nosotros incorporamos la PcAICI en liposomas con el fin de lograr que una mayor concentración del FS se ubicara en el fagolisosoma, sin embargo, al evaluar su actividad en los parásitos se observó que la PcAICI liposomal había aumentado su actividad fototóxica contra el parásito, pero que igualmente había afectado a la célula hospedera (datos no mostrados). Otros mecanismos deben ser explorados con el ánimo de direccionar de forma selectiva el efecto fototóxico de la PcAICI contra el parásito y evitar daños a la célula.

En este trabajo la TFD-PcAICI fue activa en las formas libres de los parásitos. A pesar que aquí no se tiene en cuenta las barreras biológicas celulares, los resultados son importantes en una fase preliminar del estudio, proporcionando información acerca del mecanismo de acción del compuesto. Se sugiere un mecanismo de muerte directo hacia los parásitos diferente por ejemplo al mecanismo de los  $Sb^V$  que sólo son activos contra las formas intracelulares del parásito ya que actúan como una pro-droga y necesitan ser reducido al antimonio trivalente ( $Sb^{III}$ ) dentro de la célula para que pueda eliminar el parásito (Frezard *et al.*, 2009). El efecto fototóxico de la TFD-PcAICI en amastigotes axénicos y

promastigotes corroboró lo observado con los amastigotes intracelulares y permitió hallar las actividades inhibitorias del compuesto que en el caso de los amastigotes intracelulares no se pudieron calcular por el efecto fototóxico de la PcAlCl sobre la célula hospedera. El estudio utilizando amastigotes axénicos (libre de células) en lugar de intracelulares ha sido utilizado en los últimos años ya que para algunos su evaluación representa una técnica menos dispendiosa y más económica. Además estudios han demostrado que la susceptibilidad de amastigotes axénicos a medicamentos de referencia contra *Leishmania* sp ha sido similar a lo observado en amastigotes intracelulares (Callahan *et al.*, 1997).

Con el fin de encontrar un compuesto que tuviera las propiedades fisicoquímicas indispensables para ser utilizada en TFD, se evaluó la actividad de dos ftalocianinas de aluminio con diferentes grados de sulfonación. Se encontró que la TFD con PcAlCl fue considerablemente más activa que con PcAlClS<sub>2</sub> contra todas las formas de *L. amazonensis* Aunque no se conoce en *Leishmania*, el efecto del grado de sulfonación de un FS en células de mamífero ha sido bien descrito (Chan *et al.*, 1990; Margaron *et al.*, 1996; Berg *et al.* 1989). Se ha observado que la internalización y actividad de la PcAlCl en células disminuye con el grado de sulfonación (Chan *et al.*, 1990, Berg *et al.*, 1989). Esto debido a que a mayor sulfonación se aumenta la hidrofiliidad del compuesto haciendo que atraviesen con mayor dificultad la bicapa lipídica de la membrana celular. Otras propiedades fisicoquímicas de los FS como la carga molecular, rendimiento cuántico de oxígeno singlete y la localización subcelular también influyen en la actividad del FS contra *L. major* (Akilov *et al.*, 2006a). En un estudio que correlacionó la carga molecular de los FS con su actividad biológica en *L. major* se observó que los FS catiónicos de la familia de las benzofenoxazinas eran más fototóxicos en promastigotes de *L. major* que los FS aniónicos del grupo de las porfirinas debido a que los primeros interaccionaban mejor con la superficie de la membrana del promastigote la cual presenta una carga negativa. (Akilov *et al.*, 2006a). En nuestro caso, es posible que la carga aniónica de la PcAlClS<sub>2</sub> influyera en la

entrada del compuesto induciendo una menor fototoxicidad contra el parásito. Ensayos preliminares demostraron que promastigotes expuestos a las mismas concentraciones del FS internalizaban la PcAlClS<sub>2</sub> en una menor proporción que la PcAlCl (datos no mostrados).

Igualmente se demostró la TFD-PcAlCl induce una mayor formación de ERO (en su mayoría H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) que la TFD-PcAlClS<sub>2</sub> en promastigotes de *L. amazonensis*. La PcAlCl con diferentes grados de sulfonación ha mostrado que puede inducir la formación de O<sub>2</sub><sup>-</sup>, <sup>1</sup>O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en diferentes medios biológicos (Martins *et al.*, 2004, Viola *et al.*, 1998, Kolarova *et al.*, 2007). Las ERO involucradas en la TFD contra la *Leishmania* sp han sido escasamente estudiadas. Se ha reportado que el <sup>1</sup>O<sub>2</sub> es el causante del daño inicial de las proteínas en *Leishmania* uroporfiricas (Dutta *et al.*, 2008) y que junto con el O<sub>2</sub><sup>-</sup> participan en la inhibición de promastigotes de *L. tarentolae* tratados con ketales de carbaporfirina (Morgenthaler *et al.*, 2008). Estudios adicionales son necesarios para ampliar estos resultados y determinar cuales son las ERO involucradas en el proceso fotodinámico contra *Leishmania* sp utilizando PcAlCl.

Sin embargo y contrario a lo observado en los promastigotes, la TFD-PcAlClS<sub>2</sub> fue más fototóxica que la TFD-PcAlCl en las células THP-1. Adicional a lo previamente descrito con respecto al grado de sulfonación y actividad del FS, debe tenerse en cuenta que en la fototoxicidad de un FS, que junto con las características de la internalización, existen otros aspectos como el grado de agregación del FS en medio acuoso, la localización subcelular, las condiciones experimentales utilizadas (solvente, tiempo de incubación, sistema de irradiación fluencia etc). que podrían estar implicados en la actividad del compuesto (Margaron *et al.*, 1996, Edrei *et al.*, 1998). Podría ser interesante demostrar en experimentos futuros la actividad de la PcAlClS<sub>2</sub> en células diferentes a THP-1 y comparar los resultados.

Continuando con la implementación de la TFD-PcAICI como alternativa terapéutica para la LC se evaluó la actividad de la PcAICI en hámsteres infectados con *L. amazonensis*. En el tratamiento tópico se utilizaron dos formulaciones: la PcAICI en solución que había sido previamente utilizada para el tratamiento de carcinoma en piel en el modelo murino (Kyriazi et al., 2008) y la de gel elaborada con el propósito de mejorar la penetración del FS al sitio de la infección manteniendo sus propiedades fisicoquímicas (Rodríguez et al.)

El esquema de tratamiento de la TFD-PcAICI no se había descrito en el modelo de hámster. En los ensayos *in vitro* siempre se utilizaban diferentes concentraciones del compuesto aplicadas en un mismo tiempo y 24 horas después se irradiaba. El esquema de tratamiento manejado en este estudio contempló la aplicación de cuatro sesiones de TFD-PcAICI. Esto fue realizado teniendo en cuenta lo observado en un trabajo previo donde luego de tres sesiones de TFD con un FS fenotiazínico en ratones infectados con *L. major* se obtuvo una reducción significativa de la carga parasitaria (Akilov et al., 2007b). Asumiendo la importancia del sistema de irradiación en la TFD se procuró utilizar un sistema de irradiación que garantizara la excitación de la PcAICI y que no causara daños en la piel. Con miras al uso posterior en humanos se adquirió una lámpara que ha sido aprobada para el tratamiento de carcinoma de células basales, queratosis actínica y acné con ALA, Photofrin<sup>®</sup>, Visudine<sup>®</sup>, etc. Para tal efecto primero se verificó que no se generara un aumento de la temperatura en la lesión y se usó una fluencia de 50 J/cm<sup>2</sup> (73 mW/cm<sup>2</sup>).

El hámster es un excelente modelo para LC producida por las especies que pertenecen al subgénero *Viannia* los cuales no infectan fácilmente al ratón (Osorio et al., 2003). El desarrollo de lesiones cutáneas en hámsteres causadas por *L. amazonensis* ha sido descrito por otros autores (Sinagra et al., 2007), su implantación como modelo en la evaluación de compuestos contra LC ha sido estandarizado por el grupo PECET de la UDEA. En el modelo, los hámsteres

desarrollaron lesiones típicas de LC causadas por *L. amazonensis* en la base de la cola. En el grupo no tratado, las induraciones y las úlceras aparecieron luego de la primera y tercera semana de infección respectivamente, las cuales se mantuvieron durante todo el experimento, salvo en dos casos donde se observó cura espontánea de las úlceras con posterior relapso. En el día final del experimento no se observó cura espontánea de las lesiones (úlceras e induración), excepto por un hámster que mostró ausencia de úlcera más no de induración. En general se observó heterogeneidad en el tamaño de las lesiones de todos los animales y en algunos casos se observaron diferencias en el tamaño de la lesión entre machos y hembras (Travi *et al.*, 2002). Sin embargo, para no generar sesgo en la respuesta al tratamiento no se tuvo en cuenta el sexo de los animales. En humanos las lesiones por LC pueden desarrollar úlceras pequeñas ó grandes y desfigurantes dependiendo de la especie de *Leishmania* involucrada. Normalmente pueden curar entre 3 y 18 meses después del inicio de la infección lo que dificulta la interpretación de los datos clínicos en los ensayos humanos (Garnier & Croft, 2002). En el examen microscópico de las biopsias se observó un número escaso de amastigotes en algunos hámsteres y solo uno no mostró amastigotes en la lesión. Esto igualmente refleja lo que se encuentra en el diagnóstico directo de la enfermedad en el humano en donde muchas veces aun existiendo úlceras típicas de la enfermedad no se observan parásitos, lo cual hace necesaria la búsqueda de métodos de diagnóstico más sensibles. En nuestro caso la carga también fue realizada por la técnica de dilución límite con el cual se realizará posteriormente una comparación de los hallazgos encontrados.

Dada la complejidad del modelo y a pesar del comportamiento heterogéneo en la evolución, tamaño y carga parasitaria de las lesiones, los resultados encontrados permiten dilucidar algunas características importantes del uso de la TFD-AIPcCI en LC. Sin embargo hay que decir, que para corroborar la información obtenida se están realizando experimentos para completar la *n* de los grupos.

Se encontró que la TFD-PcAlCl-S curó las lesiones mostrando ausencia total de úlcera e induración. En cuanto al recuento de amastigotes se observó una tendencia a la reducción en el número de los parásitos en las biopsias de piel (que no fue significativa con el grupo no tratado), la no eliminación completa de los parásitos al final del tratamiento pudiera sugerir que es necesario modificar los esquemas de tratamiento y las concentraciones del compuesto para lograr un mayor efecto contra los parásitos. En este trabajo fueron realizadas cuatro sesiones de TFD con intervalos de dos días entre una y otra sesión. Mientras que en humanos se ha reportado periodos de tratamiento muchos más largos que van de 4 a 18 semanas en pacientes tratados con ALA mostrando porcentajes de cura entre el 93% y el 100% (Gardlo et al., 2003, Enk et al., 2003, Asilian & Davami, 2006, Ghaffarifar et al., 2006, Sohl et al., 2007). En ratones el uso de la TFD con ALA y Fenotiazinas PPA904 en animales infectados con *L. major* reducen también la carga parasitaria pero no la eliminan completamente (Akilov et al., 2007a, Akilov et al., 2009). Los resultados obtenidos orientan también hacia el uso de tratamiento combinado con Glucantime el cual requeriría menos dosis para ser efectivo y reduciría los efectos adversos observados con los Sb<sup>v</sup>.

De las dos formulaciones evaluadas, la PcAlCl en solución fue la que mejor resultado mostró. Aunque el uso tópico con ambas formulaciones redujo el número de parásitos al final del experimento, la PcAlCl en gel sólo curó un hámster de los cinco evaluados. Se conoce que los compuestos administrados tópicamente deben poseer algunas características que faciliten su absorción en piel como un peso molecular menor a 500, punto de fusión menor a 200 y adecuada solubilidad (Log P de 1 a 3) (Finnin & Morgan, 1999). Aunque la PcAlCl posee algunas de estas características, propiedades como su punto de fusión e hidrofobicidad podrían dificultar su paso a través de la piel por lo que es necesario el desarrollo de una formulación que garantice la penetración del compuesto y el acceso de este al sitio en donde se encuentran los macrófagos infectados. La efectividad mostrada por el tratamiento con PcAlCl en solución podría estar asociado al uso

del solvente orgánico utilizado que en este caso fue el DMSO el cual ha sido utilizado en otras formulaciones experimentales para LC como las de Paromomicina (El-On *et al.*, 1984). Se conoce que el DMSO facilita la permeación de compuestos lipofílicos y se ha descrito que interactúa con lípidos del estrato córneo de la piel y cambia la conformación intercelular de la queratina facilitando el paso del compuesto a través de la piel (Williams & Barry, 2004). Igualmente es posible que la presencia de Tween 80 en la formulación haya facilitado la internalización de la PcAICI mediante su acción surfactante ya que actúa como agente solubilizante alterando la función de barrera de piel (Kogan & Garti, 2006)

A diferencia de los resultados encontrados *in vitro*, en donde claramente se observó que los compuestos era mas activos con luz que sin luz, en el modelo *in vivo* se encontró cierta actividad de los compuestos en los animales controles que permanecieron sin irradiar (2 de 5). La actividad obtenida podría estar relacionada con la concentración de la PcAICI utilizada las formulaciones la cual fue mayor a las evaluadas en los experimentos *in vitro* lo cual podría generar cierta toxicidad. Sin embargo la actividad del tratamiento con luz versus sin luz presentó un índice fototóxico mayor a 2, lo que indica un efecto de la luz en la actividad del compuesto. Por otro lado los vehículos utilizados en la preparación de las formulaciones indujeron aunque en un bajo porcentaje curación de las lesiones. Es importante continuar en la búsqueda de formulaciones en donde el compuesto sea el elemento activo contra el parasito.

Los tratamientos sistémicos más que los tratamientos tópicos han sido recomendados para el tratamiento de LC en el Nuevo Mundo (Ameen). Esto es debido a que la especies involucradas tienen la tendencia a migrar a mucosas y generar lesiones más severas y complejas en el paciente (Herwaldt, 1999). La *L. amazonensis* utilizada en este estudio es una especie del Nuevo Mundo que puede causar tanto LC como LMC. Como se dijo anteriormente ella fue susceptible al TFD-PcAICI sin embargo no fue eliminada completamente con el

tratamiento. El tratamiento con Glucantime, utilizado como medicamento de referencia a una dosis de 120 mg/Kg por administración intramuscular, mostró un 56% de cura en los hámsteres tratados. Este resultado también ha sido encontrado previamente en hámsteres infectados con *L. amazonensis* donde indican que el tratamiento con los Sb<sup>V</sup> limitan la infección pero no la eliminan completamente (de Figueiredo *et al.*, 1999, Sinagra *et al.*, 2007). Estos dos resultados favorecen nuevamente la idea de utilizar combinaciones de TFD y glucantime en dosis subcurativas.

La administración tópica de medicamentos presenta algunas ventajas como su fácil aplicación y la reducción de los efectos adversos que puede presentar la administración sistémica de un FS como la fotosensibilidad cutánea y afección a órganos (Allison *et al.*, 2004). La PcAICI no mostró signos de toxicidad, no alteró el peso, ni la función hepática ni renal en ninguno de los hámsteres tratados. Estos resultados confirman lo anteriormente reportado por PcAICI en donde es considerado como un FS con un excelente margen de seguridad en ensayos clínicos (Chan *et al.*, 1997, Pushpan *et al.*, 2002).

## 6. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en este trabajo muestran que la TFD-PcAlCl constituye una potencial alternativa terapéutica contra la LC.

La actividad fototóxica de la TFD-PcAlCl *in vitro* fue confirmada contra todos los estadios de *L. amazonensis* incluyendo el de amastigotes axénicos. La TFD-PcAlCl fue más fototóxica e indujo mayores ERO que la TFD-PcAlClS<sub>2</sub> mostrando la importancia de la estructura en un FS y sus propiedades fisicoquímicas con respecto a su efecto fotodinámico.

La TFD-PcAlCl aplicada tópicamente usando una formulación en solución curó las lesiones causadas por *L. amazonensis* en los tres animales ensayados, sin embargo no eliminó completamente los amastigotes en el sitio de la lesión. Aunque es necesario aumentar el número de animales por grupo, los resultados obtenidos muestran por un lado la efectividad de la TFD-PcAlCl en LC y por otro sugiere que son necesarios experimentos adicionales para determinar si otras concentraciones del FS son más efectivas para la eliminación del parásito o si es necesario mejorar los esquemas de tratamiento. Igualmente se orienta hacia el uso de tratamientos combinados que permitan la reducción en la toxicidad de los tratamientos utilizados actualmente contra LC. Igualmente dada la actividad que mostraron los vehículos utilizados y la PcAlCl-S sin irradiar se hace necesario la optimización de las formulaciones.

El bajo porcentaje de hámsteres que curaron con la PcAlCl-G en concentraciones similares a la de PcAlCl-S demuestra la importancia del vehículo en la función que cumple como soporte para que el FS acceda a todos los lugares de la piel donde se encuentra el amastigote.

La TFD-PcAlCl contra *L. amazonensis* abre la posibilidad de utilizar este tratamiento en LC del Nuevo Mundo. Aunque debe manejarse con mucha precaución el uso de terapias tópicas para las lesiones causadas por este tipo de especies.

## 7. RECOMENDACIONES

Aumentar el número de animales por grupo para confirmar los resultados obtenidos en experimentos *in vivo*.

Determinar la concentración efectiva de la PcAlCl para eliminar el parásito en las lesiones de hámsteres infectados con *L. amazonensis*.

Mejorar el esquema de tratamiento *in vivo* utilizado en la TFD-PcAlCl

Determinar la actividad de la TFD- PcAlCl en terapias combinadas con medicamentos utilizados actualmente para el tratamiento de la LC.

Optimizar las formulaciones tópicas de PcAlCl.

Evaluar la respuesta al tratamiento con TFD-PcAlCl con especies más prevalentes en nuestro medio como *L. panamensis* y *L. braziliensis*.

## BIBLIOGRAFIA

ABELS, C., C. Fritsch, K. Bolsen, R. M. Szeimies, T. Ruzicka, G. Goerz & A. E. Goetz, 1997: Photodynamic therapy with 5-aminolaevulinic acid-induced porphyrins of an amelanotic melanoma in vivo. *J Photochem Photobiol B*, **40**, 76-83.

ABRAMOVITS, W., M. Losornio, G. Marais & A. Perlmutter, 2006: Cutaneous cryosurgery. *Dermatol Nurs*, **18**, 456-459.

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

-----, O. E., S. Kosaka, K. O'Riordan & T. Hasan, 2007b: Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci*, **6**, 1067-1075.

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

-----, O. E., K. O'Riordan, S. Kosaka & T. Hasan, 2006b: Photodynamic therapy against intracellular pathogens: Problems and potentials. *Medical Laser Application*, **21**, 251-260.

-----, O. E., W. Yousaf, S. X. Lukjan, S. Verma & T. Hasan, 2009: Optimization of topical photodynamic therapy with 3,7-bis(di-n-butylamino)phenothiazin-5-ium bromide for cutaneous leishmaniasis. *Lasers Surg Med*, **41**, 358-365.

ALKHAWAJAH, A. M., E. Larbi, Y. al-Gindan, A. Abahussein & S. Jain, 1997: Treatment of cutaneous leishmaniasis with antimony: intramuscular versus intralesional administration. *Ann Trop Med Parasitol*, **91**, 899-905.

ALLISON, R. R., G. H. Downie, R. Cuenca, X. Hu, C. J. Childs & C. H. Sibata, 2004: Photosensitizer in clinical PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **1**, 27-42.

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

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

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

ARMIJOS, R. X., M. M. Weigel, M. Calvopina, M. Mancheno & R. Rodriguez, 2004: Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop*, **91**, 153-160.

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

-----, A., T. Jalayer, J. A. Whitworth, R. L. Ghasemi, M. Nilforooshzadeh & P. Olliaro, 1995: A randomized, placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. *Am J Trop Med Hyg*, **53**, 648-651.

-----, A., A. Sadeghinia, G. Faghihi & A. Momeni, 2004: Comparative study of the efficacy of combined cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) vs. cryotherapy and intralesional meglumine antimoniate (Glucantime) alone for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, **43**, 281-283.

BACHOWSKI, G. J., E. Ben-Hur & A. W. Girotti, 1991: Phthalocyanine-sensitized lipid peroxidation in cell membranes: use of cholesterol and azide as probes of primary photochemistry. *J Photochem Photobiol B*, **9**, 307-321.

BEN SALAH, A., P. A. Buffet, G. Morizot, N. Ben Massoud, A. Zaatour, N. Ben Alaya, N. B. Haj Hamida, Z. El Ahmadi, M. T. Downs, P. L. Smith, K. Dellagi & M. Grogl, 2009: WR279,396, a third generation aminoglycoside ointment for the treatment of *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis: a phase 2, randomized, double blind, placebo controlled study. *PLoS Negl Trop Dis*, **3**, e432.

BERG, K., J. C. Bommer & J. Moan, 1989: Evaluation of sulfonated aluminum phthalocyanines for use in photochemotherapy. A study on the relative efficiencies of photoinactivation. *Photochem Photobiol*, **49**, 587-594.

BERMAN, J., 2005: Miltefosine to treat leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother*, **6**, 1381-1388.

-----, J. D., D. Waddell & B. D. Hanson, 1985: Biochemical mechanisms of the antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrob Agents Chemother*, **27**, 916-920.

BEYRER, C., J. C. Villar, V. Suwanvanichkij, S. Singh, S. D. Baral & E. J. Mills, 2007: Neglected diseases, civil conflicts, and the right to health. *Lancet*, **370**, 619-627.

BHATTACHARYA, S. K., P. K. Sinha, S. Sundar, C. P. Thakur, T. K. Jha, K. Pandey, V. R. Das, N. Kumar, C. Lal, N. Verma, V. P. Singh, A. Ranjan, R. B. Verma, G. Anders, H. Sindermann & N. K. Ganguly, 2007: Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis*, **196**, 591-598.

BLINDER, K. J., M. S. Blumenkranz, N. M. Bressler, S. B. Bressler, G. Donato, H. Lewis, J. I. Lim, U. Menchini, J. W. Miller, J. M. Mones, M. J. Potter, C. Pournaras, A. Reaves, P. Rosenfeld, A. P. Schachat, U. Schmidt-Erfurth, M. Sickenberg, L. J. Singerman, J. S. Slakter, H. A. Strong, G. Virgili & G. A. Williams, 2003: Verteporfin therapy of subfoveal choroidal neovascularization in pathologic myopia: 2-year results of a randomized clinical trial--VIP report no. 3. *Ophthalmology*, **110**, 667-673.

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

BOYLE, R. W., B. Paquette & J. E. van Lier, 1992: Biological activities of phthalocyanines. XIV. Effect of hydrophobic phthalimidomethyl groups on the in

vivo phototoxicity and mechanism of photodynamic action of sulphonated aluminium phthalocyanines. *Br J Cancer*, **65**, 813-817.

BRAJTBURG, J. & J. Bolard, 1996: Carrier effects on biological activity of amphotericin B. *Clin Microbiol Rev*, **9**, 512-531.

BRISTOW, C., R. Hudson, T. Paget & R. W. Boyle, 2006: Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*, **3**, 162-167.

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

BUYTAERT, E., M. Dewaele & P. Agostinis, 2007: Molecular effectors of multiple cell death pathways initiated by photodynamic therapy. *Biochim Biophys Acta*, **1776**, 86-107.

CALLAHAN, H. L., A. C. Portal, R. Devereaux & M. Grogl, 1997: An axenic amastigote system for drug screening. *Antimicrob Agents Chemother*, **41**, 818-822.  
Cassidy, C. M., M. M. Tunney, P. A. McCarron & R. F. Donnelly, 2009: Drug delivery strategies for photodynamic antimicrobial chemotherapy: from benchtop to clinical practice. *J Photochem Photobiol B*, **95**, 71-80.

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

CLEMENTS, J. S., Jr. & J. E. Peacock, Jr., 1990: Amphotericin B revisited: reassessment of toxicity. *Am J Med*, **88**, 22N-27N.

COLUSSI, V. C., D. K. Feyes, J. W. Mulvihill, Y. S. Li, M. E. Kenney, C. A. Elmets, N. L. Oleinick & H. Mukhtar, 1999: Phthalocyanine 4 (Pc 4) photodynamic therapy of human OVCAR-3 tumor xenografts. *Photochem Photobiol*, **69**, 236-241.

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

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

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

-----, W. S., J. F. Marshall, R. Svensen, J. Bedwell & I. R. Hart, 1990: Effect of sulfonation on the cell and tissue distribution of the photosensitizer aluminum phthalocyanine. *Cancer Res*, **50**, 4533-4538.

DAVALOS, R. & B. Rubinsky, 2004: Electrical impedance tomography of cell viability in tissue with application to cryosurgery. *J Biomech Eng*, **126**, 305-309.

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

DE FIGUEIREDO, E. M., J. Costa e Silva & R. P. Brazil, 1999: Experimental treatment with sodium stibogluconate of hamsters infected with *Leishmania*

(Leishmania) chagasi and Leishmania (Leishmania) amazonensis. *Rev Soc Bras Med Trop*, **32**, 191-193.

DEMIDOVA, T. N. & M. R. Hamblin, 2005: Effect of cell-photosensitizer binding and cell density on microbial photoinactivation. *Antimicrob Agents Chemother*, **49**, 2329-2335.

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

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

DIETZE, R., E. P. Milan, J. D. Berman, M. Grogl, A. Falqueto, T. F. Feitosa, K. G. Luz, F. A. Suassuna, L. A. Marinho & G. Ksionski, 1993: Treatment of Brazilian kala-azar with a short course of amphocil (amphotericin B cholesterol dispersion). *Clin Infect Dis*, **17**, 981-986.

DILKES, M. G., E. Benjamin, S. Ovaisi & A. S. Banerjee, 2003: Treatment of primary mucosal head and neck squamous cell carcinoma using photodynamic therapy: results after 25 treated cases. *J Laryngol Otol*, **117**, 713-717.

DOUGHERTY, T. J., 1987: Studies on the structure of porphyrins contained in Photofrin II. *Photochem Photobiol*, **46**, 569-573.

DUTTA, S., B. K. Kolli, A. Tang, S. Sassa & K. P. Chang, 2008: Transgenic Leishmania model for delta-aminolevulinic acid-inducible monospecific uroporphyrin: cytolytic phototoxicity initiated by singlet oxygen-mediated inactivation of proteins and its ablation by endosomal mobilization of cytosolic uroporphyrin. *Eukaryot Cell*, **7**, 1146-1157.

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

EDREI, R., V. Gottfried, J. E. Van Lier & S. Kimel, 1998: Sulfonated Phthalocyanines: Photophysical properties *in vitro* Cell Uptake and Structure-activity Relationships *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, **2**, 191-199.

EDWARDS, L., A. Ferenczy, L. Eron, D. Baker, M. L. Owens, T. L. Fox, A. J. Hougham & K. A. Schmitt, 1998: Self-administered topical 5% imiquimod cream for external anogenital warts. HPV Study Group. Human PapillomaVirus. *Arch Dermatol*, **134**, 25-30.

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

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

ENK, C. D., K. Gardlo, M. Hochberg, A. Ingber & T. Ruzicka, 2003: [Cutaneous leishmaniasis]. *Hautarzt*, **54**, 506-512.

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

FAN, K. F., C. Hopper, P. M. Speight, G. A. Buonaccorsi & S. G. Bown, 1997: Photodynamic therapy using mTHPC for malignant disease in the oral cavity. *Int J Cancer*, **73**, 25-32.

FARIS, R. M., J. S. Jarallah, T. A. Khoja & M. J. al-Yamani, 1993: Intralesional treatment of cutaneous leishmaniasis with sodium stibogluconate antimony. *Int J Dermatol*, **32**, 610-612.

FIEN, S. M. & A. R. Oseroff, 2007: Photodynamic therapy for non-melanoma skin cancer. *J Natl Compr Canc Netw*, **5**, 531-540.

FINNIN, B. C. & T. M. Morgan, 1999: Transdermal penetration enhancers: applications, limitations, and potential. *J Pharm Sci*, **88**, 955-958.

FREEMAN, M., C. Vinciullo, D. Francis, L. Spelman, R. Nguyen, P. Fergin, K. E. Thai, D. Murrell, W. Weightman, C. Anderson, C. Reid, A. Watson & P. Foley, 2003: A comparison of photodynamic therapy using topical methyl aminolevulinate (Metvix) with single cycle cryotherapy in patients with actinic keratosis: a prospective, randomized study. *J Dermatolog Treat*, **14**, 99-106.

FREZARD, F., C. Demicheli & R. R. Ribeiro, 2009: Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules*, **14**, 2317-2336.

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

GARDNER, D. M., V. M. Taylor, D. L. Cedeno, S. Padhee, S. M. Robledo, M. A. Jones, T. D. Lash & I. D. Velez, Association of Acenaphthoporphyrins with

Liposomes for the Photodynamic Treatment of Leishmaniasis. *Photochem Photobiol.*

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

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

GUREI, M. S., N. Tatli, H. Ozbilge, O. Erel, A. Seyrek, A. Kocyigit & M. Ulukanligil, 2000: Efficacy of cryotherapy and intralesional pentostam in treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Egypt Soc Parasitol*, **30**, 169-176.

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

HOPPER, C., 2000: Photodynamic therapy: a clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol*, **1**, 212-219.

<http://www.dndi.org>.

IRAJI, F. & A. Sadeghinia, 2005: Efficacy of paromomycin ointment in the treatment of cutaneous leishmaniasis: results of a double-blind, randomized trial in Isfahan, Iran. *Ann Trop Med Parasitol*, **99**, 3-9.

JHA, T. K., Y. N. Giri, T. K. Singh & S. Jha, 1995: Use of amphotericin B in drug-resistant cases of visceral leishmaniasis in north Bihar, India. *Am J Trop Med Hyg*, **52**, 536-538.

JICHLINSKI, P. & H. J. Leisinger, 2001: Photodynamic therapy in superficial bladder cancer: past, present and future. *Urol Res*, **29**, 396-405.

JOSEFSEN, L. B. & R. W. Boyle, 2008: Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizers one step closer? *Br J Pharmacol*, **154**, 1-3.

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

KATO, H., 1998: Photodynamic therapy for lung cancer--a review of 19 years' experience. *J Photochem Photobiol B*, **42**, 96-99.

KENDALL, C. A. & C. A. Morton, 2003: Photodynamic therapy for the treatment of skin disease. *Technol Cancer Res Treat*, **2**, 283-288.

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

KOLAROVA, H., R. Bajgar, K. Tomankova, P. Nevrelva & J. Mosinger, 2007: Comparison of sensitizers by detecting reactive oxygen species after photodynamic reaction in vitro. *Toxicol In Vitro*, **21**, 1287-1291.

KYRIAZI, M., E. Alexandratou, D. Yova, M. Rallis & T. Trebst, 2008: Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*, **24**, 87-94.

LAGUNA, F., R. Lopez-Velez, F. Pulido, A. Salas, J. Torre-Cisneros, E. Torres, F. J. Medrano, J. Sanz, G. Pico, J. Gomez-Rodrigo, J. Pasquau & J. Alvar, 1999: Treatment of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients: a randomized trial

comparing meglumine antimoniate with amphotericin B. Spanish HIV-Leishmania Study Group. *AIDS*, **13**, 1063-1069.

LEIBOVICI, V. & H. Aram, 1986: Cryotherapy in acute cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, **25**, 473-475.

LIRA, R., L. M. Contreras, R. M. Rita & J. A. Urbina, 2001: Mechanism of action of anti-proliferative lysophospholipid analogues against the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*: potentiation of in vitro activity by the sterol biosynthesis inhibitor ketoconazole. *J Antimicrob Chemother*, **47**, 537-546.

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

LUX, H., N. Heise, T. Klenner, D. Hart & F. R. Opperdoes, 2000: Ether--lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether--lipid analogues in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, **111**, 1-14.

MAAROUF, M., Y. de Kouchkovsky, S. Brown, P. X. Petit & M. Robert-Gero, 1997: In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Exp Cell Res*, **232**, 339-348.

MALHAN, G. M., R. J. Thomsen, G. J. Finlay & B. C. Bauguley, 1996: Subcellular distribution and photocytotoxicity of aluminium phthalocyanines and haematiporphyrin derivative in cultured human meningioma cells. *Br J Neurosurg*, **10**, 51-57.

MARGARON, P., M. J. Gregoire, V. Scasnar, H. Ali & J. E. van Lier, 1996: Structure-photodynamic activity relationships of a series of 4-substituted zinc phthalocyanines. *Photochem Photobiol*, **63**, 217-223.

MARTINS, J., L. Almeida & J. Laranjinha, 2004: Simultaneous production of superoxide radical and singlet oxygen by sulphonated chloroaluminum phthalocyanine incorporated in human low-density lipoproteins: implications for photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, **80**, 267-273.

MASMOUDI, A., N. Maalej, S. Boudaya, H. Turki & A. Zahaf, 2006: [Adverse effects of intralesional Glucantime in the treatment of cutaneous leishmaniasis]. *Med Mal Infect*, **36**, 226-228.

MATEUS, J. E., E. Paez, F. Martinez & P. Escobar, 2007: Efecto fotodinámico *in vitro* del Acido Aminolevulínico en *Leishmania chagasi*. *Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Medicina*. Universidad Industrial de Santander, Bucaramanga, Colombia.

MODABBER, F., P. A. Buffet, E. Torreele, G. Milon & S. L. Croft, 2007: Consultative meeting to develop a strategy for treatment of cutaneous leishmaniasis. Institute Pasteur, Paris. 13-15 June, 2006. *Kinetoplastid Biol Dis*, **6**, 3.

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

MORRISON, B., I. Mendoza, D. Delgado, O. Reyes Jaimes, N. Aranzazu & A. E. Paniz Mondolfi, Diffuse (anergic) cutaneous leishmaniasis responding to amphotericin B. *Clin Exp Dermatol*, **35**, e116-119.

MORTON, C. A., 2004: Photodynamic therapy for nonmelanoma skin cancer--and more? *Arch Dermatol*, **140**, 116-120.

MOSLEH, I. M., E. Geith, L. Natsheh, G. Schonian, N. Abotteen & S. Kharabsheh, 2008: Efficacy of a weekly cryotherapy regimen to treat *Leishmania major* cutaneous leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, **58**, 617-624.

MOSMANN, T., 1983: Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, **65**, 55-63.

Nathan, T. R., D. E. Whitelaw, S. C. Chang, W. R. Lees, P. M. Ripley, H. Payne, L. Jones, M. C. Parkinson, M. Emberton, A. R. Gillams, A. R. Mundy & S. G. Bown, 2002: Photodynamic therapy for prostate cancer recurrence after radiotherapy: a phase I study. *J Urol*, **168**, 1427-1432.

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

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

NYMAN, E. S. & P. H. Hynninen, 2004: Research advances in the use of tetrapyrrolic photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*, **73**, 1-28.

O'CONNOR, A. E., W. M. Gallagher & A. T. Byrne, 2009: Porphyrin and nonporphyrin photosensitizers in oncology: preclinical and clinical advances in photodynamic therapy. *Photochem Photobiol*, **85**, 1053-1074.

OLIVEIRA-NETO, M. P., A. Schubach, M. Mattos, S. C. da Costa & C. Pirmez, 1997: Intralesional therapy of American cutaneous leishmaniasis with pentavalent antimony in Rio de Janeiro, Brazil--an area of *Leishmania (V.) braziliensis* transmission. *Int J Dermatol*, **36**, 463-468.

OLIVEIRA, A. L., Y. M. Brustoloni, T. D. Fernandes, M. E. Dorval, R. V. Cunha & M. N. Boia, 2009: Severe adverse reactions to meglumine antimoniate in the treatment of visceral leishmaniasis: a report of 13 cases in the southwestern region of Brazil. *Trop Doct*, **39**, 180-182.

OMS, 2006: Control de leishmaniasis. *Resolución No EB 118.R3 del consejo ejecutivo de la OMS en sesión del 30 de mayo de 2006*.

OSORIO, Y., P. C. Melby, C. Pirmez, B. Chandrasekar, N. Guarin & B. L. Travi, 2003: The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunol*, **25**, 139-148.

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

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

PEREZ-VICTORIA, F. J., M. P. Sanchez-Canete, K. Seifert, S. L. Croft, S. Sundar, S. Castanys & F. Gamarro, 2006: Mechanisms of experimental resistance of

Leishmania to miltefosine: Implications for clinical use. *Drug Resist Updat*, **9**, 26-39.

PLAETZER, K., B. Krammer, J. Berlanda, F. Berr & T. Kiesslich, 2009: Photophysics and photochemistry of photodynamic therapy: fundamental aspects. *Lasers Med Sci*, **24**, 259-268.

PROSST, R. L., H. C. Wolfsen & J. Gahlen, 2003: Photodynamic therapy for esophageal diseases: a clinical update. *Endoscopy*, **35**, 1059-1068.

PUOLAKKAINEN, P. & T. Schroder, 1992: Photodynamic therapy of gastrointestinal tumors: a review. *Dig Dis*, **10**, 53-60.

PUSHPAN, S. K., S. Venkatraman, V. G. Anand, J. Sankar, D. Parmeswaran, S. Ganesan & T. K. Chandrashekar, 2002: Porphyrins in photodynamic therapy - a search for ideal photosensitizers. *Curr Med Chem Anticancer Agents*, **2**, 187-207.

Rechtman, E., T. A. Ciulla, M. H. Criswell, A. Pollack & A. Harris, 2002: An update on photodynamic therapy in age-related macular degeneration. *Expert Opin Pharmacother*, **3**, 931-938.

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

RODRIGUEZ, L. V., J. P. Dedet, V. Paredes, C. Mendoza & F. Cardenas, 1995: A randomized trial of amphotericin B alone or in combination with itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, **90**, 525-528.

RODRIGUEZ, M. E., V. E. Diz, J. Awruch & L. E. Dixelio, Photophysics of Zinc (II) Phthalocyanine Polymer and Gel Formulation. *Photochem Photobiol*.

ROMERO, E. L. & M. J. Morilla, 2008: Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. *Expert Opin Drug Deliv*, **5**, 805-823.

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

SACKS, D. L., A. Barral & F. A. Neva, 1983: Thermosensitivity patterns of Old vs. New World cutaneous strains of *Leishmania* growing within mouse peritoneal macrophages in vitro. *Am J Trop Med Hyg*, **32**, 300-304.

SAH, J. F., H. Ito, B. K. Kolli, D. A. Peterson, S. Sassa & K. P. Chang, 2002: Genetic rescue of *Leishmania* deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. *J Biol Chem*, **277**, 14902-14909.

SALMANPOUR, R., M. R. Razmavar & N. Abtahi, 2006: Comparison of intralesional meglumine antimoniate, cryotherapy and their combination in the treatment of cutaneous leishmaniasis. *Int J Dermatol*, **45**, 1115-1116.

SAMPAIO, R. N., C. D. de Paula, J. H. Sampaio, S. Furtado Rde, P. P. Leal, T. T. Rosa, M. E. Rodrigues & J. P. Veiga, 1997: [The evaluation of the tolerance and nephrotoxicity of pentavalent antimony administered in a dose of 40 mg Sb V/kg/day, 12/12 hr, for 30 days in the mucocutaneous form of leishmaniasis]. *Rev Soc Bras Med Trop*, **30**, 457-463.

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

SCHMIDT-OTT, R., T. Klenner, P. Overath & T. Aebischer, 1999: Topical treatment with hexadecylphosphocholine (Miltex) efficiently reduces parasite

burden in experimental cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **93**, 85-90.

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

SEIFERT, K., M. Duchene, W. H. Wernsdorfer, H. Kollaritsch, O. Scheiner, G. Wiedermann, T. Hottkowitz & H. Eibl, 2001: Effects of miltefosine and other alkylphosphocholines on human intestinal parasite *Entamoeba histolytica*. *Antimicrob Agents Chemother*, **45**, 1505-1510.

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

SINAGRA, A., C. Luna, D. Abraham, C. Iannella Mdel, A. Riarte & A. J. Krolewiecki, 2007: The activity of azithromycin against *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the golden hamster model. *Rev Soc Bras Med Trop*, **40**, 627-630.

SLADE, H. B., M. L. Owens, M. A. Tomai & R. L. Miller, 1998: Imiquimod 5% cream (Aldara). *Expert Opin Investig Drugs*, **7**, 437-449.

SOHL, S., F. Kauer, U. Paasch & J. C. Simon, 2007: Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*, **5**, 128-130.

SOLANO, E., H. Hidalgo & R. Zeledon, 1984: [Successful intralesional treatment of leishmaniasis caused by *Leishmania brasiliensis panamensis* using glucantime]. *Med Cutan Ibero Lat Am*, **12**, 19-24.

SOLOMON, M., S. Baum, A. Barzilai, A. Scope, H. Trau & E. Schwartz, 2007: Liposomal amphotericin B in comparison to sodium stibogluconate for cutaneous infection due to *Leishmania braziliensis*. *J Am Acad Dermatol*, **56**, 612-616.

SOTO, J., B. A. Arana, J. Toledo, N. Rizzo, J. C. Vega, A. Diaz, M. Luz, P. Gutierrez, M. Arboleda, J. D. Berman, K. Junge, J. Engel & H. Sindermann, 2004: Miltefosine for new world cutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*, **38**, 1266-1272.

-----, J., J. Rea, M. Balderrama, J. Toledo, P. Soto, L. Valda & J. D. Berman, 2008: Efficacy of miltefosine for Bolivian cutaneous leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg*, **78**, 210-211.

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

-----, J. & P. Soto, 2006b: [Oral miltefosine to treat leishmaniasis]. *Biomedica*, **26 Suppl 1**, 207-217.

SUNDAR, S., 2001: Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. *Trop Med Int Health*, **6**, 849-854.

-----, S., A. K. Goyal, A. K. Mandal, M. K. Makharia, V. P. Singh & H. W. Murray, 1999: Amphotericin B lipid complex in the management of antimony unresponsive Indian visceral leishmaniasis. *J Assoc Physicians India*, **47**, 186-188.

TERWOGT, J. M., I. A. Mandjes, H. Sindermann, J. H. Beijnen & W. W. ten Bokkel Huinink, 1999: Phase II trial of topically applied miltefosine solution in patients with skin-metastasized breast cancer. *Br J Cancer*, **79**, 1158-1161.

TRAVI, B. L., Y. Osorio, P. C. Melby, B. Chandrasekar, L. Arteaga & N. G. Saravia, 2002: Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp. *Infect Immun*, **70**, 2288-2296.

TUON, F. F., V. S. Amato, M. E. Graf, A. M. Siqueira, A. C. Nicodemo & V. Amato Neto, 2008: Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. *Int J Dermatol*, **47**, 109-124.

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

VAN DEN AKKER, J. T., V. Iani, W. M. Star, H. J. Sterenberg & J. Moan, 2000: Topical application of 5-aminolevulinic acid hexyl ester and 5-aminolevulinic acid to normal nude mouse skin: differences in protoporphyrin IX fluorescence kinetics and the role of the stratum corneum. *Photochem Photobiol*, **72**, 681-689.

VARDY, D., Y. Barenholz, R. Cohen, A. Zvulunov, A. Biton, S. Klaus & S. Frankenburg, 1999: Topical amphotericin B for cutaneous leishmaniasis. *Arch Dermatol*, **135**, 856-857.

-----, D., Y. Barenholz, N. Naftoliev, S. Klaus, L. Gilead & S. Frankenburg, 2001: Efficacious topical treatment for human cutaneous leishmaniasis with ethanolic lipid amphotericin B. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, **95**, 184-186.

VEENHUIZEN, R. B. & F. A. Stewart, 1995: The importance of fluence rate in photodynamic therapy: is there a parallel with ionizing radiation dose-rate effects? *Radiother Oncol*, **37**, 131-135.

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

VIOLA, A., A. Jeunet, R. Decreau, M. Chanon & M. Julliard, 1998: ESR studies of a series of phthalocyanines. Mechanism of phototoxicity. Comparative quantitation of O<sub>2</sub><sup>-</sup>. using ESR spin-trapping and cytochrome c reduction techniques. *Free Radic Res*, **28**, 517-532.

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

WEINRAUCH, L., F. Cawich, P. Craig, J. X. Sosa & J. el-On, 1993: Topical treatment of New World cutaneous leishmaniasis in Belize: a clinical study. *J Am Acad Dermatol*, **29**, 443-446.

WHO, 1984: The leishmaniasis: World Health Organization, Geneva.

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

WYLLIE, S., M. L. Cunningham & A. H. Fairlamb, 2004: Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem*, **279**, 39925-39932.

ZAMBRANO, P., 2006: Informe de Leishmaniasis, Colombia, semanas 1 a 52 de 2005.

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