

**EFFECTO FOTODINÁMICO *in vitro* DEL ACIDO AMINOLEVULINICO EN
*Leishmania chagasi***

JAIRO ENRIQUE MATEUS SANCHEZ

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2007**

**EFFECTO FOTODINÁMICO *in vitro* DEL ACIDO AMINOLEVULINICO EN
*Leishmania chagasi***

JAIRO ENRIQUE MATEUS SANCHEZ

Tesis de grado como requisito para optar al título de
Maestro en Ciencias Básicas Biomédicas

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

**UNIVERSIDAD INDUSTRIAL DE SANTANDER
FACULTAD DE SALUD
ESCUELA DE MEDICINA
MAESTRIA EN CIENCIAS BÁSICAS BIOMÉDICAS
BUCARAMANGA
2007**

***A Dios todopoderoso
A mi madre, a mi familia y a mi tutora***

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” COLCIENCIAS por su apoyo financiero. A los doctores Patricia Escobar Rivero, Fernando Martínez y Edgar Páez por su constante guía, a los investigadores del CINTROP UIS por su inagotable paciencia y a mis compañeros del laboratorio de la clínica La Merced. A OLYMPUS, a la universidad Javeriana, a la corporación Micros y a G Barco por facilitar la realización de la microscopía confocal.

**TITULO: EFECTO FOTODINÁMICO *in vitro* DEL ACIDO AMINOLEVULINICO
EN *Leishmania chagasi*.***

**AUTORES: MATEUS SANCHEZ, Jairo Enrique, PAEZ MOZO, Edgar,
MARTINEZ ORTEGA, Fernando, ESCOBAR RIVERO, Patricia****

**PALABRAS CLAVE: Acido aminolevulínico, Fotosensibilizador, Terapia
fotodinámica, *Leishmania*.**

La leishmaniasis es una enfermedad de importancia en salud pública que afecta a cerca de 12 millones de personas en el mundo y cuyo de primera elección son los antimoniales pentavalentes aunque estos presentan problemas como toxicidad y aparición de resistencia. Recientemente se han realizado estudios *in vivo* que evalúan la eficacia de la terapia fotodinámica (TFD) en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea, con resultados prometedores. Resultados obtenidos en los experimentos. El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto fototóxico del ácido aminolevulínico sobre amastigotes intracelulares de *L. chagasi*.

Se evaluó la producción de Protoporfirina IX (PpIX) a partir de ácido aminolevulínico (ALA) por células THP-1 no infectadas e infectadas con *L. chagasi* y su localización subcelular y la fototoxicidad de ALA, ácido aminolevulínico metil-éster (MAL) y PpIX sobre las células THP-1, los promastigotes y los amastigotes intracelulares de *L. chagasi*.

Las células THP-1 produjeron PpIX a partir de ALA, cuya localización fue mitocondrial tanto en células infectadas como no infectadas.

El ALA y MAL mostraron fototoxicidad (irradiación a 2,5 J/cm²) sobre las células THP-1 con CL₅₀ de 0,19 y 0,27 mM respectivamente. No hubo diferencias en la fototoxicidad entre el ALA y el MAL ($p > 0,005$). No se observó fototoxicidad del ALA o MAL sobre promastigotes de *L. chagasi*. La PpIX exógena tuvo un efecto fototóxico contra los promastigotes de *L. chagasi* con CL₅₀ de 3,7 µM e CL₉₀ de 5,0 µM.

No se observó actividad del ALA o MAL *in vitro* sobre los amastigotes intracelulares de *L. chagasi*. Se observó una sensibilidad aumentada de las células THP-1 no infectadas tratadas con ALA o MAL a la irradiación respecto a las células THP-1 infectadas. No hubo actividad fototóxica *in vitro* del ALA o MAL sobre los amastigotes intracelulares. Se hace necesario estudiar el mecanismo de la TFD *in vivo*.

* Tesis de grado de Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas

** Facultad de Salud, Maestría en Ciencias Básicas Biomédicas, Dra Patricia Escobar Rivero

TITLE: *in vitro* ACTIVITY OF AMINOLEVULINIC ACID AGAINST *Leishmania chagasi*.*

AUTHORS: MATEUS SANCHEZ, Jairo Enrique, PAEZ MOZO, Edgar, MARTINEZ ORTEGA, Fernando, ESCOBAR RIVERO, Patricia**

KEY WORDS: Aminolevulinic acid, Photosensitizer, Photodynamic therapy, *Leishmania*.

Leishmaniasis is a group of diseases that affects near 12 million people. Treatment of first choice are the pentavalent antimonials, that presents problems as toxicity and the raise of resistance. There are recent studies *in vivo* of the efficacy of photodynamic therapy (PDT) *in vivo* in the treatment of cutaneous leishmaniasis with encouraging results.

The aim of this study was to evaluate the phototoxic effect of aminolevulinic acid in intracellular amastigotes of *L. chagasi*

We evaluated the Protoporphyrin IX (PpIX) production induced by aminolevulinic acid (ALA) by infected and uninfected THP-1 cells and its subcellular localization and the phototoxicity of ALA, aminolevulinic acid methyl-ester (MAL) and PpIX over THP-1 cells and *L. chagasi* promastigotes and intracellular amastigotes.

THP-1 cells produced PpIX from ALA, and it has a mitochondrial localization in uninfected and infected cells.

ALA and MAL showed phototoxicity (Irradiation: 2,5 J/cm²) on THP1 cells with LC₅₀= 0.19 and 0.27 respectively. There were no differences in phototoxicity between ALA and MAL (p> 0,005). There were no phototoxic effects of ALA or MAL on *L. chagasi* promastigotes. Exogenous PpIX was internalized by *L. chagasi* and had a phototoxic effect (LC₅₀= 3,7 µM and LC₉₀ de 5,0 µM).

There was no *in vitro* activity of ALA or MAL against intracellular amastigotes. A higher sensitivity to irradiation was observed on uninfected THP-1 cells treated with ALA or MAL than the one observed in the infected THP-1 cells treated with ALA or MAL. There was no *in vitro* phototoxic activity of ALA or MAL against intracellular amastigotes. It is necessary to evaluate the mechanisms of action of PDT.

* Thesis of grade of Master in Basic Biomedical Sciences

** Faculty of Health, Master in Basic Biomedical Sciences, Dra Patricia Escobar Rivero

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCION	116
1. ESTADO DEL ARTE	18
1.1 LEISHMANIASIS	18
1.1.1 Definición y distribución geográfica	18
1.1.2 Formas Clínicas	18
1.1.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC)	18
1.1.2.2 Leishmaniasis cutánea difusa (LCD)	18
1.1.2.3 Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	19
1.1.2.4 Leishmaniasis recidivans (LR)	19
1.1.2.5 Leishmaniasis visceral (LV)	20
1.1.2.6 Leishmaniasis post kala-azar (LPKA)	20
1.1.3 Agente causal	20
1.2 TRATAMIENTO	22
1.2.1 Antimoniales pentavalentes	22
1.2.3 Anfotericina B	22
1.2.4 Hexadecilfosfocolina	23
1.2.5 Agentes en desarrollo	24
1.2.5.1 Paromomicina	24
1.2.5.2 Imiquimod	24
1.2.5.3 Azoles	25
1.2.5.4 Métodos físicos	25
1.3 TERAPIA FOTODINÁMICA	26
1.3.1 Historia y fundamento	26
1.3.2 Fotosensibilizadores y fuentes de luz	27

1.3.3 Acido Aminolevulínico	28
1.3.4 TFD en leishmaniasis	29
2. MATERIALES Y METODOS	33
2.1 Químicos y reactivos	34
2.2 Células y parásitos	34
2.3 Fotorreactor biológico	35
2.4 Estudios de solubilidad y estabilidad en solución de ALA y PpIX	35
2.5 Producción de PpIX inducida por ALA por las células THP-1	35
2.6 Localización celular de la PpIX inducida por ALA en las células THP-1	36
2.7 Ensayos de fototoxicidad en células THP-1 transformadas	36
2.8 Ensayos de fototoxicidad en promastigotes	37
2.9 Ensayos de fototoxicidad en amastigotes intracelulares	37
2.9.1 Fototoxicidad del ALA y MAL sobre los amastigotes de <i>L. chagasi</i> en células THP-1	38
2.9.2 Fototoxicidad del ALA y MAL sobre las células THP-1 infectadas y no infectadas	38
2.9.3 Alteraciones morfológicas inducida por la terapia fotodinámica con ALA o MAL sobre células THP-1 infectadas y amastigotes intracelulares de <i>L. chagasi</i>	38
3. RESULTADOS	39
3.1 Solubilidad del ALA y PpIX y estabilidad en solución	39
3.2 Producción de PpIX a partir de ALA por las células THP-1	39
3.3 Localización subcelular de la PpIX producida a partir de ALA en células THP-1	39
3.4 Toxicidad de ALA, MAL y PpIX exógena en células THP-1.	42
3.5 Toxicidad de ALA y PpIX exógena en promastigotes de <i>L. chagasi</i>	43
3.6 Ensayos en amastigotes intracelulares de <i>L. chagasi</i> en células THP-1	45
3.6.1 Toxicidad de ALA y MAL en amastigotes intracelulares de <i>L. chagasi</i> .	45
3.6.2 Disminución de la celularidad en los pozos tratados con ALA o MAL e irradiados	47

3.6.3 Aumento en los porcentajes de infección en las células THP-1 infectadas, tratadas con ALA o MAL e irradiadas	47
3.6.4 Toxicidad de ALA y MAL después de la irradiación sobre las células THP-1 infectadas con <i>L. chagasi</i> y no infectadas	47
3.6.5 Alteraciones morfológicas presentadas por las células THP-1 tratadas con ALA o MAL e irradiadas	48
4. DISCUSIÓN	49
5. CONCLUSIONES	55
BIBLIOGRAFIA	56

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Especies de Leishmania relacionadas con infección en el hombre.	19
Tabla 2. Medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis.	23
Tabla 3. Fotosensibilizadores de uso común en la clínica.	29
Tabla 4. Usos aprobados o en investigación de la TFD.	32
Tabla 5. Actividad de ALA, MAL, PpIX y AmB en células THP-1, promastigotes y amastigotes intracelulares de L chagasi.	45

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de vida de Leishmania	21
Figura 2. Reacciones presentes en la terapia fotodinámica	28
Figura 3. Vía metabólica de síntesis del grupo HEME	31
Figura 4. Diagrama de flujo de las principales etapas llevadas a cabo en esta investigación	33
Figura 5. Fotorreactor biológico	35
Figura 6. Espectro de absorción en el rango UV-visible del Acido Aminolevulínico disuelto en PBS (pH 7,2).	40
Figura 7. Células THP-1 no infectadas produciendo PpIX a partir de ALA exógeno	41
Figura 8. Células THP-1 con PpIX exógena internalizada	42
Figura 9. Localización subcelular de la PpIX producida a partir de ALA en células THP-1 no infectadas observada por epifluorescencia	43
Figura 10. Localización sub-celular de la PpIX producida a partir de ALA en células THP-1, observada por microscopía confocal	44
Figura 11. Toxicidad de ALA y MAL en células THP-1.	46
Figura 12. Internalización de PpIX exógena por promastigotes de <i>L. chagasi</i>	46
Figura 13. Toxicidad de PpIX exógena en promastigotes de <i>L. chagasi</i>	47
Figura 14. Alteraciones morfológicas presentadas por las células THP-1 infectadas después del tratamiento fotodinámico	48

LISTA DE APÉNDICES

APENDICE 1 Medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis	63
APENDICE 2. Fotosensibilizadores utilizados en la clínica	65

ABREVIATURAS

ALA	Ácido Aminolevulínico
AmB	Anfotericina B
BpD-MA	Benzoporfirina Derivativa Monoanillo A
CI ₅₀	Concentración Inhibitoria 50
CI ₉₀	Concentración Inhibitoria 90
CL ₅₀	Concentración Letal 50
CL ₉₀	Concentración Letal 90
DMSO	Dimetilsulfóxido
FS	Fotosensibilizador
Gp63	Glicoproteína 63
HIV	Virus de inmunodeficiencia Humano
HPV	Virus de papiloma Humano
IC	Intervalo de confianza
LC	Leishmaniasis Cutánea
LCD	Leishmaniasis Cutánea Difusa
LMC	Leishmaniasis mucocutánea
LPG	Lipofosfoglicano
LPKA	Leishmaniasis pos kala-azar
LR	Leishmaniasis Recidivans
LV	Leishmaniasis Visceral
MAL	Acido Aminolevulínico Metil-ester
mTHPC	metaTetrahidroxifenilclorina
PBS	Tampón fosfato salino
PcAl	Ftalocianina de Aluminio
PMA	Forbol miristato acetato
PpIX	Protoporfirina IX
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno

SBF	Suero bovino fetal
SIDA	Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida

INTRODUCCION

Se conoce como leishmaniasis al conjunto de enfermedades producidas por parásitos del género *Leishmania*. La enfermedad se encuentra distribuida en áreas tropicales y subtropicales del mundo y tiene una incidencia anual de 1,5 a 2 millones de casos y 350 millones de personas se encuentran en riesgo. (Desjeux, 1999). En Colombia, la enfermedad se presenta en focos endémicos en zonas rurales, registrándose en 2005 alrededor de 18.095 casos, de los cuales 17.983 correspondieron a leishmaniasis cutánea, 60 a leishmaniasis mucocutánea y 54 a leishmaniasis visceral (Saravia y Nichols, 2006).

El tratamiento de primera opción en leishmaniasis son los antimoniales pentavalentes (Glucantime® y Pentostam®), que han sido utilizados por más de 60 años y como segunda opción la anfotericina B (AmB) y la pentamidina (Pentacarinat®). Estos medicamentos tienen una efectividad variable, dependiendo de la ubicación geográfica y del estado inmunológico del paciente. Entre los inconvenientes de su uso se pueden mencionar protocolos largos de administración, aplicación parenteral, toxicidad variable y en algunos casos altos costos (Yamey *et al*, 2002; Davies *et al*, 2002, Croft *et al*, 2005). Esto ha motivado el estudio de nuevas terapias para el tratamiento de todas las formas de la leishmaniasis, enfrentándose a factores tales como la variación de la sensibilidad a los medicamentos entre especies de *Leishmania spp* y los diferentes requerimientos farmacocinéticos de las formas cutánea y visceral de la enfermedad.

Una de las estrategias utilizadas en esta búsqueda es el intercambio terapéutico o “piggy back”, que consiste en evaluar la actividad de compuestos con comprobada efectividad contra otros microorganismos sobre *Leishmania spp*. Tal es el caso de la AmB y Miltefosina, que ya se encuentran en uso y en ensayo clínico respectivamente y de sustancias como los azoles (antifúngicos) y el Imiquimod (antiviral) y la paromomicina (antibiótico), que han mostrado actividad leishmanicida (Croft *et al*, 2006). Recientemente, se ha evaluado la efectividad de la terapia fotodinámica (TFD) contra la leishmaniasis.

La TFD ha sido utilizada como una alternativa en el tratamiento de enfermedades neoplásicas y no neoplásicas desde los años setenta (Huang, 2005). Esta terapia se basa en la capacidad que tienen ciertos compuestos conocidos como fotosensibilizadores (FS) de producir especies reactivas de oxígeno (ROS) tóxicas para la célula blanco ante la irradiación con un haz de luz de determinada longitud de onda. Entre los FS utilizados en la clínica se destaca el ácido aminolevulínico (ALA) como precursor metabólico de la Porphirina IX (PpIX). El ALA no se comporta como un FS, pero es el precursor de la vía metabólica de síntesis del

grupo HEMO, la cual termina en la adición de hierro a la PpIX (que actúa como FS) por la ferroquelatasa para formar HEMO.

Dentro de las ventajas del ALA se cuenta la eliminación rápida y la vía de administración, que puede ser tópica para enfermedades de la piel u oral para enfermedades de cavidad oral o tracto digestivo. Su desventaja está relacionada con el carácter hidrofílico de la molécula, lo que dificulta su entrada a la célula, aunque el uso de sus ésteres ha disminuido este problema. (Triesscheijn *et al*, 2006).

La efectividad de la TFD ha sido evaluada en el tratamiento de la leishmaniasis en estudios *in vivo* e *in vitro*, utilizando diferentes FS. Se ha encontrado que la ftalocianina de aluminio es eficaz en la eliminación de promastigotes de *L. panamensis* y *L. chagasi* (Escobar *et al*, 2006, Dutta *et al*, 2005) y se han realizado estudios *in vivo* con ALA en los que se han reportado curación de lesiones de leishmaniasis cutánea con una mejor cicatrización que el tratamiento tradicional (Ghaffarifar *et al*, 2007, Gardlo *et al*, 2003). Sin embargo, en estudios *in vitro* con *L. major* no se ha logrado la eliminación de los amastigotes intracelulares del parásito, lo que discrepa con los hallazgos encontrados *in vivo* (Kosaka *et al*, 2007)

El objetivo de este trabajo fue el de evaluar el efecto de la terapia fotodinámica sobre *L. chagasi*, como un modelo *in vitro* que permita explicar los hallazgos *in vivo*.

1. ESTADO DEL ARTE

1.1 LEISHMANIASIS

1.1.1 Definición y distribución geográfica. La leishmaniasis es un conjunto de enfermedades resultante del parasitismo de las células del sistema fagocitario mononuclear por parte de un protozoo flagelado del género *Leishmania*. Este es introducido por la picadura de un insecto flebotomíneo que en el Viejo Mundo pertenece al género *Phlebotomus* y en el Nuevo Mundo al género *Lutzomyia* (de Almeida *et al*, 2003).

Las leishmaniasis se encuentran distribuidas en Norte, Centro y Sur América, Europa, Asia y África y son endémicas en áreas tropicales y subtropicales del mundo abarcando al menos 88 países, con una prevalencia de 12 millones de casos y una incidencia anual de 1.5 a 2 millones de casos. En América se han reportado casos desde el norte de Argentina hasta el sur de Texas con la excepción de Uruguay y Chile. En Colombia es una patología endémica en casi todo el territorio nacional, exceptuando San Andrés Islas. Se estima que en el país existen 10 millones de personas en riesgo de contraer la enfermedad (<http://www.ins.gov.co>)

1.1.2 Formas Clínicas. La enfermedad se caracteriza por exhibir diferentes formas clínicas que se presentan de acuerdo con la especie involucrada en la infección (Tabla 1) y pueden ser tegumentarias o viscerales.

1.1.2.1 Leishmaniasis cutánea (LC). La LC comprende un amplio rango de manifestaciones y severidad de la infección. En general, después de la picadura del vector se presentan pápulas que evolucionan a nódulos y posteriormente a lesiones ulcerativas con una depresión central y bordes elevados, siendo este tipo de lesiones características de infección por *L. major* y por especies del Nuevo Mundo. Algunas lesiones no se ulceran sino que permanecen como placas o nódulos, presentación clínica característica de la infección por *L. aethiopica* y por el complejo *L. donovani* (Herwaldt, 1999, Hepburn, 2003, Bailey y Lockwood, 2007).

1.1.2.2 Leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Se caracteriza por la aparición de lesiones no ulcerativas debidas a la diseminación hematogena del parásito a áreas como la cara, extremidades y región inguinal. Es la manifestación más rara de la enfermedad y es de difícil tratamiento. Es causada por *L. aethiopica*

en el Viejo Mundo y por el complejo *L. mexicana* en el Nuevo Mundo (Herwaldt, 1999, Gonzalez y Velez, 2006, Bailey y Locwood, 2007)

Tabla 1. Especies de *Leishmania* relacionadas con infección en el hombre.

AGENTE CAUSAL	FORMA CLÍNICA	DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	LC, LMC	Sur América, Centro América.
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	LC, LMC	Norte de Sur América y Sur de Centro América
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	LC	Perú
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	LC	Sur América
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	LC	Norte de Sur América
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	LC, LV, LCD	Sur América
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	LC, LCD	Centro América, México, USA, Sur América
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	LC, LCD	Etiopía, Kenia
<i>L. (Leishmania) major</i>	LC	Asia central, Medio oriente, Norte y Este de África
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	LC	Centro y Sureste de Asia, Medio oriente y Norte de África
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	LV, LC	África, Centro y Sureste de Asia
<i>L. (Leishmania) infantum*</i>	LV, LC	Europa, Norte de África, Centro y Sur América

LC: leishmaniasis cutánea, LMC: leishmaniasis mucocutánea, LCD: leishmaniasis cutánea diseminada, LV: leishmaniasis visceral. * Algunos autores sostienen que *L. chagasi* se originó a partir de cepas de *L. infantum* traídas a América en tiempos ancestrales (Momem y Cupolillo, 2000). Tabla modificada de Reithinger, 2007

1.1.2.3 Leishmaniasis mucocutánea (LMC). Comienza como una inflamación y congestión nasal seguida de ulceración de la mucosa nasal y perforación del septum. La LMC se debe a la capacidad del parásito de migrar a los tejidos mucosos por vía linfática o hematológica. La LMC puede ser causada por *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. major* y *L. infantum* pero es mas frecuentemente asociada con *L. braziliensis*. Usualmente la LMC está limitada a América del Sur (Gontijo y Ribeiro, 2003, Reithinger *et al*, 2007)

1.1.2.4 Leishmaniasis recidivans (LR). Conocida como leishmaniasis lupoides, consiste en la recurrencia de infección lesiones curadas de LC causadas por *L.*

tropica o *L. braziliensis* (Marovich *et al*, 2001, Markle y Makhoul, 2004, Bailey y Lockwood, 2007)

1.1.2.5 Leishmaniasis visceral (LV). Conocida comúnmente como kala-azar es una enfermedad sistémica caracterizada por una variedad de síntomas dentro de los que se incluyen hepatoesplenomegalia, fiebre recurrente, anemia, pancitopenia, pérdida de peso y debilidad. La enfermedad es invariablemente fatal si no es tratada (Herwaldt, 1999, Hailu *et al*, 2005).

1.1.2.6 Leishmaniasis post kala-azar (LPKA). Es una forma clínica frecuente en la India y Sudán (6-20% de todos los casos de LV) que se presenta entre 6 meses y 5 años después de un tratamiento aparentemente exitoso de la LV. Se caracteriza por la presencia de múltiples máculas hipocrómicas, pápulas eritematosas y nódulos (Bittencourt *et al*, 2002).

1.1.3 Agente causal. Los parásitos del género *Leishmania* fueron descritos de manera independiente por William Leishman y Charles Donovan en 1903 (Herwaldt, 1999, Vannier-Santos, Martiny y de Souza 2003). El género *Leishmania* se divide en dos subgéneros: *Leishmania* y *Viannia*, clasificación adoptada por Lainson y Shaw en 1987 basándose en el patrón de desarrollo del parásito en el vector (Correa, Brazil y Soarez, 2005). El subgénero *Viannia* está restringido al Nuevo Mundo, mientras que el subgénero *Leishmania* está distribuido tanto en el Nuevo como en el Viejo Mundo (Kerr, 2000). Estudios recientes sugieren que ante la separación del supercontinente Gondwana en la era mesozoica, el ancestro común *Euleishmania* evolucionó por separado como *L. (Leishmania)* en África y como *L. (Viannia)* en Sur América (Momen y Cupolillo, 2000).

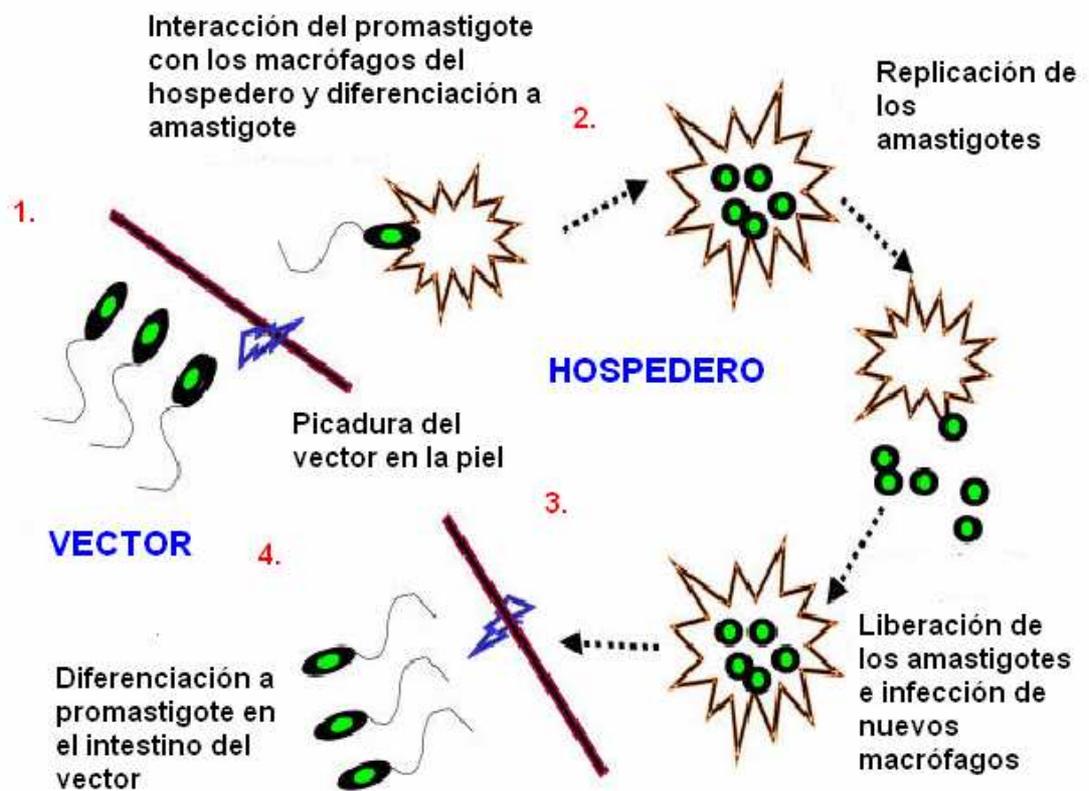
Leishmania sp. es un parásito digenético, es decir que su ciclo de vida involucra dos estadios. En el hospedero invertebrado los parásitos proliferan en su forma flagelada conocida como promastigote, mientras que en el hospedero vertebrado es un parásito intracelular obligado, inmóvil que infecta principalmente fagocitos mononucleares conocido como amastigote (Figura 1; Vannier-Santos, Martiny y de Souza, 2002).

Los promastigotes son células alargadas de 5 a 20 por 1 a 4 μm y un flagelo anterior de cerca de 20 μm de largo. El desarrollo del parásito en el intestino del vector incluye la transformación de una forma no infectiva y que se divide activamente conocida como promastigote procíclico a una forma infectiva que no se divide conocida como promastigote metacíclico (Da Silva y Sacks, 1987).

La infección del hospedero vertebrado por *Leishmania* tiene lugar con la introducción de promastigotes metacíclicos durante la ingesta de sangre del vector, quien lacera los tejidos dérmicos y vasos sanguíneos superficiales formando un hematoma en donde son introducidos los parásitos. Una vez en la

sangre, los promastigotes se unen a los fagocitos mononucleares por medio de los receptores del complemento y receptores de manosa-fucosa entre otros, valiéndose de moléculas expresadas en su superficie, como el LPG y gp63. Una vez en el macrófago, los promastigotes sufren modificaciones morfológicas y bioquímicas transformándose en amastigotes, que son células oblongas de 2 por 4 μm . El ciclo se cierra cuando la hembra del vector ingiere macrófagos infectados o amastigotes libres del hospedero infectado y estos se diferencian en promastigotes procíclicos y proliferan en el intestino del vector (Vannier-Santos, Martiny y de Souza, 2002).

Figura 1. Ciclo de vida de Leishmania.



1. El vector toma se alimenta con sangre e inyecta los promastigotes en la piel. 2. Los promastigotes son fagocitados por macrófagos y se transforman en amastigotes. 3. El vector se alimenta con sangre del hospedero infectado e ingiere los amastigotes. 4. Los amastigotes se transforman en promastigote en el intestino del vector.

1.2 TRATAMIENTO

El tratamiento actual de la leishmaniasis se basa en el uso de antimoniales pentavalentes, que han sido los medicamentos de primera línea desde hace más de 60 años. Como segunda línea se cuenta con compuestos como la pentamidina y la Anfotericina B. La tabla 2 muestra los medicamentos que son utilizados actualmente en el tratamiento de la leishmaniasis y algunos de los compuestos que se encuentran en investigación para tal fin.

1.2.1 Antimoniales pentavalentes. Los antimoniales pentavalentes han sido los medicamentos de primera línea en el tratamiento de la leishmaniasis desde hace casi un siglo. A este grupo de compuestos pertenecen el estibogluconato de sodio conocido comercialmente como Pentostam® (85 mgSb/ml) y el antimoniato de meglumine conocido comercialmente como Glucantime® (100 mg Sb/ml). Para la LC, el tratamiento con antimoniales es parenteral, con una dosis de 20 mg/Kg de peso al día por 28 días. En el caso de la LV se utiliza la misma dosis pero se recomienda administrar el tratamiento por 30 días. La efectividad del tratamiento puede ser de hasta el 95% exceptuando en algunos sitios como la provincia de Bihar del Norte en la India, en donde la resistencia al medicamento para los casos de LV puede llegar hasta el 65% (Ouellette, 1996, Berman, 1996, Sundar, 2006). No obstante, los regímenes de tratamiento utilizados crean una morbilidad considerable, estando relacionados con elevación de las enzimas cardíacas en un 30% de los casos, afecciones gastrointestinales en un 30% de los casos, disminución de la onda T del electrocardiograma en un 10% de los casos y artralgias y mialgias en un 50% de los casos. De manera ocasional se puede presentar trombocitopenia y neutropenia (Gontijo y Ribeiro, 2003). Por otra parte, se ha comprobado que la acción de los antimoniales pentavalentes depende del sistema inmune del hospedero (inmunodependencia), especialmente de la inmunidad celular, lo que causa que el tratamiento sea menos efectivo en pacientes con HIV/SIDA (Murray, 2001, Jha, 2006).

1.2.3 Anfotericina B. La anfotericina B (Fungizone®) es un antibiótico polieno aislado del hongo *Streptomyces nodosum* que se utiliza principalmente en el tratamiento de las micosis. Su uso en el tratamiento de la leishmaniasis se remonta a los años sesenta (Agrawal, Ray y Sundar, 2005, Sundar y Chatterjee, 2006). La dosis indicada en LV es de 0,75 a 1 mg/kg de peso al día por 15 a 20 días (Jha, 2006), pero se relaciona casi siempre con reacciones secundarias como fiebre, escalofríos, y tromboflebitis y ocasionalmente con efectos tóxicos severos como miocarditis, hipocalcemia severa y disfunción renal que pueden llevar a la muerte, por lo que se hace necesario la hospitalización del paciente para monitoreo constante (Sundar y Chatterjee, 2006).

Estos efectos tóxicos de la AmB han sido disminuidos notoriamente mediante el uso de formulaciones del compuesto asociadas a lípidos, lo que favorece la internalización preferencial por parte de las células del sistema fagocitario

monocítico, alcanzando de esta manera una entrega dirigida del compuesto a los parásitos, resultando en una mayor eficacia y menor toxicidad (Gradoni, Gramiccia y Scaloni, 2003, Sundar y Chaterjee, 2006). Existen tres formulaciones lipídicas de Anfotericina B disponibles comercialmente: AmBisome®, Abelcet® y Amphocil®, cuya dosis recomendada es de 3-5 mg/Kg de peso al día por 3-5 días o una dosis única de 15 mg/kg de peso (Murray, 2004, Jha, 2006). El principal inconveniente de estas formulaciones es su alto costo, que puede llegar a ser hasta 10 veces mayor que la terapia convencional.

Tabla 2. Medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis.

MEDICAMENTO	FORMA CLINICA	DOSIS	VIA DE ADMINISTRACIÓN
Antimoniales Pentavalentes	LC	20 mg/Kg al día por 20 días.	Parenteral
	LV	20 mg/Kg al día por 30 días.	
Pentamidina	LC	4 mg/Kg de peso día por medio por 20 días.	Parenteral
	LV	3 mg/Kg peso día por medio por 8 días.	
Anfotericina B	LC, LV	0,75-1 mg/Kg de peso al día.	Parenteral
Anfotericina B lipídica	LC, LV	18-24 mg/Kg de peso al día.	Parenteral
Hexadecilfosfocolina	LC, LV	2-5 mg/kg de peso por 28 días	Oral
Paromomicina	LC	Ungüento al 5%	Tópica
Imiquimod	LC	Crema al 5%	Tópica
Fluconazol	LMC	4 mg/Kg de peso al día	Oral

LC: leishmaniasis cutánea, LMC: leishmaniasis mucocutánea, LV: leishmaniasis visceral

1.2.4 Hexadecilfosfocolina. La hexadecilfosfocolina (Miltefosine) es un alquilfosfolípido sintetizado originalmente como agente anti-cáncer. Su efecto anti-*Leishmania* fue descubierto a mediados de la década de los ochenta y se constituye en el primer tratamiento oral efectivo contra la leishmaniasis. Miltefosine se ha registrado como tratamiento para la LV en la India y para la LC en Colombia. Se utilizan dosis de 2 a 5 mg/Kg de peso al día por 28 días.

Las principales limitaciones de este compuesto están relacionadas con su teratogenicidad en ratones, el desarrollo potencial de resistencia, que ha sido observado experimentalmente y la baja ventana terapéutica (Murray, 2001, Prasad *et al*, 2004). Se ha encontrado que la sensibilidad de las especies de *Leishmania* al medicamento es variable. Para leishmaniasis cutánea por *L. panamensis* se lograron porcentajes de curación del 91% en pacientes colombianos, mientras que en Guatemala, la tasa de curación para leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis* y *L. mexicana* fue de 33 y 60% respectivamente. Recientemente se demostró una diferencia *in vitro* en la sensibilidad a la miltefosina entre amastigotes de *L. donovani* y *L. braziliensis* de entre el 3 y 20 veces. Estas diferencias podrían tener repercusiones en el uso clínico del compuesto (Soto y Soto, 2006).

1.2.5 Agentes en desarrollo.

1.2.5.1 Paromomicina. La paromomicina (aminosidina) es un antibiótico aminoglucósido utilizado en el tratamiento de la diarrea por *Giardia*, amebas o *Cryptosporidium*. Este agente fue identificado como leishmanicida desde 1960 y ha sido evaluado en ensayos clínicos para LC y LV (Croft *et al*, 2006). Actualmente existen dos preparaciones tópicas disponibles para el uso en leishmaniasis: paromomicina Sulfato al 15% disuelta en una base suave de parafina bien sea con 12% de metil- benzoteno cloruro o con 10% de urea. Se ha demostrado que el uso de paromomicina tópica en cualquiera de sus preparaciones puede alcanzar porcentajes de curación del 69% en Irán (Shazad, Abbaszadeh y Khamesipour, 2005) y del 85,7% en Guatemala (Arana *et al*, 2001). Sin embargo, existen también reportes en los que no se encuentra una buena actividad de paromomicina, como el de Neva *et al*, quien evaluó la paromomicina en 55 pacientes con LC en Honduras y no halló diferencias en cuanto a la actividad del compuesto y el placebo (Neva *et al*, 1997). Igualmente en Irán, la formulación de paromomicina con 10% de urea no tuvo eficacia en el tratamiento de lesiones cutáneas. Se piensa que existen variaciones en la respuesta al tratamiento con paromomicina dependientes de la especie de *Leishmania* y del tipo de lesión. Además, se hace necesario el desarrollo de nuevas formulaciones de paromomicina que mejoren la farmacodinámica del compuesto (Croft *et al*, 2006).

1.2.5.2 Imiquimod. El imiquimod (Aldara®) es utilizado en enfermedades de la piel inducidas por el virus de papiloma humano (HPV). Este compuesto es un modificador de la respuesta inmune que actúa principalmente en los monocitos y macrófagos, induciendo una respuesta Th1 con un incremento en la liberación de interferón α , factor de necrosis tumoral α e interleucinas 1, 6 y 8 (Minodier y Parola, 2007). Estudios *in vitro* han demostrado que el tratamiento con imiquimod induce la expresión de óxido nítrico sintasa en macrófagos infectados con *L. donovani* (Buates y Matlashewski, 1996). También se ha

reportado el uso exitoso de imiquimod en combinación con antimoniales pentavalentes (Arevalo *et al*, 2001). En este caso, el uso tópico de una crema de imiquimod al 5% día por medio por 20 días al tiempo con la administración de 20 mg/Kg de peso diario de Glucantime resultó en tasas de curación cercanas al 90% después de 6 meses (Arevalo *et al*, 2001). Sin embargo, el uso de imiquimod como monoterapia en pacientes con leishmaniasis del Viejo Mundo mostró una efectividad únicamente durante las dos primeras semanas, dado que después de ocho semanas las lesiones mostraron progresión (Seeberger, Daoud y Pammer, 2003).

1.2.5.3 Azoles. De la misma manera que la AmB, los medicamentos antifúngicos conocidos como azoles, pueden inhibir la síntesis de ergosterol mediante la inhibición de la demetilación del lanosterol. Estos compuestos pueden ser administrados oralmente, pero su eficacia varía entre especies de *Leishmania* (Minodier y Parola, 2007). En un estudio en Arabia, el 79% de los pacientes tratados con Fluconazol tuvieron curación completa de sus lesiones (Alrahi *et al*, 2002). En un estudio piloto en Brasil, se encontró que la administración oral de 4 mg/Kg de peso al día de Itraconazol lograba un 60% de curación de lesiones de LMC en pacientes del hospital de la facultad de medicina de la universidad de Sao Paulo (Amato *et al*, 200).

1.2.5.4 Métodos físicos. Los métodos físicos constituyen una alternativa en el tratamiento de LC, sin embargo deben ser utilizados con precaución en los casos de LC del Nuevo Mundo por la posibilidad que tienen la mayoría de las especies involucradas de migrar hacia los ganglios y mucosas (Bailey y Lockwood, 2007). Se ha encontrado que la aplicación de frío o calor en las lesiones de la LC puede ser de utilidad en el tratamiento de la enfermedad. La aplicación tópica de nitrógeno líquido con un hisopo en las lesiones de LC por 20 a 30 segundos dio como resultado porcentajes de curación de hasta el 100% en pacientes en Egipto, Jordán e Israel (Blum, 2004) y en soldados norteamericanos que adquirieron la enfermedad en Iraq (Willard, 2005). En otros estudios realizados en Turquía, la efectividad de la crioterapia ha sido menor que la del tratamiento estándar con estibogluconato de sodio intralesional. La aplicación de calor puede ser realizada mediante un láser o por radiofrecuencia. En el primer caso, la aplicación de una temperatura de 55°C por 5 minutos dio como resultado la curación de 177 pacientes de 178 tratados; sin embargo, la aplicación de este tratamiento está relacionada con la aparición de vesículas cutáneas (Blum *et al*, 2004). La aplicación de calor mediante radiofrecuencia por lapsos de 30 segundos dio como resultado la curación de 25 pacientes de 26 tratados (Willard *et al*, 2005).

1.3 TERAPIA FOTODINÁMICA

1.3.1 Historia y fundamento. El uso de la TFD fue inicialmente reportado hace más de 100 años, cuando Oscar Raab observó que la iluminación de cultivos microbianos en presencia de acridina resultaba en muerte celular. Posteriormente, en 1903 von Tapiener y Jesionek utilizaron eosina tópica para el tratamiento de tumores cutáneos en la clínica de dermatología de Munich (O'Riordan, Akilov y Hassan, 2005). Sin embargo, fue hasta 1960 cuando inició la era actual de la TFD, con los trabajos de Lipton y Baldes, quienes encontraron que los tejidos neoplásicos de pacientes quirúrgicos de la clínica Mayo presentaban fluorescencia bajo luz ultravioleta después de la administración de una mezcla de porfirinas preparada por Samuel Schwartz, quien experimentó con varios productos sintéticos para formar lo que él llamó hematoporfirina derivativa (HpD). A comienzos de los años setenta el grupo de investigación de Dougherty en el Roswell Park Cancer Institute estableció un protocolo para la elaboración de HpD a gran escala al tiempo que se desarrollaban fuentes de luz apropiadas que permitían la entrega de flujos de luz significativos en sitios como vejiga, pulmón y esófago, lo que generó el desarrollo de diversos protocolos de TFD en varias partes del mundo (Dougherty et al, 1998, Huang, 2005).

La TFD se basa en la capacidad de compuestos conocidos como fotosensibilizadores (FS) de excitarse en presencia de luz e interactuar con el oxígeno molecular para formar especies reactivas de oxígeno (ROS) (Figura 2). El proceso inicial en el mecanismo de fotosensibilización es la absorción de un fotón de luz por parte del FS (1FS), que pasa de un estado basal a un estado excitado altamente inestable conocido como singulete (1FS*), cuya vida media es de 10^{-9} a 10^{-6} segundos. El FS singulete excitado puede volver a su estado basal emitiendo fluorescencia o realizar lo que se conoce como cruce intersistema que le permite pasar a un estado de triplete (3FS*), cuya vida media es de 10^{-3} segundos.

Este FS en estado de triplete puede realizar dos tipos de reacción: la primera o de Tipo I involucra la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno a moléculas orgánicas produciendo una forma radical del FS que a su vez reacciona con el oxígeno para formar peróxido, iones superóxido y radicales hidroxilo. La segunda reacción o de Tipo II está mediada por el proceso de transferencia de energía directamente del FS excitado al oxígeno en estado basal generando oxígeno singulete y FS en estado basal (Luzkiene, 2003, Castano et al, 2004, Triesscheijn et al, 2006).

Las ROS generadas por la TFD tienen un margen de migración muy corto, por lo que el daño oxidativo ocurre únicamente en el área circundante al sitio celular en donde se localice el FS. Esta localización depende de la estructura química del FS y al igual que la dosis de luz utilizada, es importante de cara al mecanismo de muerte celular generado por la TFD, que puede ser necrosis o apoptosis. De manera general se cree que a bajas dosis de luz el efecto

observado es de apoptosis mientras que a altas dosis de luz se induce necrosis. Por otra parte, los FS localizados en la membrana celular inducen principalmente necrosis, probablemente debido a la pérdida de integridad de la membrana citoplasmática y la pérdida de ATP, mientras que los FS localizados en la mitocondria inducen principalmente apoptosis, ocasionada por liberación del citocromo c (Castano et al, 2004, Nayak, 2005, Juzeniene y Moan, 2005).

La TFD está aprobada o se encuentra en investigación para un gran número de enfermedades malignas, inflamatorias, degenerativas e infecciosas (Ver Tabla 4). La TFD tiene ventajas sobre otro tipo de tratamientos, principalmente relacionados con el daño reducido al tejido conectivo y al mantenimiento de la integridad funcional de los órganos tratados y la posibilidad de ser repetida en casos de recurrencia, lo que sería muy difícil con la cirugía o la radioterapia.

Dentro de las patologías mas frecuentemente tratadas se encuentran varios tipos de cáncer como el de esófago, pulmón, vejiga y próstata, enfermedades de la piel como el acné y verrugas y algunas enfermedades infecciosas como el molusco contagioso y la infección por *Staphylococcus aureus* resistente a la metilicina. Recientemente se ha evaluado el uso de la TFD en el tratamiento de la LC (Shakley et al, 1999).

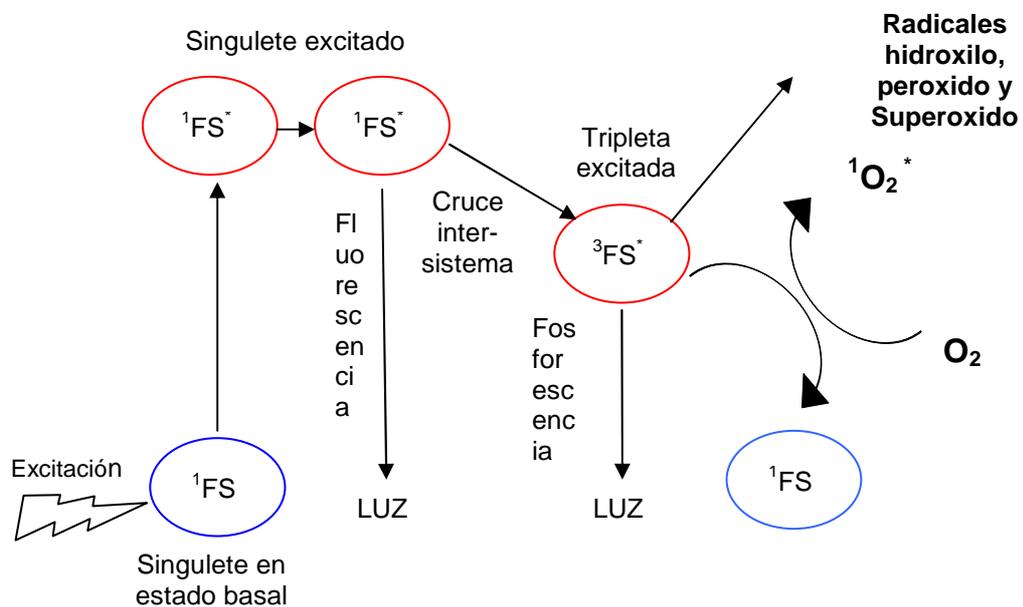
1.3.2 Fotosensibilizadores y fuentes de luz. El primer FS utilizado fue la hematoporfirina derivativa (HpD), que mostraba ciertos inconvenientes como la fotosensibilización a largo plazo del paciente y la falta de una banda de absorción adecuada a 650 nm, además de una acumulación deficiente en el tumor. Esto sirvió para definir el FS ideal, que se caracteriza por tener bajos niveles de toxicidad en la oscuridad, absorber luz a longitudes de onda mayores a 630 nm, lo que permite una mayor penetración en los tejidos, tener bandas de absorción relativamente altas para minimizar la dosis de FS requerida para lograr el efecto deseado y su síntesis debe ser relativamente sencilla. El FS debe ser un compuesto sencillo, soluble en agua y soluciones acuosas y de eliminación rápida para evitar la fotosensibilización prolongada del paciente (Castaño et al, 2004, Huang, 2005).

Estos requisitos son cumplidos por una serie de sustancias (Tabla 3) que en su mayoría poseen un anillo heterocíclico similar al del grupo HEMO. Los FS se clasifican según su estructura en tres grandes familias: (i) los FS basados en porfirina como el Photofrin, la Benzoporfirina Derivativa y la Protoporfirina IX producida a partir de ácido aminolevulínico (ALA), (ii) FS basados en clorofila como las clorinas, bacterioclorinas y purpurinas y (iii) las tinciones como las Ftalocianinas y Naftalocianinas. Se pueden clasificar también según la época en que fueron desarrollados, de manera que a los FS desarrollados en la década de los setenta se les conoce como FS de primera generación (i.e. Photofrin), a los derivados de porfirinas y FS sintéticos desarrollados en los ochenta como de segunda generación (i.e. ALA, ftalocianinas) y a las modificaciones realizadas a estos últimos, como la asociación con anticuerpos

o liposomas se les conoce como FS de tercera generación (Huang, 2005, Juzeniene y Moan, 2005).

Otra variable de importancia en la TFD es la fuente de luz. Inicialmente se utilizaron lámparas de descarga de gas convencionales (tubos fluorescentes) para alcanzar la fotosensibilización, pero el desarrollo del láser con fibra óptica permitió la expansión de la aplicabilidad de la técnica en medicina, haciendo posible la entrega de luz endoscópicamente a cualquier cavidad del cuerpo. A este grupo de láser pertenecen el láser de vapor de cobre y láser ajustables de estado sólido como el láser de neodimio (YAG). Pese a sus ventajas, estos láser son costosos, inmóviles y emiten una sola longitud de onda, por lo que se

Figura 2. Reacciones presentes en la terapia fotodinámica



El FS en estado basal es excitado por un fotón de luz y pasa a un estado de singulete excitado. El singulete excitado puede volver al estado basal emitiendo luz o realizar un cruce intersistema y convertirse en una tripleta excitada. La tripleta excitada puede interaccionar con moléculas orgánicas para formar radicales hidroxilo, peróxido y superóxido (reacción Tipo I) o directamente con el oxígeno para formar oxígeno singulete y FS en estado basal (reacción Tipo II).

hizo necesario el desarrollo de fuentes de luz más versátiles como las lámparas de metal halógeno que emiten luz entre 600 y 800 nm con alta potencia, lámparas de xenón ajustables entre 400 y 1200 nm y láser portátiles de Galio-Aluminio-Arsénico que producen luz entre 770 y 850 nm (Huang, 2005, Nayak, 2005).

1.3.3 Acido Aminolevulínico. El ácido aminolevulínico (ALA) constituye un nuevo enfoque en la terapia fotodinámica, dado que involucra la administración de un precursor metabólico de un FS. El ácido aminolevulínico es sintetizado

naturalmente por las células a partir de Glicina y Succinil Coenzima A e internalizado en la mitocondria para integrarse a la vía metabólica de síntesis del grupo HEME (Figura 3), la cual termina con la conversión de Protoporfirina IX (PpIX) en HEME por la enzima ferroquelatasa. Dicha vía es regulada por retroalimentación cuando la concentración de HEME aumenta, inhibiendo la síntesis de ALA por la enzima ALA sintetasa. De esta manera, al administrar ALA exógeno, se evade el punto de regulación de la vía metabólica y se sobrepasa la capacidad catalítica de la ferroquelatasa, dando como resultado la acumulación de PpIX, que es el compuesto que actúa como FS. Dentro de las ventajas del ALA se cuentan la acumulación selectiva en el tejido blanco, la flexibilidad en las vías de administración, que pueden ser oral, intravenosa o tópica, no se genera una fotosensibilización prolongada del paciente y por no ser el ALA un precursor metabólico del FS muestra muy baja toxicidad en la oscuridad (Peng, 1997, Castano *et al*, 2004, Quiang *et al*, 2006, Casas y Batlle, 2006 Juzeniene y Moan, 2007).

Tabla 3. Fotosensibilizadores de uso común en la clínica.

FOTOSENSIBILIZADORES DE USO COMUN			
Fotosensibilizador	Abreviación	Nombre genérico	Fabricante
Polihematoporfirin eter/ester	Porfimer sodio	Photofrin	Axcan Pharma, Inc
Hematoporfirina derivativa	HpD	Photosan	SeeLab F&E GmbH
Benzoporfirina derivativa monoácido anillo A	BPD-MA, verteporfin	Visudyne	Novartis pharmaceuticals
Acido 5 aminolevulínico	ALA	Levulan	DUSA Pharmaceuticals, Inc
Metilaminolevulinato	MLA	Metvix	PhotoCure ASA
Meta- tetrahidroxifenilclorina	mTHPC, Temoporfin	Foscan	Biolitec AG
Ftalocianina de Aluminio sulfonada	PcAIS ₂₋₄	Photosens	General Physics Institute
Azul de Toluidina O	TBO	SaveDent PAD	Denfotex, Ltd

1.3.4 TFD en leishmaniasis. El uso de la terapia fotodinámica en leishmaniasis tuvo su origen con los estudios de Sah *et al* en el 2002. Se ha descrito que *Leishmania* carece de algunas de las enzimas de la vía de síntesis del grupo HEME, por lo que no pueden sintetizar sus propios anillos pirrolicos. La transfección de los genes que codifican para ALA deshidratasa y porfobilinogeno deaminasa en los parásitos de *Leishmania* llevó a la

producción de porfirinas por parte del parásito, aunque estos siguieron siendo dependientes de la hembra en el medio de cultivo. Estos parásitos porfíricos fueron sensibles a la irradiación con luz UV y más aún al infectar a macrófagos J774 con los parásitos porfíricos e irradiarlos con luz UV, se causó muerte de las células J774. No se observó toxicidad en las células infectadas con parásitos no transfectados, lo que indica que los parásitos porfíricos tuvieron la capacidad de fotosensibilizar a las células J774 (Sah *et al.* 2002).

Estudios posteriores han evaluado la eficacia de la TFD en la eliminación de formas extracelulares e intracelulares de *Leishmania* utilizando diferentes FS en estudios *in vivo* e *in vitro*. La ftalocianina de aluminio (PcAl) demostró ser efectiva en la eliminación de promastigotes de *L. amazonensis*. La incubación de los promastigotes por 16 horas con 5 µg/ml de PcAl seguida de irradiación con una luz roja de longitud de onda mayor a 650 nm con una potencia de 1 J/cm² resultó en una destrucción del 50% de los parásitos.

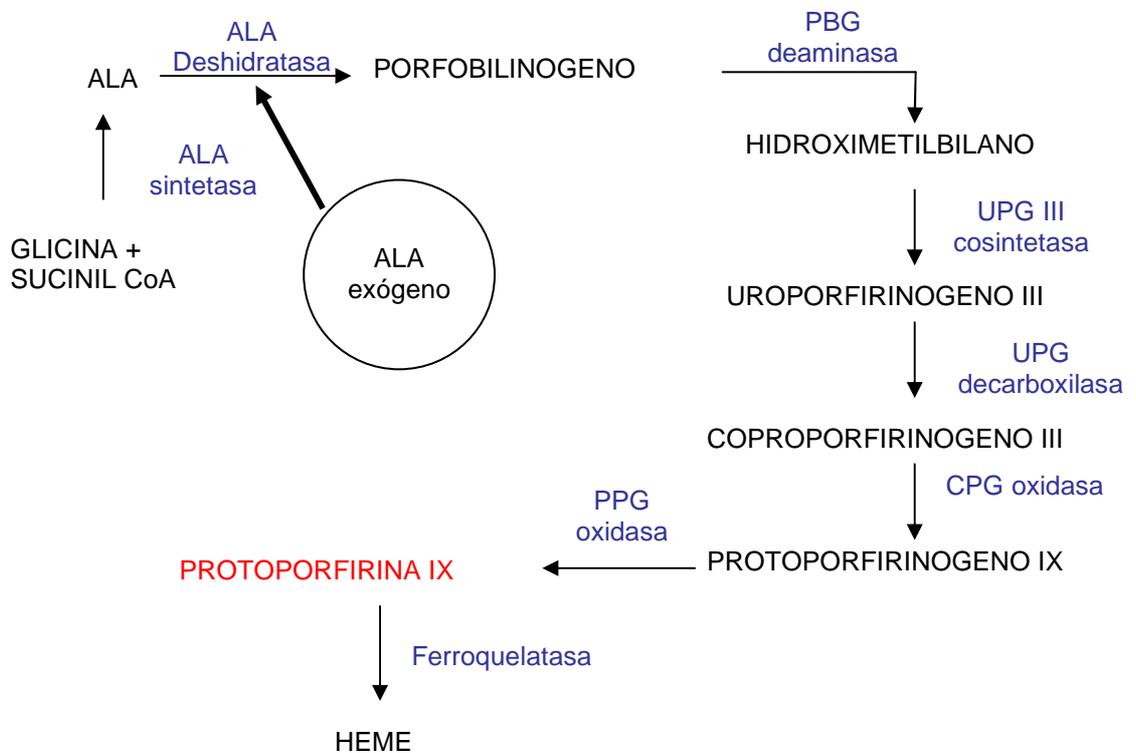
Los amastigotes axénicos e intracelulares infectando macrófagos murinos J774.2 mostraron un comportamiento similar ante el mismo tratamiento (Dutta *et al.*, 2005). Estos hallazgos fueron confirmados cuando promastigotes de *L. panamensis* y *L. chagasi* fueron tratados con PcAl y ftalocianina de Zinc (PcZn). Se encontró que la incubación de los parásitos por 24 horas con las ftalocianinas y su posterior irradiación con un láser a 670 nm con potencias de 10, 5 y 2,5 J/cm² resultaba en destrucción de los promastigotes. También se encontró que la PcAl fue más activa que la PcZn y que los promastigotes de *L. chagasi* fueron más sensibles que los de *L. panamensis* al tratamiento con PcAl (Escobar *et al.*, 2006).

En el caso del ALA, estudios *in vivo* han demostrado la curación de lesiones de LC utilizando la TFD. En 2003, se sometió a un paciente libio de 34 años con 10 lesiones de LC causadas por *L. donovani* a TFD, utilizando la solución comercial Metvix® (20% ALA) en parches por 5 horas e irradiando con una luz de 570 a 670 nm a una potencia de 75 J/cm². Todas las lesiones mejoraron después de 4 a 6 sesiones de TFD y mostraron criterios clínicos de curación después de 20 sesiones. Después de 16 meses de la última sesión de TFD no habían signos clínicos de recurrencia y los títulos de anticuerpos contra *L. donovani* estaban en un nivel normal (Gardlo, 2003). Por otra parte, en 2006 se trataron 5 pacientes con LC con una solución de ALA al 10% en parches por 4 horas e irradiación con una luz de 570-670 nm y una potencia de 100 J/cm². Después de 2 sesiones, no había evidencia histológica de la presencia de amastigotes. Las lesiones disminuyeron de tamaño y desaparecieron a las dos semanas después de la cuarta sesión (Ghaffarifar *et al.*, 2007).

Pese a esto, estudios comparativos entre la actividad de la TFD con ALA *in vivo* e *in vitro* han tenido resultados divergentes. En dichos trabajos se encontró que el tratamiento *in vivo* con ALA al 20% por 4 horas y la posterior irradiación con un láser de 635 nm a una potencia de 50 J/cm² sobre lesiones de LC causada por *L. major* en ratones BALB/c lograba una disminución en el número

de parásitos aislados de la lesión, así como del número de macrófagos presentes en el tejido. Sin embargo, el tratamiento *in vitro* con ALA 1 mM por 6 horas y la posterior irradiación con un láser de 635 nm a potencias desde 0 hasta 50 J/cm² no fue efectivo en la eliminación de los amastigotes intracelulares de *L. major* infectando células J774.2. Esto hace suponer que el efecto de la TFD observado en los experimentos *in vivo* es posible que no fuera causado por la eliminación directa del parásito sino por mecanismos indirectos como la disminución en el número de monocitos en el área tratada (Kosaka *et al*, 2007, Akilov *et al*, 2007)

Figura 3. Vía metabólica de síntesis del grupo HEME



El ALA es formado a partir de glicina y succinil coenzima A por la enzima ALA sintetasa, que se localiza en la membrana mitocondrial interna. Las siguientes enzimas, que llevan a la síntesis de coproporfirinogeno III, que vuelve a la mitocondria, en donde es metabolizada hasta protoporfirina IX. La enzima ferroquelatasa le adiciona hierro al anillo tetrapirrólico de la protoporfirina IX para formar HEMO.

Tabla 4. Usos aprobados o en investigación de la TFD.

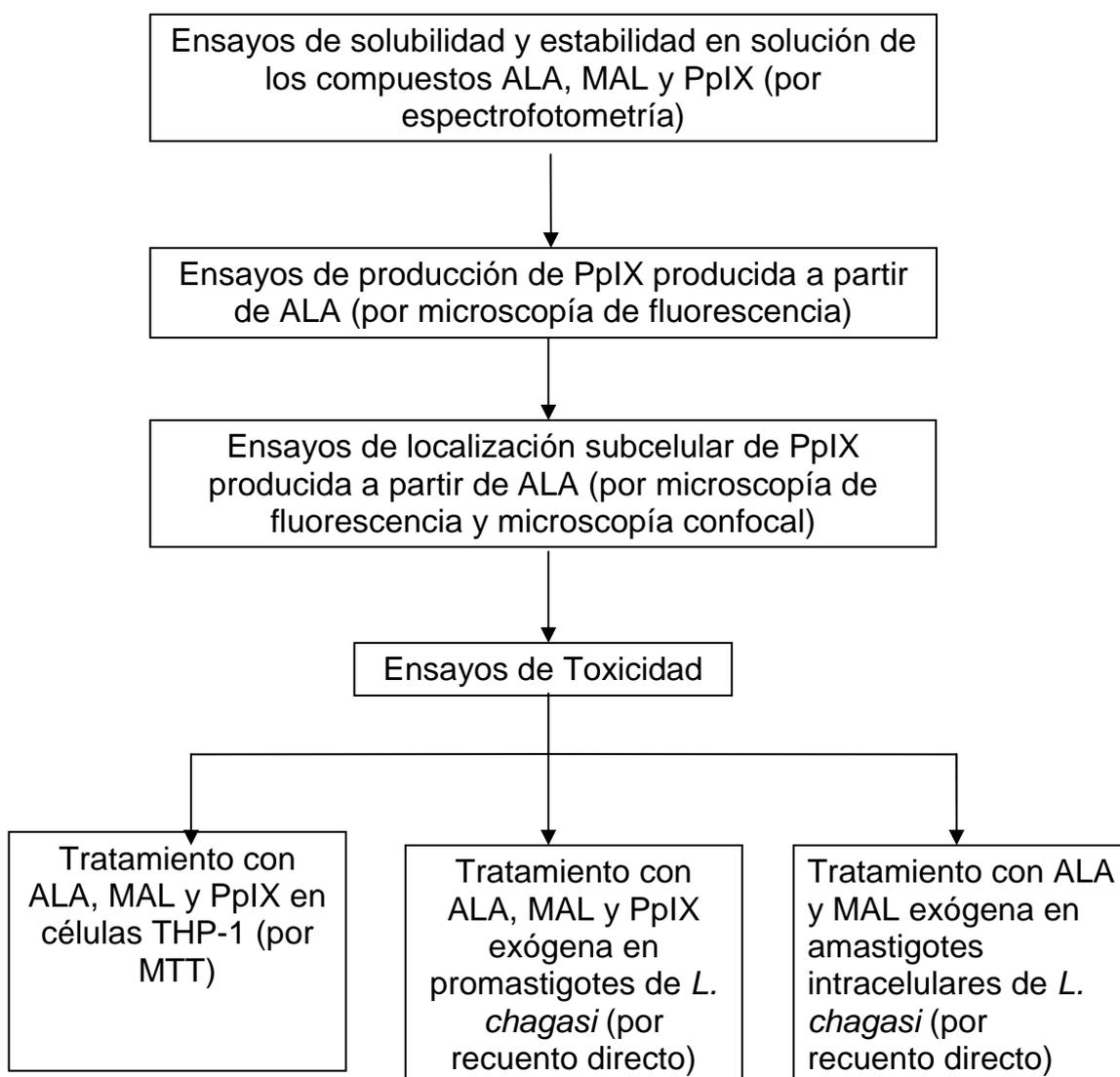
Enfermedad	Fotosensibilizador	Referencia
Tumores esofágicos	Photofrin	Dougherty <i>et al</i> , 1998, Huang, 2005
Cáncer de pulmón	Photofrin	Dougherty <i>et al</i> , 1998
Lesiones malignas y pre-malignas de piel	ALA	Huang, 2005
Acné vulgaris	ALA	Huang, 2005
Cáncer de vejiga	HpD	Triescheijn <i>et al</i> , 2006
Degeneración macular	Verteporfin	Huang, 2005
Keratosis actínica	ALA	Nayak, 2005, Quiang <i>et al</i> , 2006
Psoriasis	ALA	Nayak, 2005
Molusco contagioso	HpD	Nayak, 2005
Linfoma de células T cutáneo	ALA	Quiang <i>et al</i> , 2006
Hiperplasia de glándulas sebáceas	ALA	Quiang <i>et al</i> , 2006
<i>Staphylococcus aureus</i>	SnC6	Embleton <i>et al</i> , 2006
<i>Leishmania spp</i>	ALA, PcAl	Dutta <i>et al</i> , 2006, Escobar <i>et al</i> , 2006

ALA: Acido aminolevulínico. Photofrin: Polihematoporfirin eter/ester. HpD: Hematoporfirina derivativa. SnC6: tin(IV) clorin e6. PcAl: Ftalocianina de Aluminio.

2. MATERIALES Y METODOS

Para el desarrollo de esta investigación se siguió el orden establecido en la Figura 4. Inicialmente se estableció la capacidad de producir Protoporfirina IX (PpIX) por las células THP-1 y la localización subcelular después del tratamiento con ácido aminolevulínico (ALA). Posteriormente se realizaron los ensayos de toxicidad después de irradiación y en la oscuridad en células THP-1 no infectadas, promastigotes de *L. chagasi* y amastigotes intracelulares de *L. chagasi*.

Figura 4. Diagrama de flujo de las principales etapas llevadas a cabo en esta investigación



ALA: Acido aminolevulínico, MAL: acido aminolevulínico metil-ester PpIX: protoporfirina IX

2.1 Químicos y reactivos

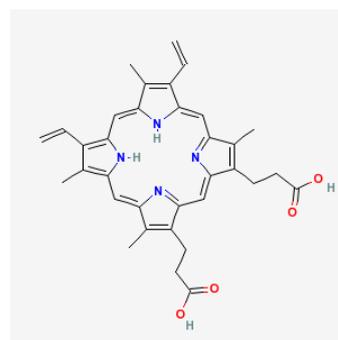
El ácido aminolevulínico hidrocloreto (ALA, $\text{C}_4\text{H}_7\text{NO}_4$, 167.6 g/mol), ácido aminolevulínico metil-éster (MAL, $\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$, 181.7 g/mol) Protoporfirina IX (PpIX), forbol 12-miristato 13-acetato (PMA), Hoechst 33342 (bis benzimida (29-[4-etoxifenil]-5-[4-metil-1-piperazinil]-2,5,9-bi-1H-benzimidazol) trihidrocloreto), Anfotericina B (AmB), MTT (3-(4, 5-dimetilthiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio bromuro) y hemina fueron adquiridos de Sigma- Aldrich (St Louis, USA). El dimetil sulfóxido fue obtenido de Carlo Erba Reagenti (Rodano, Italia). El medio de cultivo RPMI 1640 y el suero bovino fetal (SBF) fueron obtenidos de Gibco (Grand Island, NY, USA). La sonda mitocondrial MitoTracker y el Hoechst 33342 fueron obtenidos de Molecular probes (Eugene, USA). La sonda mitocondrial JC-1 (5,5', 6,6' -tetracloro- 1,1', 3,3' -tetraetil benzimidazolil- carbocianin yoduro) fue gentilmente donada por la Dra Susana Fiorentino del Grupo de Inmunobiología y Biología Celular, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Las soluciones stock de ALA y MAL fueron preparadas en medio RPMI 1640 sin SBF. La PpIX fue disuelta en DMSO antes de diluirla en RPMI 1640. La concentración de DMSO fue inferior al 2%. Las soluciones fueron preparadas inmediatamente antes de cada experimento.



Acido
aminolevulínico
(ALA)



Acido
aminolevulínico
metil-éster (MAL)



Protoporfirina
IX
(PpIX)

2.2 Células y parásitos

La línea celular de leucemia monocítica humana aguda, THP-1 (ATCC) fue mantenida en medio RPMI 1640 con 10% de SBF (v/v) a 37 °C con 5% CO₂. Las células fueron transformadas a su fenotipo adherente mediante el tratamiento con PMA 10% por 72 horas. Los promastigotes de *L. chagasi* (MHOM/BR/74/PP75) fueron gentilmente donados por el Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Medicas (CIDEIM) Cali, Colombia. Los parásitos fueron mantenidos en medio RPMI 1640 con 10% de SBF (v/v) y hemina (25 mg/L) a 28°C.

2.3 Fotorreactor biológico

Para los experimentos de fototoxicidad se utilizó un fotorreactor biológico diseñado como tesis de grado por la estudiante de química Rocio del Pilar Niño. Dicho fotorreactor biológico cuenta con cuatro lámparas (50W, 120V) y un filtro rojo (Edmund Industrial Optics) con un rango espectral de 597 a 752 nm. Además, está acoplado a un sistema de recirculación de agua refrigerada que permite que la temperatura se mantenga estable en 37°C en el compartimiento en donde se realiza la irradiación. Para esto se estandarizó que la temperatura del agua refrigerada circulante debía estar en 10°C para mantener una temperatura de 37°C por dos horas.

Figura 5. Fotorreactor biológico



Fotorreactor biológico

2.4 Estudios de solubilidad y estabilidad en solución de ALA y PpIX.

La solubilidad del ALA, MAL y PpIX fue evaluada disolviendo los compuestos en PBS pH 7,2, medio RPMI 1640 y DMSO. Las concentraciones utilizadas fueron de 5,0 mM para el ALA y el MAL y de 0,001 mM para la PpIX. La estabilidad de los compuestos en solución fue determinada espectrofotométricamente, realizando un barrido en el rango visible con las soluciones recién preparadas y a las 24 y 48 horas para el ALA y 10, 30 y 60 minutos para la PpIX. Las soluciones fueron mantenidas a 4°C y protegidas de la luz. La desaparición de las bandas características de los compuestos fue interpretada como degradación de los mismos en solución.

2.5 Producción de PpIX inducida por ALA por las células THP-1

Las células THP-1 transformadas (8×10^5 cel/ml) en láminas de fluorescencia

fueron incubadas con diluciones 1:3 de ALA y MAL (0,16-5,0 mM) a 37°C, 5% CO₂ por 24 horas. El medio fue retirado y se agregó Hoescht 33342 a una concentración de 0,07 µg/mL por 10 minutos. Células incubadas sin ALA ni Hoescht 33342 fueron utilizadas como control. Las láminas fueron lavadas con PBS y observadas en el microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E4000) (40x, filtro UV2A Ex=330-380nm, DM=400nm, BA=420nm). Las preparaciones fueron fotografiadas usando una cámara digital (CCD) Nikon Coolpix 5000. Células THP-1 incubadas sin ALA fueron utilizadas como control. La presencia de fluorescencia roja es interpretada como producción de PpIX. Además, se evaluó la internalización de PpIX exógena (0.0062 mM) por microscopía de fluorescencia.

2.6 Localización celular de la PpIX inducida por ALA en las células THP-1

La localización subcelular de la PpIX producida a partir de ALA fue evaluada teniendo en cuenta la fluorescencia del compuesto. Para esto, se utilizaron dos técnicas diferentes, microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal. Para los experimentos en el microscopio de epifluorescencia, las células fueron transformadas en láminas de fluorescencia, incubadas con (ALA 1,6 mM) por 5 horas, 37 °C, 5% CO₂, lavadas e incubadas con MitoTracker Green FM (200 nM) por 1 hora a 37°C, 5% CO₂. Las células fueron observadas en el microscopio de fluorescencia Nikon Eclipse E4000 (40x, filtros UV2A para la PpIX y B2A Ex=450-490, DM=500, BA=515 para Mitotracker). Se utilizó el software Adobe PhotoShop para procesar las imágenes. La aparición de un color amarillo-naranja es indicativo de que la PpIX producida a partir de ALA y las mitocondrias marcadas ocupan el mismo espacio en la célula. Para los experimentos en el microscopio confocal, las células fueron incubadas con ALA (1,6 mM) por 24 horas 37°C, 5% CO₂, lavadas e incubadas con la sonda mitocondrial JC-1 (10 µg/ ml) por 10 minutos. En ambos casos, células incubadas sin ALA fueron utilizadas como control. Las células fueron observadas en un microscopio confocal Olympus FV1000. Las muestras fueron excitadas con un láser de argón de 488 nm y la emisión fue separada utilizando un filtro dicróico de 580 nm. Las imágenes son mostradas con pseudocolor rojo para la PpIX y verde para el JC-1. Como antes, la presencia de un color amarillo-naranja es indicativo de que la PpIX producida a partir de ALA y las mitocondrias marcadas ocupan el mismo espacio en la célula.

2.7 Ensayos de fototoxicidad en células THP-1 diferenciadas

Las células THP-1 diferenciadas (8×10^5 cel/ml) fueron incubadas con diluciones 1:3 de ALA y MAL (0,16- 5,0 mM) y PpIX (0,001- 0,000001 mM) por 5 horas, 37°C, 5% CO₂. El medio de cultivo fue reemplazado por medio RPMI 1640 con 10% SBF fresco y las células fueron irradiadas a una fluencia de 2,5 J/cm² usando un fotorreactor biológico. Se mantuvieron controles en la oscuridad. La viabilidad celular fue evaluada mediante el ensayo de reducción del MTT de acuerdo al protocolo descrito por Mossman. Brevemente, una solución de MTT (10 ng/ml) fue

agregada a las células después de la irradiación y estas fueron incubadas a 37°C, 5%CO₂ por 4 horas. Los cristales de formazan formados fueron disueltos con DMSO y se midieron las densidades ópticas (DO) en un lector de microplacas (Sensident Scan Merck) a una longitud de onda de 580 nm. El porcentaje de toxicidad fue calculado según la siguiente fórmula: toxicidad (%) = 1 - (DO grupo tratado/ DO grupo control) x 100. La toxicidad en las células irradiadas se expresó como fototoxicidad, mientras que la toxicidad en las células mantenidas en la oscuridad se expresó como citotoxicidad. La actividad de los compuestos fue expresada como concentración letal CL₅₀ y CL₉₀, calculada por análisis de regresión lineal sigmoideo usando el software MSxfit™; ID Business Solutions, Guildford, UK. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de 4 realizados (n=3).

2.8 Ensayos de fototoxicidad en promastigotes

Promastigotes en fase exponencial tardía de crecimiento (2×10^6 parásitos/mL) fueron incubados con diluciones 1:3 de PpIX (0,0003-0.3 mM), ALA y MAL (0,16 -5,0 mM) y AmB (0,03 -1,0 μM) por triplicado para cada concentración por 24 hora a 28°C. Las células fueron irradiadas a una fluencia de 2,5 J/cm² usando el fotorreactor biológico. Una placa fue mantenida en la oscuridad como control. La inhibición en el crecimiento de los promastigotes fue evaluada por microscopía de luz, contando el número de promastigotes en un hemocitómetro de Neubauer 24 horas después de la irradiación. El porcentaje de inhibición del crecimiento fue calculado por comparación con los controles no tratados. La actividad de los compuestos fue expresada como concentración letal CL₅₀ y CL₉₀, calculadas por regresión lineal sigmoidea usando el software MSxfit™; ID Business Solutions, Guildford, UK. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de 3 realizados (n=3). En un experimento adicional, los parásitos fueron incubados con PpIX (0,001 mM) por 24 horas y se obtuvieron imágenes de epifluorescencia con la cámara (CCD) Nikon Coolpix 5000.

2.9 Ensayos de fototoxicidad en amastigotes intracelulares

Las células THP-1 diferenciadas en placas de cultivo Lab-tek™ de 16 pozos (Life Technologies, Paisley, UK), fueron infectadas con promastigotes de *L. chagasi* en fase estacionaria a una proporción parásito:célula de 10:1 por 24 horas a 37°C con 5% CO₂. El porcentaje de infección fue calculado en láminas fijadas con metanol y coloreadas con Giemsa, contando las células infectadas (con al menos un amastigote intracelular) en un total de trescientas células. Los cultivos infectados fueron incubados con ALA y MAL (0,05-5,0 mM) y AmB (0,03- 1,0 μM) por 5 horas a 37°C, 5% CO₂. Las placas fueron irradiadas en el fotorreactor a 2,5 J/cm². Se mantuvieron células en la oscuridad como control.

Se evaluó el efecto fototóxico del tratamiento con ALA y MAL sobre los amastigotes de *L. chagasi* en células THP-1, la actividad de la fototoxicidad del con ALA y MAL sobre las células THP-1 infectadas y no infectadas y las alteraciones morfológicas inducidas por la terapia fotodinámica con ALA o MAL sobre células y parásitos.

2.9.1 Fototoxicidad del ALA y MAL sobre los amastigotes de *L. chagasi* en células THP-1. La actividad de los compuestos fue determinada microscópicamente en láminas coloreadas con Giemsa. Los resultados fueron expresados como porcentaje de células infectadas tanto en los controles como en las células tratadas. Se calcularon concentraciones inhibitorias CI_{50} y CI_{90} usando el software MSx/fit™; ID Business Solutions, Guildford, UK. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo de 3 realizados (n=3).

2.9.2 Fototoxicidad del ALA y MAL sobre las células THP-1 infectadas y no infectadas. Se comparó la toxicidad de la TFD con ALA y MAL sobre células THP-1 infectadas con *L. chagasi* y células THP-1 no infectadas. Un grupo de células THP-1 diferenciadas en laminillas circulares fueron infectadas con promastigotes de *L. chagasi* y otro grupo de células se mantuvo sin infectar. Ambos grupos fueron incubados con ALA y MAL 0,5 y 1,6 mM por 24 horas e irradiados a 2,5 J/cm². La viabilidad celular fue evaluada mediante recuento directo con el colorante eosina amarilla, que permite diferenciar las células muertas de las vivas y expresada en términos de porcentaje de toxicidad, que fue calculado en trescientas células.

2.9.3 Alteraciones morfológicas inducidas por la terapia fotodinámica con ALA o MAL sobre células THP-1 infectadas y amastigotes intracelulares de *L. chagasi*. Se obtuvo un registro fotográfico de los cambios morfológicos en las células THP-1 infectadas con *L. chagasi* irradiadas coloreadas con Giemsa usando la cámara (CCD) Nikon Coolpix 5000. Los resultados son expresados como presencia o ausencia de alteraciones en el núcleo y citoplasma de las células y de los parásitos.

3. RESULTADOS

3.1 Solubilidad del ALA y PpIX y estabilidad en solución

El ALA fue soluble en las soluciones acuosas, como el tampón fosfato salino (PBS pH 7,2) y RPMI 1640. La protoporfirina IX (PpIX) fue insoluble en soluciones acuosas, pero presentó solubilidad en el solvente dimetilsulfóxido (DMSO). La inestabilidad del ALA en solución se evidenció por un experimento de espectrofotometría (espectro UV-Visible), en el que se evidenció la pérdida de los picos característicos de absorción después de 12 horas de la preparación de las soluciones (Figura 6).

La PpIX exógena también presentó inestabilidad en DMSO, comenzando a degradarse a los 10 minutos de preparada la solución. Debido a estos hallazgos, las soluciones de los compuestos debieron ser preparadas inmediatamente antes de cada experimento.

3.2 Producción de PpIX a partir de ALA por las células THP-1

Las células THP-1 diferenciadas produjeron PpIX a partir de ALA exógeno después de 5 horas de incubación a las concentraciones evaluadas. Se encontró una curva dosis respuesta sin incremento cualitativo en la fluorescencia a concentraciones mayores de 1,6 mM. No se observó fluorescencia en las células incubadas sin ALA o MAL. En la Figura 7 se observa la PpIX (roja) y los núcleos marcados con Hoescht 33342 (azules) bien delimitados. No se observa localización nuclear de la PpIX producida a partir de ALA.

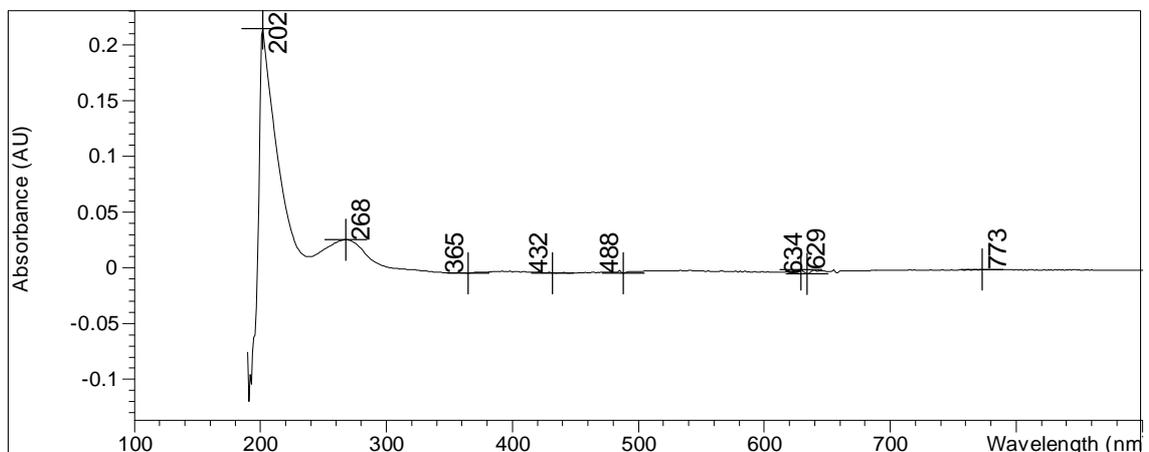
Además, en la Figura 8 se observa que las células THP-1 tratadas con PpIX exógena internalizaron la PpIX observándose la fluorescencia roja característica del compuesto.

3.3 Localización subcelular de la PpIX producida a partir de ALA en células THP-1

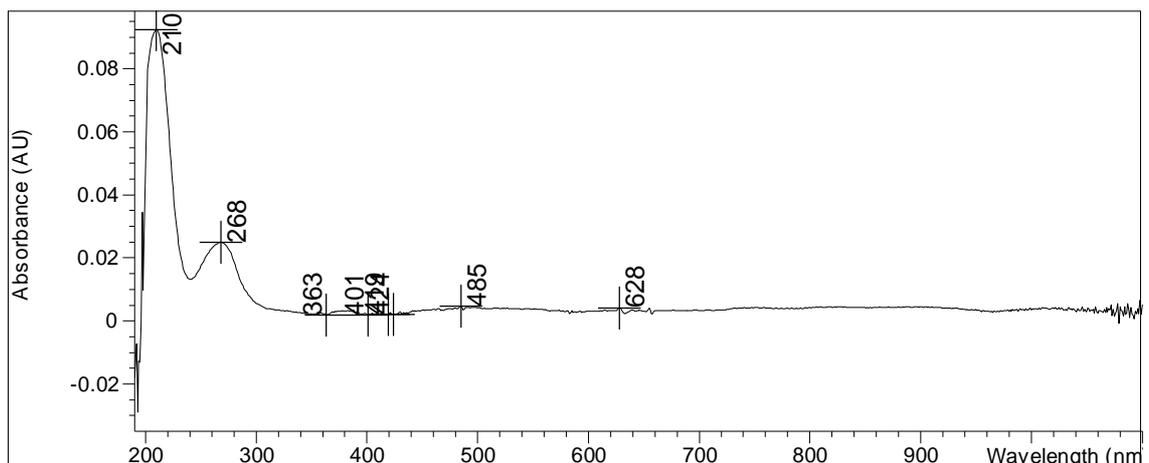
La PpIX producida a partir de ALA tiene una localización mitocondrial, según lo mostrado en la Figura 9. Esta localización mitocondrial fue demostrada mediante microscopía de fluorescencia y confirmada por microscopía confocal.

En la Figura 9a se observan imágenes de epifluorescencia de las células THP-1 produciendo PpIX a partir de ALA exógeno. Esta PpIX producida a partir de ALA muestra un patrón citoplasmático difuso, que se superpone con el mostrado por las mitocondrias marcadas con MitoTracker Green mostrado en la Figura 9b. Esto se pone en evidencia al superponer las imágenes en la Figura 9c. El color naranja resultante es indicativo de localización mitocondrial.

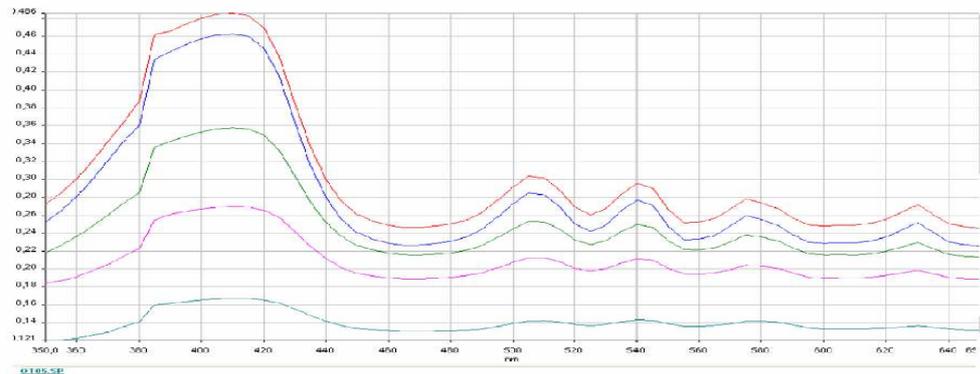
Figura 6. Espectro de absorción en el rango UV-Visible del ácido aminolevulínico disuelto en PBS (pH 7,2).



a. Solución de ALA recién preparada. Espectro UV-Visible de la solución de ALA 5 mM disuelto en PBS pH 7,2. Obsérvense los picos de absorción característicos del compuesto a 202 y 268 nm.

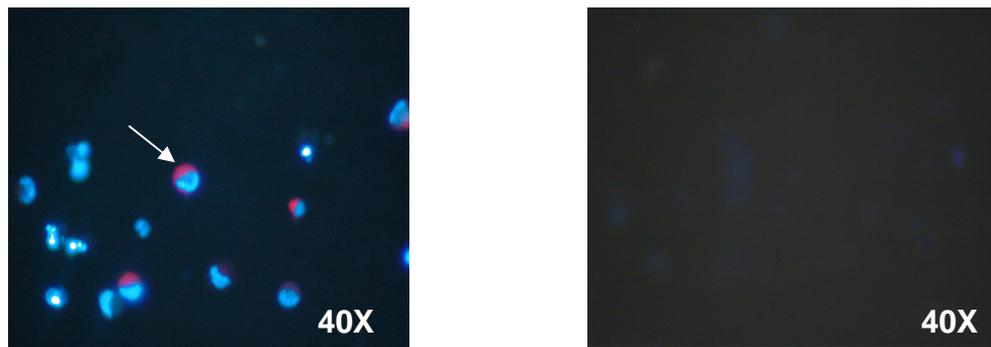


b. Solución de ALA después de 12 horas de preparada. Espectro UV-Visible de la solución de ALA 5,0 mM disuelto en PBS pH 7,2 a las 12 horas de preparada la solución. Obsérvense la disminución en los picos de absorción, así como el desplazamiento del pico de 202 a 210 nm a las 12 horas de preparadas las soluciones.



c.. Espectro de absorción UV-Visible de una solución de PpIX 0,001 mM disuelta en DMSO. El espectro rojo corresponde a la solución recién preparada, el azul a la solución a los 10 minutos, el espectro verde a la solución a los 30 minutos, el espectro rosado a la solución a los 60 minutos y el espectro aguamarina a la solución a los 90 minutos. Obsérvese que la PpIX se empieza a degradar en solución desde los 10 minutos.

Figura 7. Células THP-1 no infectadas produciendo PpIX a partir de ALA exógeno



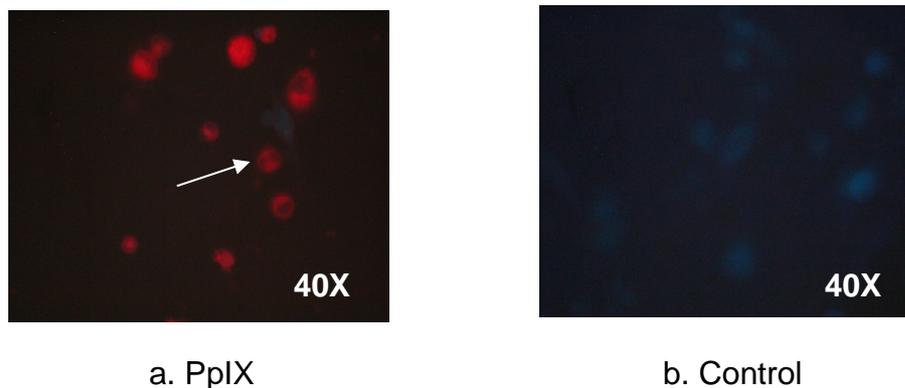
a. PpIX

b. Control

En la Figura 7a se observa la fluorescencia roja característica de la PpIX producida a partir de ALA exógeno (flecha blanca) y los núcleos azules marcados con Hoescht 33342. No se observa fluorescencia en los controles (Figura 7b). (aumento 40x)

Estos hallazgos fueron comprobados mediante microscopía confocal. Utilizando esta técnica, se evaluó la localización subcelular de la PpIX producida a partir de ALA en células THP-1 no infectadas y adicionalmente se evaluó la localización en células THP-1 infectadas con *L. chagasi* (El porcentaje de infección fue del 50%).

Figura 8. Células THP-1 con PpIX exógena internalizada



En la Figura 8a se observan las células THP-1 no infectadas mostrando la fluorescencia roja típica de la PpIX, poniendo en evidencia la internalización del compuesto. No se observa fluorescencia en los controles (Figura 8b) (aumento 40x)

En la Figura 10a se observan las imágenes de microscopía confocal de la distribución de la PpIX producida a partir de ALA; en la Figura 10b las mitocondrias marcadas con JC-1 en células THP-1 no infectadas (panel superior) e infectadas (panel inferior). Una vez más, al superponer las imágenes de la PpIX y de las mitocondrias en la Figura 10c, se obtiene un color naranja indicativo de localización mitocondrial de la PpIX. No se observan diferencias aparentes en los patrones de distribución de la PpIX producida a partir de ALA de las células no infectadas respecto a las células infectadas

3.4 Toxicidad de ALA, MAL y PpIX exógena en células THP-1.

El ácido aminolevulínico (ALA) y el ácido aminolevulínico metil-éster (MAL) presentaron actividad sobre las células THP-1 no infectadas después de la irradiación a 2,5 J/cm². La actividad fue de CL₅₀= 0,19 mM (IC: 0,14-0,23 mM) para el ALA y CL₅₀= 0,27 mM (IC: 0,21-0,32 mM) para el MAL (Tabla 5). No se observó toxicidad de los compuestos en células THP-1 no irradiadas. Se presentó un efecto de dosis respuesta a concentraciones de ALA y MAL entre 0,16 y 1,6 mM, sin aumento en la actividad a concentraciones mayores (Figura 11).

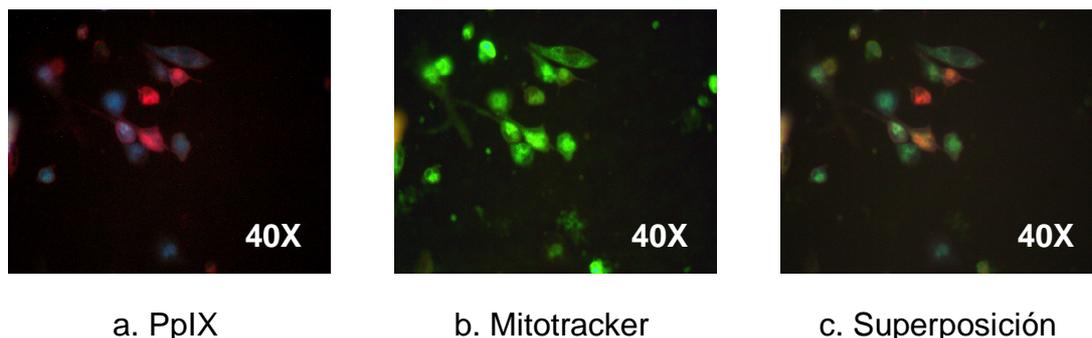
Concentraciones de ALA y MAL mayores de 15 mM fueron tóxicas para las células THP-1 no infectadas en la oscuridad.

Al comparar la fototoxicidad del tratamiento con ALA con la fototoxicidad del tratamiento con MAL sobre las células THP-1 no infectadas e irradiadas, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas (*t* de student *p* > 0,05).

No se observó toxicidad de la PpIX exógena sobre las células THP-1 no infectadas

irradiadas o no irradiadas a las concentraciones evaluadas ($CL_{50} > 0,001$ mM). A concentraciones superiores a 0,001 mM se observó interferencia de la PpIX con la técnica del MTT debido al color marrón oscuro de la PpIX, por lo que no se pudieron evaluar concentraciones superiores del compuesto.

Figura 9. Localización subcelular de la PpIX producida a partir de ALA en células THP-1 no infectadas observada por epifluorescencia.



La PpIX producida a partir de ALA exógeno (Figura 9a) y las mitocondrias marcadas con MitoTracker (Figura 9b) se superponen al unir las imágenes (Figura 9c), dando como resultado la aparición de un color naranja, indicativo de que la PpIX producida a partir de ALA se encuentra en las mitocondrias. (aumento 40x)

3.5 Toxicidad de ALA y PpIX exógena en promastigotes de *L. chagasi*

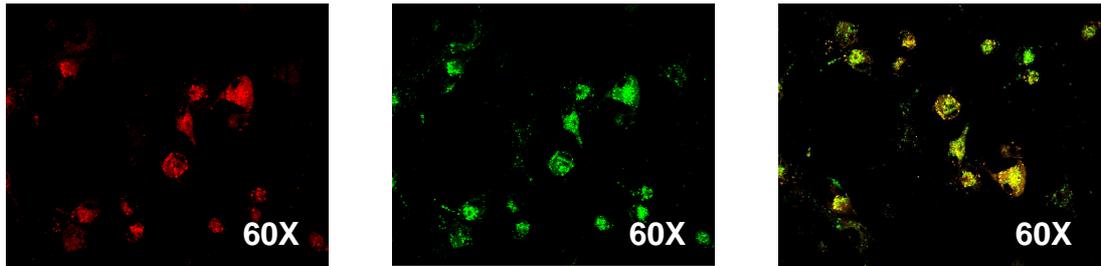
El tratamiento con ALA no tuvo efecto fototóxico contra los promastigotes de *L. chagasi* ($CL_{50} > 5$ mM) a las concentraciones evaluadas.

La incubación de los promastigotes de *L. chagasi* con PpIX exógena y su posterior irradiación fue fototóxica para el parásito, con $CL_{50} = 3,7 \times 10^{-3}$ (IC no determinados) y $CL_{90} = 5,0 \mu\text{M}$. Se observó un efecto de dosis respuesta para la PpIX exógena a las concentraciones evaluadas (Figura 13).

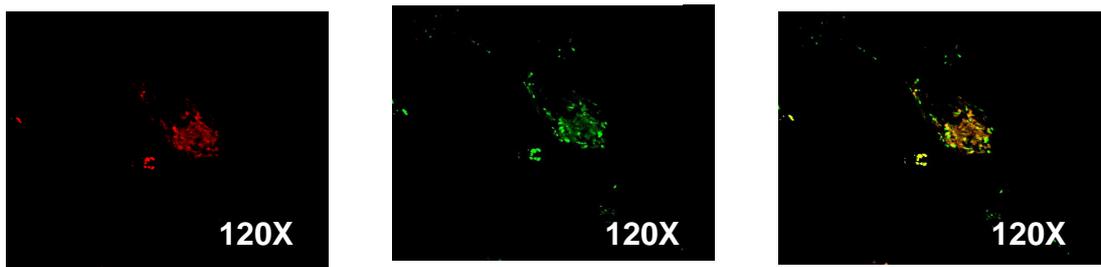
Los promastigotes de *L. chagasi* fueron sensibles a la AmB, que presentando una actividad de $CL_{50} = 4,0 \times 10^{-5}$ mM (IC $3,4 \times 10^{-5}$ - $5,7 \times 10^{-5}$ mM). No se observó fototoxicidad del compuesto.

Figura 10. Localización sub-celular de la PpIX producida a partir de ALA en células THP-1, observada por microscopía confocal

Células THP-1 no infectadas



Células THP-1 infectadas con *L. chagasi*



a.. PpIX

b. JC-1

c. Superposición

La PpIX producida a partir de ALA (Figura 10a) y las mitocondrias marcadas con JC-1 (Figura 10b) tienen la misma localización celular, lo que se pone en evidencia al unir las imágenes, por la aparición de un color amarillo (Figura 10 c) tanto en células no infectadas como en células infectadas.

Tabla 5. Actividad de ALA, MAL, PpIX y AmB en células THP-1, promastigotes y amastigotes intracelulares de *L. chagasi*.

	J/cm ²	CL ₅₀ (mM) (LC)			
		ALA	MAL	PpIX	AmB
Células THP-1 (no infectadas)	0	>5,0	>5,0	>0,001	N.D
	2,5	0,19 (0,14-0,23)	0,27 (0,21-0,32)	>0,001	N.D
Promastigotes (formas libres)	0	>5,0	>5,0	>0,3	4,0 x 10 ⁻⁵ (3,4 x 10 ⁻⁵ -5,7 x 10 ⁻⁵)
	2,5	>5,0	>5,0	3,7 x 10 ⁻³	6,0 x 10 ⁻⁵ (2,0 x 10 ⁻⁵ -2,3 x 10 ⁻⁵)
Amastigotes Intracelulares (infectando células THP-1)	0	>5,0	>5,0	N.D	3,4 x 10 ⁻⁴ (3,3 x 10 ⁻⁴ -3,7 x 10 ⁻⁴)
	2,5	>5,0	>5,0	N.D	N.D

Valores de CL₅₀ en mM con límites de confianza P₉₅ (LC). Intensidad de la luz expresada en J/cm². Los resultados mostrados en la Tabla 5 corresponden a 1 experimento representativo de 3 realizados para cada compuesto. (n=3). N.D: No determinada. ALA: ácido aminolevulínico, MAL: ácido aminolevulínico metilester, AmB: anfotericina B.

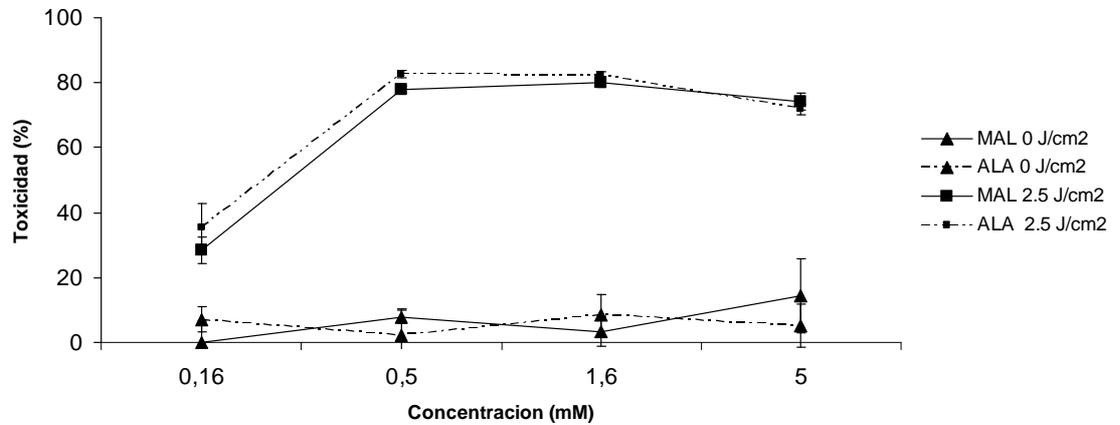
3.6 Ensayos en amastigotes intracelulares de *L. chagasi* en células THP-1

La incubación de las células THP-1 infectadas con *L. chagasi* con ALA o MAL y su posterior irradiación a 2,5 J/cm² no tuvo efecto fototóxico sobre los amastigotes intracelulares de *L. chagasi*. Sin embargo se observaron eventos interesantes, relacionados con el efecto de la irradiación sobre las células THP-1 infectadas y no infectadas y las alteraciones morfológicas inducidas por la irradiación sobre las células infectadas.

3.6.1 Toxicidad de ALA y MAL en amastigotes intracelulares de *L. chagasi*.

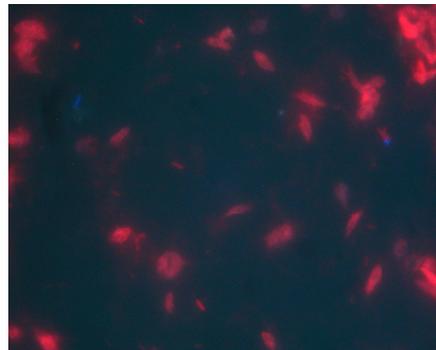
No se observó actividad anti-*Leishmania* del ALA o MAL sobre los amastigotes intracelulares de *L. chagasi* después de 24 horas de tratamiento e irradiación a 2,5 J/cm². Tampoco se encontró un efecto anti-*Leishmania* en las células infectadas tratadas y no irradiadas (Tabla 5). Los porcentajes de infección en los pozos tratados con ALA o MAL e irradiados respecto de aquellos tratados pero no irradiados fueron similares. Ambos compuestos presentaron CI > 5 mM

Figura 11. Toxicidad de ALA y MAL en células THP-1.



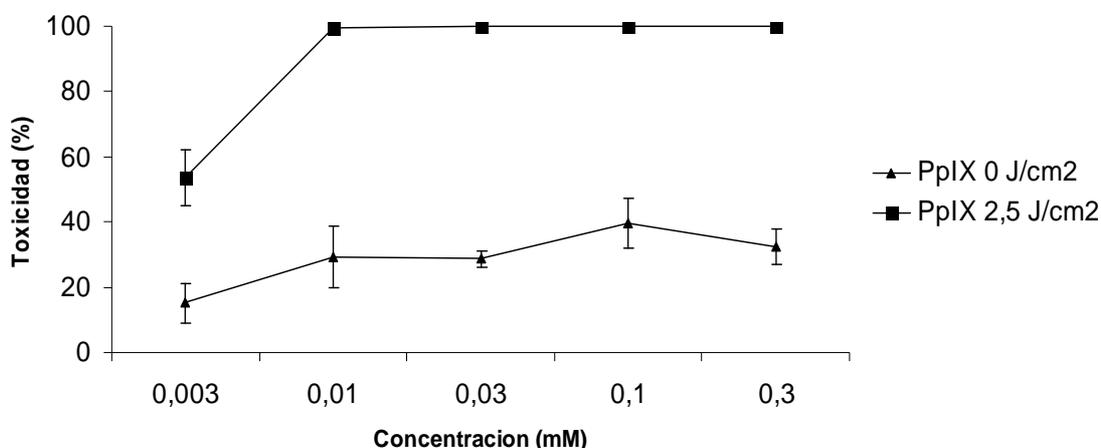
Las células THP-1 fueron tratadas con ácido aminolevulínico (ALA) y ácido aminolevulínico metil-éster (MAL) según lo descrito en Materiales y Métodos. La Figura muestra la toxicidad sobre células THP-1 no infectadas en la oscuridad ($\blacktriangle 0 \text{ J/cm}^2$) y después de irradiadas ($\blacksquare 2,5 \text{ J/cm}^2$). Los datos corresponden a 1 experimento representativo de 4 realizados ($n=3$).

Figura 12. Internalización de PpIX exógena por promastigotes de *L. chagasi*



La internalización de PpIX fue evaluada mediante la técnica de microscopía de epifluorescencia, como se describió en materiales y métodos. Los promastigotes de *L. chagasi* fueron incubados con PpIX 0,001 mM por 24 horas. La fluorescencia roja corresponde a la PpIX internalizada. (aumento 40x)

Figura 13. Toxicidad de PpIX exógena en promastigotes de *L. chagasi*



Promastigotes de *L. chagasi* fueron tratados con PpIX exógena e irradiados (■) o no irradiados (▲) y el porcentaje de citotoxicidad fue calculado por recuento directo en hemocitometro según se describió en Materiales y Métodos. Los datos corresponden a un experimento representativo de tres realizados (n=3). Se observa toxicidad de la PpIX sobre las formas libres de *L. chagasi* irradiadas. La toxicidad del compuesto en la oscuridad (0 J/cm²) fué inferior al 40%.

3.6.2 Disminución de la celularidad en los pozos tratados con ALA o MAL e irradiados. Se encontró una disminución en el número de células en los pozos tratados con ALA o MAL e irradiados respecto a los que fueron tratados con ALA o MAL pero no irradiados (datos no mostrados). Esto hace pensar que dicha disminución esta directamente relacionada con la irradiación de las células tratadas con ALA o MAL. Dicho efecto se presentó a concentraciones de ALA de 0,05 y 5,0 mM a las 24 horas de incubación en varios experimentos realizados, por lo que se descartan inconvenientes técnicos relacionados con desprendimiento de las células por los lavados.

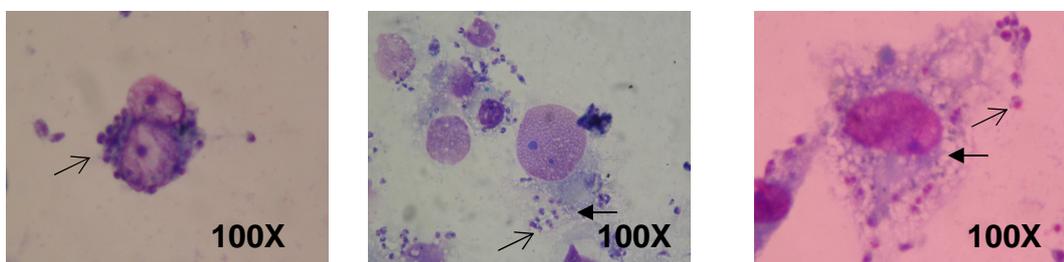
3.6.3 Aumento en los porcentajes de infección en las células THP-1 infectadas, tratadas con ALA o MAL e irradiadas. En tres experimentos realizados se observó un aumento del porcentaje de infección en las células tratadas con ALA o MAL e irradiadas de entre el 12 y el 20% respecto a las células THP-1 infectadas no irradiadas. Este fenómeno se observó a concentraciones de ALA entre 0,05 y 5,0 mM.

3.6.4 Toxicidad de ALA y MAL después de la irradiación sobre las células THP-1 infectadas con *L. chagasi* y no infectadas. Los experimentos de toxicidad en células THP-1 infectadas y no infectadas tratadas con ALA o MAL mostraron que las células THP-1 no infectadas fueron más sensibles a la irradiación que las infectadas.

Se encontró que las células THP-1 no infectadas tratadas con ALA o MAL fueron un 20% más sensibles a la irradiación que las células THP-1 infectadas tratadas con ALA o MAL. Esta diferencia en la toxicidad se observó en las dos concentraciones examinadas (0,5 y 1,6 mM).

3.6.5 Alteraciones morfológicas presentadas por las células THP-1 tratadas con ALA o MAL e irradiadas. Se observaron algunos cambios morfológicos en las células THP-1 infectadas, tratadas con ALA o MAL después de irradiación.

Figura 14. Alteraciones morfológicas presentadas por las células THP-1 infectadas después del tratamiento fotodinámico



a. Control

b. ALA 0,5 mM

c. ALA 5,0 mM

Las células THP-1 fueron infectadas con promastigotes de *L. chagasi*, incubadas con ALA y MAL e irradiadas según se describió en Materiales y Métodos. La Figura 11a muestra una célula THP-1 infectada incubada sin ALA, no irradiada (0 J/cm^2). La figura 11b muestra una célula infectada, incubada con ALA 0,5 mM e irradiada ($2,5 \text{ J/cm}^2$). La Figura 11c muestra una célula THP-1 infectada incubada con ALA 5 mM e irradiada ($2,5 \text{ J/cm}^2$). Las flechas sólidas muestran las vesículas citoplasmáticas mientras que las flechas de líneas muestran los amastigotes intracelulares. Obsérvese la aparición de vesículas en las células THP-1 infectadas e irradiadas, las cuales se hacen más notorias en las células incubadas a mayor concentración de ALA (5 mM). También se observan cambios nucleares relacionados con condensación de cromatina. No se observan cambios morfológicos en los amastigotes intracelulares.

Estos cambios consistieron en la aparición de numerosas vesículas en el citoplasma, acompañados de la presencia de espacios vacíos en el núcleo, lo que puede ser indicativo de condensación de la cromatina. Las células tratadas después de irradiación lucen mas grandes y en algunos casos con pérdida de la continuidad del citoplasma. Estos cambios no fueron observados en las células THP-1 infectadas que no fueron tratadas con ALA o MAL ni irradiadas (Figura 14).

Estos cambios morfológicos no fueron observados en los amastigotes intracelulares de *L. chagasi* sometidos a las mismas condiciones.

4. DISCUSIÓN

La terapia fotodinámica (TFD) es una opción terapéutica que ha sido aprobada para una variedad de enfermedades (Huang, 2005). En este estudio se evaluó la eficacia de la terapia fotodinámica utilizando el ácido aminolevulínico (ALA) exógenamente como precursor del fotosensibilizador producido endogenamente, la protoporfirina IX (PpIX), para eliminar amastigotes intracelulares de *L. chagasi* como un modelo *in vitro* que permitiera soportar los promisorios hallazgos de los experimentos *in vivo*. Estos hallazgos incluyen desde la reducción del número de parásitos aislados de las lesiones en modelos murinos (Kosaka *et al*, 2007) hasta la desaparición de lesiones cutáneas en humanos (Gardlo, *et al*, 2003).

La TFD utilizando ALA o ácido aminolevulínico metil-éster (MAL) no presentó un efecto fototóxico sobre los amastigotes intracelulares de *L. chagasi* en células THP-1, pese a que las células produjeron PpIX a partir de estos compuestos y a que esta PpIX utilizada de manera exógena fue fototóxica para las formas libres del parásito (promastigotes).

Las células THP-1 no infectadas e infectadas con *L. chagasi* produjeron PpIX de manera endógena a partir de tratamiento con ALA y MAL. Esta producción fue dependiente de la dosis de los compuestos utilizados a concentraciones entre 0,16 y 1,6 mM. La producción de PpIX a partir de ALA también ha sido observado en otras líneas celulares. Ren *et al* describieron la producción de PpIX por parte de células de hepatocarcinoma humano QGY a partir de 2 mM de ALA y 0,2 mM de ALA hexil-éster (Ren *et al*, 2002). Por otra parte, Wu *et al* evaluó la producción de PpIX a partir de ALA y ALA hexil-éster en células de neuroblastoma SK-N-SH, células de hepatocarcinoma humano QGY, y fibroblastos A9 encontrando que todas las líneas celulares produjeron PpIX. Sin embargo, se observaron diferencias en la concentración de PpIX producida de acuerdo con la línea celular, hecho al parecer relacionado con la actividad de la enzima ferroquelatasa. De esta manera, las células SK-N-SH produjeron la mayor cantidad de PpIX seguidas de las células QGY y por último las células A9. Este estudio también sugiere que la localización de la PpIX producida a partir de ALA debe ser mitocondrial por ser en esta organela en donde se encuentran las enzimas necesarias para la síntesis de la PpIX (Wu *et al*, 2003).

La localización subcelular de la PpIX ha sido evaluada en varias líneas celulares. Chen *et al* evaluó la localización de PpIX producida a partir de ALA (1 mmol/L) en células de leucemia mieloide murina WEHI-3B, valiéndose del uso de la sonda mitocondrial MitoTracker Green encontrando que la PpIX producida a partir de ALA presentaba una localización mitocondrial (Chen *et al*, 2001). Datos similares fueron obtenidos por Ji *et al*, al evaluar la localización subcelular de la PpIX producida a partir de ALA (1,5 mM) en las líneas celulares esofágicas KYSE-450, KYSE-70 y Het 1A. En este caso también se

utilizó la sonda mitocondrial MitoTracker Green y se llegó a la conclusión de que la PpIX producida a partir de ALA está confinada a la mitocondria (Ji *et al*, 2006). Esta localización mitocondrial es importante si se tiene en cuenta que los fotosensibilizadores que se localizan en la mitocondria están asociados principalmente con muerte celular por apoptosis, que al parecer no genera una respuesta inflamatoria en el tejido circundante

El estudio de la localización subcelular de la PpIX producida a partir de ALA exógeno en células THP-1 en este trabajo se realizó inicialmente por microscopía de epifluorescencia utilizando la sonda MitoTracker Green. Las imágenes obtenidas mostraron una localización mitocondrial de la PpIX producida a partir de ALA. Sin embargo, esta técnica tiene el inconveniente de permitir el paso de luz de planos celulares diferentes al enfocado. Si se toma en cuenta el espacio tridimensional de la célula, es posible que dos puntos aparezcan como colocalizados cuando en realidad se encuentran uno debajo del otro. Por esto, se utilizó paralelamente la técnica de microscopía confocal, la cual permite la observación de un solo plano celular, eliminando la posibilidad de que la fluorescencia residual de planos focales diferentes al enfocado induzcan a resultados falsos. Mediante este método se evaluó la localización de la PpIX producida a partir de ALA en células THP-1 no infectadas e infectadas con *L. chagasi* y se amplió el tiempo de incubación a 24 horas para determinar si existían cambios respecto a lo observado por microscopía de epifluorescencia.

En el caso de microscopía confocal se utilizó la sonda fluorescente JC-1, con idénticos resultados a los observados por la sonda MitoTracker Green en epifluorescencia. La PpIX producida a partir de ALA muestra un patrón de distribución citoplasmático que se superpone con el presentado por las mitocondrias, tanto en células no infectadas como en células infectadas con *L. chagasi*, lo que permite confirmar la localización mitocondrial de la PpIX producida a partir de ALA.

Al comparar el patrón de distribución de la PpIX producida a partir de ALA de las células THP-1 no infectadas con el de las células THP-1 infectadas con *L. chagasi* se observó un patrón menos difuso en las células infectadas. Este fenómeno fue descrito también por Akilov *et al*, quien además realizó marcaje de los amastigotes intracelulares de *L. major* en células J774 con anticuerpos anti-gp63 marcados con isotiocianato de fluoresceína. Cuando comparó los patrones de distribución de los amastigotes marcados con el de la PpIX producida a partir de ALA por las células J774 infectadas encontró que estos se superponían, confirmando así que los amastigotes intracelulares de *L. chagasi* internalizaron la PpIX y por esto el patrón de distribución de la PpIX en células infectadas es menos difuso que el de las células no infectadas (Akilov *et al*, 2007). En los experimentos realizados en este trabajo desafortunadamente no se contó con un anticuerpo anti-*Leishmania* marcado por eso no se puede comprobar lo anterior ni la internalización de la PpIX por parte de los amastigotes intracelulares de *L. chagasi*.

La producción de PpIX a partir de ALA o MAL por parte de las células THP-1 no infectadas llevó a un efecto fototóxico cuando estas fueron irradiadas a 2,5 J/cm². Dicho efecto fototóxico tuvo una relación de dosis respuesta a concentraciones entre 0,16 y 1,6 mM, sin incrementos en la toxicidad a concentraciones superiores a 1,6 mM, lo que se correlaciona con los experimentos de producción de PpIX a partir de ALA. Cuando se evaluaron concentraciones de ALA o MAL mayores de 15 mM se encontró toxicidad de los compuestos en la oscuridad, por lo que se eliminaron estas concentraciones de los ensayos. Se ha encontrado que el ALA puede causar daños oxidativos a las células directamente debido a su capacidad de producir reacciones de oxidación directamente con las estructuras celulares (Penalti *et al*, 1996, Ryter y Tyrell, 2000, De Siervi *et al*, 2002)

No se encontraron diferencias significativas entre el efecto fototóxico del ALA y el MAL en las células THP-1 no infectadas. Se ha encontrado que las formas esterificadas del ALA son internalizadas de manera más efectiva que el ALA en sí (Triesscheijn *et al*, 2006), pero en el caso del MAL, la cadena de ester es muy corta como para favorecer de manera notoria la internalización respecto al ALA, por lo que inducen la producción de cantidades muy similares de PpIX (Xiang *et al*, 2001).

El tratamiento de células THP-1 con PpIX exógena y su posterior irradiación con 2,5 J/cm² no tuvo efecto fototóxico sobre las células a las concentraciones utilizadas en el estudio. Ji *et al* describe que a diferencia de la PpIX producida endogenamente a partir de ALA, que tiene una localización mitocondrial, la PpIX exógena es internalizada por la célula y se mantiene en el citoplasma. Esto podría explicar la ausencia de toxicidad de la PpIX exógena, dado que las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidas ante la irradiación tienen una corta vida media y al estar en el citoplasma, no afectarían ninguna organela vital para la célula (Ji *et al*, 2006).

El tratamiento con ALA exógeno no mostró actividad sobre los promastigotes de *L. chagasi* ni irradiados ni en la oscuridad. Se ha encontrado que los parásitos del género *Leishmania* carecen de enzimas de la vía de síntesis del grupo HEME, como la ALA sintetasa, ALA deshidratasa y porfobilinogeno deaminasa, por lo que deben adquirir los anillos de porfirinas de su hospedero. Estudios realizados en *L. amazonensis* demostraron que transfectando al parásito con los genes que codifican para la síntesis de ALA deshidratasa y porfobilinogeno deaminasa estos adquirirían la capacidad de acumular uroporfirina I (Sah, 2002). De esta manera, aún cuando la deficiencia de ALA sintetasa se supera cuando se incuban los promastigotes con ALA, la deficiencia en las otras enzimas hace que los parásitos no se sensibilicen al no producir porfirinas.

Al tratar los promastigotes de *L. chagasi* con PpIX exógena, estos la internalizaron, lo que se hizo evidente en las imágenes con microscopía de epifluorescencia de los experimentos de internalización. A diferencia de lo

encontrado en el tratamiento con PpIX exógena en las células THP-1, la PpIX exógena fue fototóxica para los promastigotes de *L. chagasi* irradiados, sin observarse toxicidad para los promastigotes en la oscuridad a las concentraciones evaluadas. Estudios recientes han reportado que otros fotosensibilizadores también son activos contra formas libres de *Leishmania*. Escobar *et al* encontró actividad de la ftalocianina de Aluminio (PcAL) y la ftalocianina de Zinc (PcZn) sobre promastigotes de *L. panamensis* y *L. chagasi*. Se encontró que la PcAl es mas activa que la PcZn y que los promastigotes de *L. panamensis* son mas sensibles al tratamiento fotodinámico que los promastigotes de *L. chagasi*. Los compuestos no mostraron actividad en la oscuridad (Escobar *et al*, 2006). De la misma manera, Dutta *et al*, reportó en el 2006 actividad de la PcAl sobre formas libres e intracelulares de *L. amazonensis*. La PcAl fue activa sobre promastigotes y amastigotes axénicos (extracelulares) de *L. amazonensis* después de irradiados sin actividad en la oscuridad. Además, al infectar células J774 con los amastigotes axénicos incubados con PcAl e irradiar las células se observó efecto fototóxico sobre los amastigotes y sobre las células. Cuando se trataron células J774 infectadas con amastigotes incubados sin PcAl no se obtuvo un efecto fototóxico (Dutta *et al*, 2006). Estos experimentos sugieren que la PcAl internalizada por las células J774 no tuvo efecto fototóxico sobre los amastigotes intracelulares.

En este trabajo no se encontró fotoactividad del tratamiento con ALA o MAL sobre los amastigotes intracelulares de *L. chagasi* infectando células THP-1. Pese a que las células THP-1 produjeron PpIX a partir de ALA y que la PpIX mostró un efecto fototóxico sobre los promastigotes de *L. chagasi*, no se obtuvo un efecto fototóxico de la TFD con ALA o MAL sobre los amastigotes intracelulares de *L. chagasi* en células THP-1. El tratamiento de las células THP-1 infectadas con ALA o MAL y su posterior irradiación a 2,5 J/cm² no ocasionó una reducción en el porcentaje de infección con el parásito respecto a las células THP-1 incubadas con ALA o MAL no irradiadas. Akilov *et al* reportó en el 2007 resultados similares en *L. major* infectando células J774. Se encontró que la terapia fotodinámica utilizando 1 mM de ALA e irradiando a diferentes intensidades de luz no provocaba una disminución en el número de amastigotes intracelulares respecto a los controles. Sin embargo, se observó una disminución en el número de células J774 dependiente de la intensidad de luz aplicada en la irradiación. En el estudio de Akilov *et al* se evaluó la concentración de PpIX producida a partir de ALA internalizada por los amastigotes intracelulares, encontrándose que la concentración de PpIX en los amastigotes no fue lo suficientemente alta como para inducir daño oxidativo en el parásito. Las células J774 infectadas también presentaron alteraciones morfológicas en el citoplasma y el núcleo. En experimentos in vivo encontraron que el tratamiento fotodinámico de lesiones de leishmaniasis cutánea en las orejas de ratones BALB/c generó una reducción en el número de amastigotes aislados de las lesiones respecto a los ratones no tratados. Se observó también una reducción en el número de macrófagos tisulares en los tejidos tratados respecto a los tejidos que no lo fueron (Akilov *et al*, 2007).

En este trabajo se encontró una disminución en el número de células en los pozos incubados con ALA o MAL e irradiados respecto a aquellos no irradiados. Esta baja celularidad se atribuyó en un principio a problemas técnicos relacionados con desprendimiento de las células en los lavados, pero la disminución en el número de células se hizo presente en todos los pozos y en varios experimentos, por lo que se relacionó con el efecto fototóxico de la irradiación sobre las células incubadas con ALA o MAL.

Además, se observó un aumento del porcentaje de infección en las células incubadas con ALA o MAL e irradiadas de entre el 12 y el 20% cuando se comparó con el porcentaje de infección de las células incubadas con ALA o MAL no irradiadas. Esto se repitió en los dos experimentos realizados (n=2). Esto podría significar que la TFD con ALA favorezca la infección por *L. chagasi* o que se hubiera dado una reducción en el número de células no infectadas que hubiese alterado el porcentaje de infección. Tomando en cuenta la escasa probabilidad de que la irradiación de las células THP-1 infectadas e incubadas con ALA o MAL favoreciera la infección de los macrófagos por *L. chagasi*, se procedió a comparar la toxicidad de la incubación con ALA o MAL e irradiación sobre células THP-1 no infectadas e infectadas con *L. chagasi*. Se encontró que las células THP-1 no infectadas son más sensibles a la irradiación, con porcentajes de toxicidad hasta un 20% mayores a los de las células infectadas. De esta manera, el aumento en los porcentajes de infección en las células infectadas incubadas con ALA o MAL e irradiadas se debe a una disminución en el número de células no infectadas.

Tratando de explicar la baja sensibilidad de las células THP-1 infectadas a la TFD con ALA, es posible que factores intrínsecos del parásito estén involucrados. Se ha encontrado que *Leishmania* puede inhibir la muerte celular por apoptosis en los macrófagos infectados por diferentes vías. Una de ellas es la inhibición de moléculas pro-apoptóticas como la proteína cinasa C y la inducción de moléculas anti-apoptóticas como la HSP65 y la PI3k/Akt (Heussler, 2001, Ruhland, Leal y Kima, 2006). Sin embargo, el mecanismo más interesante en el caso de la TFD con ALA podría ser el descrito por Akarid *et al.* Este mecanismo involucra la inhibición de la liberación del citocromo c mitocondrial y la posterior activación de la caspasa 3 (Akarid *et al.*, 2004). Se cree que este mecanismo tiene que ver con la sensibilidad reducida de las células THP-1 infectadas a la TFD con ALA, dada la localización mitocondrial de la PplX endógena, pero se hace necesario estudiar en profundidad los mecanismos de muerte celular inducidos por la irradiación tanto en células infectadas como en células no infectadas.

Por otra parte, se observaron cambios morfológicos dependientes de la dosis de ALA o MAL en las células THP-1 relacionados con la aparición de vesículas citoplasmáticas y condensación de la cromatina. Estos cambios no se presentan en las células no irradiadas ni en los amastigotes intracelulares de *L. chagasi*, por lo que se cree que están directamente relacionados con la TFD con ALA. Hallazgos similares fueron obtenidos en el estudio de Akilov *et al.* Dados los

hallazgos obtenidos en este estudio, se cree que la eficacia de la Terapia fotodinámica con ALA *in vivo* se debe a mecanismos indirectos, como la eliminación de los macrófagos del tejido tratado aunque no se dé una eliminación directa del parásito.

En este trabajo se demostró la producción de PpIX a partir de ALA por parte de las células THP-1 no infectadas e infectadas con *L. chagasi*, la localización mitocondrial de la PpIX producida a partir de ALA y la toxicidad de la TFD con ALA sobre células THP-1 y promastigotes de *L. chagasi*. Sin embargo, no se obtuvo toxicidad de la TFD con ALA sobre los amastigotes intracelulares de *L. chagasi*. No obstante, se encontró que las células THP-1 no infectadas son más sensibles a la TFD con ALA que las células infectadas y que la TFD con ALA produce en estas últimas alteraciones morfológicas que podrían estar relacionadas con eventos pre-apoptóticos.

Se hace necesario cuantificar la PpIX producida a partir de ALA por las células THP-1 y cuanta de esta es internalizada por los amastigotes intracelulares, para lo que ya se ha adelantado la estandarización de la cuantificación de PpIX por cromatografía líquida de alta presión (HPLC). Se cree que también sería de utilidad establecer las vías de muerte celular inducidas por la TFD con ALA sobre las células THP-1, los promastigotes y sobre las células infectadas y las moléculas involucradas en estas para entender mejor el mecanismo de acción de la TFD en leishmaniasis.

5. CONCLUSIONES

En este estudio se demostró que las células THP-1 no infectadas e infectadas con *L. chagasi* producen PpIX de manera endógena a partir de ALA exógeno. Dicha PpIX está localizada en la mitocondria de las células tanto no infectadas como infectadas. No fue posible determinar si en las células infectadas la PpIX se localizaba además en los amastigotes intracelulares de *L. chagasi*.

La irradiación de células THP-1 no infectadas tratadas con ALA o MAL tuvo un efecto fototóxico dependiente de la dosis.

No se observó fototoxicidad del ALA sobre los promastigotes de *L. chagasi*, probablemente debido a la incapacidad del parásito de sintetizar PpIX a partir de ALA dada la ausencia de varias de las enzimas de esta vía metabólica. La PpIX exógena fue internalizada por los promastigotes de *L. chagasi* y su irradiación tuvo un efecto fototóxico sobre estos.

No se observó un efecto fototóxico directo del tratamiento con ALA o MAL sobre los amastigotes intracelulares de *L. chagasi*. Las células THP-1 infectadas tuvieron una menor sensibilidad a la irradiación que las células no infectadas y presentaron alteraciones morfológicas que indican eventos tempranos de muerte celular.

BIBLIOGRAFIA

AGRAWAL, Samir; RAY, Mayank y SUNDAR, Shyam. Management of visceral leishmaniasis: Indian perspective. En: Journal of postgraduate medicine. 51 (1) (2005) 553-557.

AKARID, Khadija *et al.* *Leishmania major*- mediated prevention of programmed cell death induction in infected macrophages is associated with the repression of mitochondrial release of cytochrome c. En: Journal of leukocyte biology. 76 (2004) 95-103.

AKILOV, Oleg *et al.* Parasitocidal effect of d-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of host cells. En: Experimental Dermatology. 16 (2007) 651-660.

ALRAHI, Abdulrahman *et al.* Fluconazole for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*. En: New England journal of medicine. 346 (12) (2002) 891-895.

AMATO, Vicente *et al.* Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis. A pilot study. En: International journal of infectious diseases. 4 (2000) 153-157.

ARANA, Byron *et al.* Randomized, controlled, double-blind trial of tropical treatment of cutaneous leishmaniasis with paromomycin plus methylbenzethonium chloride ointment in Guatemala. En: The American journal of tropical medicine and hygiene. 65 (5) (2001) 466-470.

AREVALO, Iracema *et al.* Successful treatment of drug-resistant cutaneous leishmaniasis in humans by use of imiquimod, an immunomodulator. En: Clinical infectious diseases. 33 (2001) 1847-1851.

BAILEY, Mark y LOCKWOOD, Diana. Cutaneous leishmaniasis. En: Clinics in Dermatology. 25 (2007) 203-211.

BERMAN, Jonathan. Treatment of new world cutaneous and mucosal leishmaniasis. En: Clinics in dermatology. 14 (5) (1996) 519-522.

BITTENCOURT, Achilea *et al.* Post-kala-azar dermal leishmaniasis associated with AIDS. En: The Brazilian journal of infectious diseases. 6 (6) (2002) 313-316

BLUM, Julia *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. En: Journal of antimicrobial chemotherapy. 53 (2004) 158-166

- BUATES, Sureemas y MATLASHEWSKI, Greg. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. En: The journal of infectious diseases. 179 (1999) 1485-1494.
- CASAS, Adriana y BATLLE, Alcira. Photodynamic therapy in Argentina. En: Photodiagnosis and Photodynamic therapy. 3 (2005) 205-213.
- CASTANO, Ana *et al.* Mechanisms in photodynamic therapy: part one- photosensitizers, photochemistry and cellular localization. En: Photodiagnosis and photodynamic therapy. 1 (2004) 279-293.
- CHEN, Jia-Yuh. Endogenous production of protoporphyrin IX induced by 5-aminolevulinic acid in leukemia cells. En: Acta pharmacologica sinica. 22 (2) (2001) 163-168.
- CORREA, Jose; BRAZIL, Reginaldo y SOAREZ, Mauricio. Leishmania (*Viannia*) *lainsoni* (Kinetoplastida: Tripanosomatidae), a divergent *Leishmania* of the *Viannia* sub-genus- A mini review. En: Memorias do instituto Oswaldo Cruz. 100 (6) (2005) 687-692.
- CROFT, Simon; BARRET, Michael y URBINA, Julio. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. En: Trends in parasitology. 21 (11) (2005). 508-512.
- CROFT, Simon; SEIFERT, Karin y YARDLEY Vanesa. Current scenario of drug development for leishmaniasis. En: The Indian journal of medical research. 123 (2006) 399-410.
- DA SILVA, Rosangela y SACKS, David. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. En: Infection and immunity. 55 (11) (1987) 2802-2806.
- DAVIES, Clive Richard *et al.* The epidemiology and control of leishmaniasis in andean countries. En: Cadernos de saude publica 16 (4) (2000) 925-950.
- DE ALMEIDA, Maria *et al.* Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. En: Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. 98 (7) (2003) 861-870.
- DE SIERVI, Adriana *et al.* d aminolevulinic acid cytotoxic effects on human hepatocarcinoma cells. En: BMC cancer. 2 (6) (2002).
- DESJEUX, Phillipe. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. En: Comparative immunology, microbiology and infectious diseases. 27 (5) (2004) 305-318

DOUGHERTY, Thomas *et al.* Photodynamic therapy. En: Journal of the national cancer institute. 90 (12) (1998) 889-905

DUTTA, Sujoy *et al.* Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminium phthalocyanine chloride for photolysis in vitro. En: Antimicrobial agents and chemotherapy. 49 (11) (2005) 4474-4484

EMBLETON *et al.* Development of a novel targeting system for lethal photosensitization of antibiotic resistant strains of *Staphylococcus aureus*. En: Antimicrobial agents and chemotherapy. 49 (9) (2005) 3690-3696.

ESCOBAR, Patricia *et al.* Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. En: Biomedica 26 (1) (2006) 49-56.

GARDLO, Kerstin *et al.* Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. En: Journal of the American academy of dermatology. 48 (6) (2003) 893-896

GHAFFARIFAR, Fatemeh *et al.* Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. En: Eastern Mediterranean health journal. 12 (6) (2006) 902-908.

GONTIJO, Bernardo y RIBEIRO, Maria de Lourdes. Leishmaniose tegumentar americana. En: Revista da sociedade brasileira de medicina tropical 31 (1) (2003) 71-80.

GONZALEZ, Luis Miguel y VELEZ, Ivan Dario. Miltefosine for disseminated cutaneous leishmaniasis. En: Biomedica. 26 (1) (2006) 13-16.

GRADONI, Luigi; GRAMICCIA, Marina y SCALONE, Aldo. Visceral leishmaniasis treatment , Italy. En: Emerging infectious diseases. 9(12) (2003) 1617-1620.

Guías de promoción de la salud y prevención de la enfermedad,
http://www.ins.gov.co/pdf/vcsp/Protocolo_12dic2006_LEISHMANIASIS_2007.pdf

HAILU, Asrat *et al.* Visceral leishmaniasis: New health tools are needed. En: PLoS medicine 2(7) (2005) 590-594.

HEPBURN, Neil. Cutaneous leishmaniasis. An overview. En: Journal of postgraduate medicine. 49 (1) (2003) 50-54.

HERWALDT, Barbara. Leishmaniasis. En: Lancet. 354 (9185) (1999) 1191-1199.

HEUSSLER, Volker, KÜENZI, Peter y ROTTENBERG, Sven. Inhibition of apoptosis by protozoan parasites. En: International journal of parasitology. 31 (11) (2001) 1166-1176.

HUANG, Zheng. A review of progress in clinical photodynamic therapy. En: Technology in cancer research & treatment. 4 (3) (2005) 283-293.

JHA, Tara. Drug unresponsiveness & combination therapy for kala-azar. En: The indian journal of medical research. 123 (2006) 389-398

Jl, Zhenyu *et al.* Subcellular localization pattern of protoporphyrin IX is an important determinant for its photodynamic efficiency of human carcinoma and normal cell lines. En: Journal of photochemistry and photobiology B. 84 (3) (2006) 213-220.

JUZENIENE, Asta y MOAN, Johan. The history of photodynamic therapy in Norway Part one: identification of basic mechanisms of general PDT. En: Photodiagnosis and photodynamic therapy. 4 (2007) 3-11.

JUZENIENE, Asta y MOAN, Johan. The history of photodynamic therapy in Norway Part two: Recent advances in general PDT and ALA-PDT. En: Photodiagnosis and photodynamic therapy. 4 (2007) 80-87.

KERR, Sara. Palearctic origin of *Leishmania*. En: Memorias do instituto Oswaldo Cruz. 95 (1) (2000) 75-80.

KOSAKA, Sachiko *et al.* A mechanistic study of d- Aminolevulinic acid- based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis. En: The journal of investigative dermatology. 127 (2007) 1546-1549.

LUZKIENE, Zivile. Photodynamic therapy: mechanism of action and ways to improve the efficiency of treatment. En: Medicina. 39 (12) 1137-1150.

MARKLE, William y MAKHOUL, Khaldoun. Cutaneous leishmaniasis. Recognition and treatment. En: American family physician. 69 (6) (2004) 1455-1460.

MAROVICH, Mary *et al.* leishmaniasis recidivans recurrence after 43 years: a clinical and immunologic report after successful treatment. En: Clinical infectious diseases. 33 (2001) 1076-1079.

MINODIER, Philippe y PAROLA, Phillipe. Cutaneous leishmaniasis treatment. En: Travel medicine and infectious diseases. 5 (2007) 150-158.

- MOMEN, Hooman y CUPOLILLO, Elisa. Speculations on the origin and evolution of the genus *Leishmania*. En: Memorias do instituto Oswaldo Cruz. 95 (4) (2000) 583-588.
- MURRAY, Henry. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. En: Antimicrobial agents and chemotherapy. 45 (8) (2001) 2185-2197.
- MURRAY, Henry. Treatment of visceral leishmaniasis in 2004. En: The American journal of tropical medicine and hygiene. 71 (6) (2004) 787-794.
- NAYAK, Chitra. Photodynamic therapy in dermatology. En: Indian journal of dermatology, venereology and leprology. 71 (2005) 155-160.
- NEVA, Franklin. Non-ulcerative cutaneous leishmaniasis in Honduras failed to respond to topical paromomycin. En: Transactions of the royal society of tropical medicine and hygiene. 91 (4) (1997) 473-475.
- O'RIORDAN, Katie, AKILOV, Oleg y HASAN, Tayyaba. The potencial for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. En: Photodiagnosis and photodynamic therapy. 2 (4) (2005) 247-262.
- OLLIARO, Piero *et al.* treatment options for visceral leishmaniasis. A systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. En: The lancet infectious diseases 5 (12) (2005) 763-774.
- OUELLETTE, Marc; DRUMMELSMITH, Jolyne y PAPADOPOLOU, Barbara. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. En: Drug Resistance Updates. 7 (2005) 257-266.
- PENATTI, Carlos *et al.* Delta aminolevulinic acid induced synaptosomal Ca²⁺ uptake and mitochondrial permeabilization. En: Archives of biochemistry and biophysics. 335 (1) (1996) 53-60.
- PENG, Quiang *et al.* 5- Aminolevulinic Acid-Based photodynamic therapy. En: Cancer 79 (12) (1997) 2282-2308
- PRASAD, Ragendra *et al.* Miltefosine: an oral drug for visceral leishmaniasis. En: Indian journal of pediatrics. 71 (2004) 143-144.
- QUIANG, Yong-gang *et al.* Photodynamic therapy for malignant and non malignant diseases: clinical investigation and application. En: Chinese medical journal. 119 (19) (2006) 845-857.

- REITHINGER, Richard *et al.* Cutaneous leishmaniasis. En: Lancet infectious diseases. 7 (2007) 581-596.
- REN, Qing-Guang *et al.* Comparison of 5-Aminolevulinic acid and its hexylester mediated photodynamic action on human hepatoma cells. En: Acta biochimica et biophysica sinica. 34 (5) (2002) 650-654.
- RUHLAND, Aron, LEAL, Nicole y KIMA, Peter. Leishmania promastigotes activate PI3K/Akt signaling to confer host cell resistance to apoptosis. En: Cellular microbiology. 9 (1) (2006) 84-96.
- RYTER, Stefan y TYRELL, Rex. The heme synthesis and degradation pathways: role in oxidant sensitivity. En: Free radical biology and medicine. 28 (2) (2000) 289-309.
- SAH, Jerome Franklin *et al.* Genetic rescue of Leishmania deficiency in porphyrin biosynthesis creates mutants suitable for analysis of cellular events in uroporphyrin and for photodynamic therapy. En: The journal of biological chemistry. 277 (17) (2002) 14902-14909.
- SARAVIA, Nancy y NICHOLS, Ruben. Leishmaniasis: a public health challenge that demands concerted effort and will. En: Biomedica. 26 (1) (2006) 8-9.
- SEEBERGER, Joseph, DAOUD, Saleh y PAMMER, Johannes. Transient effect of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with imiquimod. En: International journal of dermatology. 42 (7) (2003) 576-579.
- SHACKLEY, Dave *et al.* Photodynamic therapy. En: Journal of the royal society of medicine. 92 (1999) 562-565.
- SHAZAD, Babak; ABBASZADEH, Babak y KHAMESIPOUR, Ali. Comparison of topical paromomycin sulfate (twice/day) with intralesional meglumine antimonite for the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *L. major*. En: European journal of dermatology. 15 (2) (2005) 85-87
- SOTO, Jaime; GROGL, Max y BERMAN, Jonathan. Evaluation of Pentamidine for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. En: Clinical infectious diseases. 16 (3) (1993) 417-425.
- SOTO, Jaime y SOTO, Paula. Miltefosina oral para el tratamiento de la leishmaniasis. En: Biomedica. 26 (1) (2006) 207-217.
- SUNDAR, Shyam y CHATERJEE, Mitali. Visceral leishmaniasis- current therapeutic modalities. En: The Indian journal of medical research. 123 (2006) 345-332.

TRIESSCHEIJN, Martijn *et al.* Photodynamic therapy in oncology. En: Oncologist. 11 (2006) 1034-1044.

VANNIER SANTOS, Marcos; MARTINY, Adam y DE SOUZA, Wanderley. Cell biology of *Leishmania spp.*: Invading and evading. En: Current pharmaceutical design. 8 (2002) 297-318.

VELEZ, Ivan Darío *et al.* Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. En: Cadernos de Saude Publica. 17 (1) (2001) 171-180.

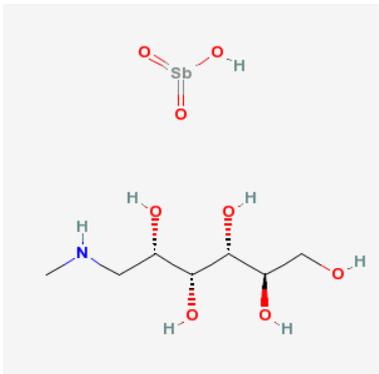
WILLARD, Robert *et al.* cutaneous leishmaniasis treatment in soldiers from fort Campbell, Kentucky returning from operation iraqi freedom highlights diagnostic and therapeutic options. En: Journal of the American academy of dermatology. 52 (6) (2005) 977-987.

WU, Su-Min *et al.* Photodynamic effects of 5- Aminolevulinic acid and Its hexylester on several cell lines. En: Acta biochimica et biophysica sinica. 35 (7) (2003) 655-660.

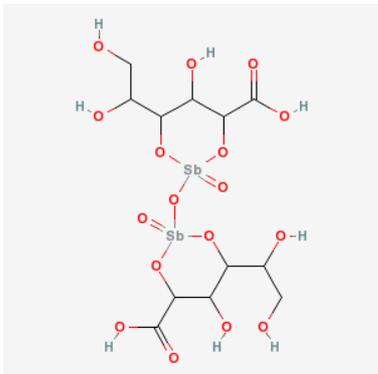
XIANG, Wenkai *et al.* Photodynamic effects induced by aminolevulinic acid esters on human cervical carcinoma cells in culture. En: Photochemistry and photobiology. 74 (4) (2001) 617-623.

YAMEY, Gavin. The world's most neglected diseases. En: BMJ. 325. (2002). 176-177.

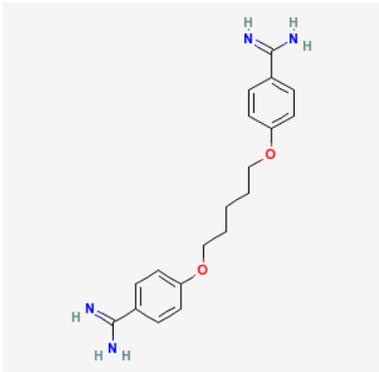
APENDICE 1 Medicamentos utilizados en el tratamiento de la leishmaniasis



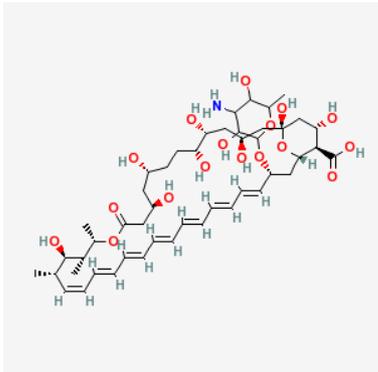
Meglumine Antimonato



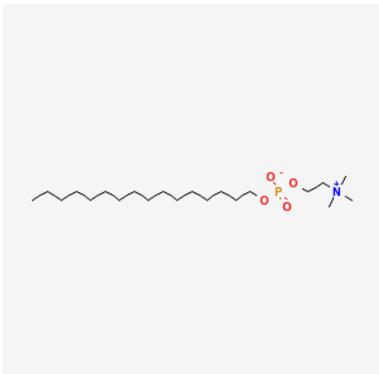
Estibogluconato de Sodio



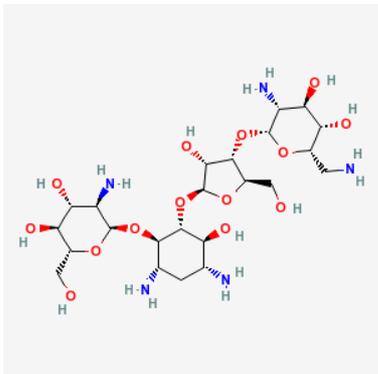
Pentamidina



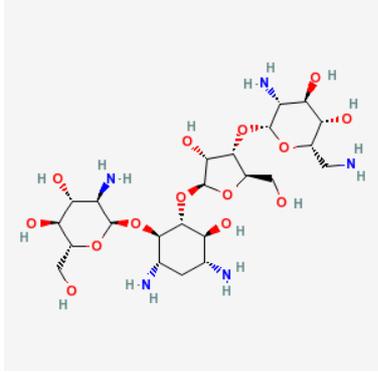
Anfotericina B



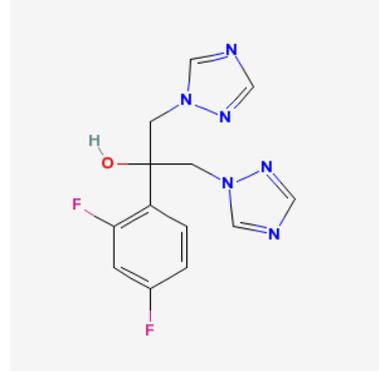
Miltefosina



Paromomicina

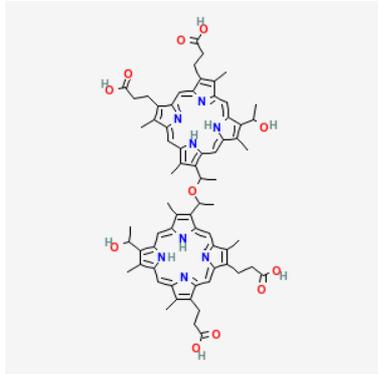


Imiquimod

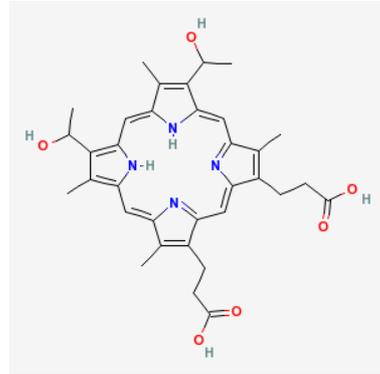


Fluconazol

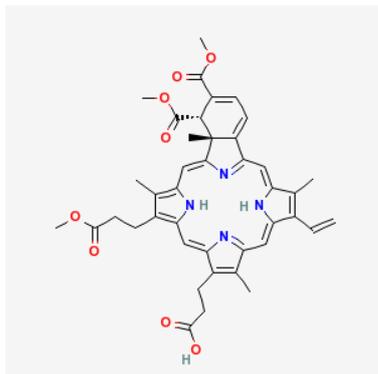
APENDICE 2. Fotosensibilizadores utilizados en la clínica



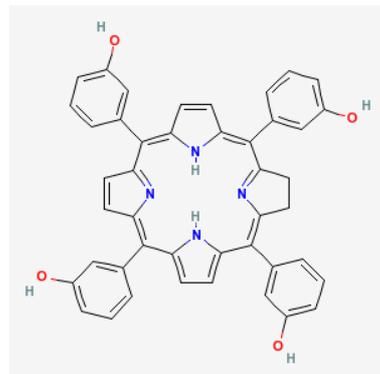
Photofrin



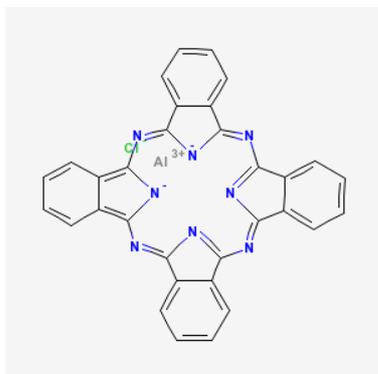
Hematoporphirina derivativa



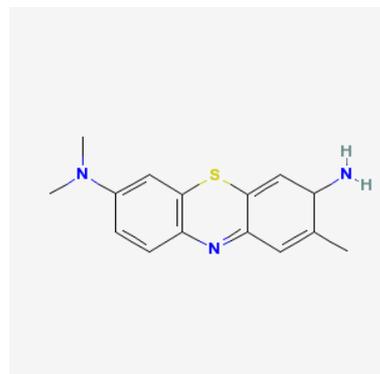
Benzoporphirina derivativa



Metatetrahidroxifenilclorina



Ftalocianina de Aluminio



Azul de Toluidina