



Universidad Nacional Mayor de San Marcos

Universidad del Perú. Decana de América
Facultad de Ciencias Biológicas
Escuela Profesional de Ciencias Biológicas

Actividad fotodinámica *in vitro* de ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada (AlPcClS₄) frente a estadios extracelular e intracelular de *Leishmania (Viannia) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (Leishmania) amazonensis*

TESIS

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en
Zoología

AUTOR

Kelly Vanessa IZARRA ROJAS

ASESORES

Jorge LEÓN QUISPE

Nyshon ROJAS PALOMINO

Lima, Perú

2018

DEDICATORIA

A Dios. Por estar conmigo siempre, darme salud y permitirme llegar a este punto.

A mi madre Dery, por haber motivado cada fracaso, por sus sabias palabras pero más por su infinito amor.

A mi padre Ladislao, por darme la fortaleza y el carácter necesario para creer en mi misma.

A mi hermana Lizbeth, por ser mi gran compañera de triunfos, batallas y derrotas, pero más por cambiar la monotonía de mi vida.

A mis compañeros Jenny, Brayan, Dania, Idania, Pilar, Carlos, Gebol, Frank, por el apoyo mutuo y las bromas compartidas, que alegraron los días. Muchísimas gracias por su amistad y hacer más llevadero el camino.

A mis amigos de la vida: Nadia, Iris, Karen, Berna, Chocho (José), Diego, Ronald, por su apoyo emocional, largas conversaciones, alegrías y cada detalle que marcaron una diferencia en mi vida durante el tiempo de ejecución, redacción y sustentación.

Y a todos aquellos familiares y amigos que no recordé al momento de escribir esto.

Ustedes saben quiénes son... muchas gracias!

AGRADECIMIENTO

Al Programa Nacional de Innovación para la Competitividad y Productividad - INNOVATE-PERU (Convenio N° 177-PNICP-PIAP-2015) por el financiamiento de este trabajo de Tesis.

Al Mg. Jorge León Quispe, Coordinador General de Grupo de Investigación, por darme la oportunidad de participar en los trabajos de investigación, por su comprensión, apoyo profesional y constante motivación que contribuyeron la finalización exitosa del presente trabajo y la elaboración de esta Tesis.

Al Dr. Julio Santiago, por brindarme su apoyo en la asesoría química y estar pendiente de los avances y logros.

A la Blga. Gloria Minaya, coordinadora responsable del Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis, por su confianza y por las facilidades brindadas durante el desarrollo del trabajo.

Al Blgo. Nyshon Rojas, por su motivación en el inicio de este proyecto, su confianza durante el proceso y presión en la redacción de este trabajo y por ceder cada espacio de su tiempo.

A la Blga. Ayde Sandoval; por su motivación continua durante la fase experimental.

Al Instituto Nacional de Salud (INS), por permitirme las instalaciones de la institución para el desarrollo de esta tesis.

Al Mag. Abraham Espinoza Culupú, quien a pesar de la distancia estuvo pendiente de cualquier duda presentada en el desarrollo de este trabajo.

A los coordinadores de los laboratorios de Metaxénicas Bacterianas, Zoonosis Parasitaria, Malaria, Chagas, Cultivo Celular, Rabia, Enteroparásitos, por su confianza y proporcionarme las facilidades del uso de materiales y equipos de su área para la ejecución de este trabajo.

A los profesores miembros del Jurado de Tesis, por hacer todo lo posible y proporcionarme parte de su valioso tiempo en la mejora del presente trabajo. Muchas gracias por apoyarme en esta última etapa.

ABREVIATURAS

TFD: TERAPIA FOTODINÁMICA

FS: FOTOSENSIBILIZADOR

$^3\text{O}_2$: OXIGENO ESTADO TRIPLETE

$^1\text{O}_2$: OXIGENO EN ESTADO EXCITADO SINGULETE

AIPcCIS₄: FTALOCIANINA DE ALUMINIO TETRASULFONADA CLORADA

μL : MICROLITRO

μM : MICROMOLAR

DMSO: DIMETIL SULFOXIDO

DH82: LINEA CELULAR DE PERRO

LED: DIODO EMISOR DE LUZ

MTT: (3-(4,5 DIMETHIAZOL-2IL)-2,5 DIFENILTETRAZOLIUM BROMETO)

OMS: ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD

MEM: MEDIO MINIMO ESENCIAL

PBS: BUFFER FOSFATO SALINO

ERO: ESPECIES REACTIVAS DE OXÍGENO

qPCR: PCR CUANTITATIVO

CNSP: CENTRO NACIONAL DE SALUD PÚBLICA

T₀: TIEMPO CERO

SFB: SUERO FETAL BOVINO

RPM: REVOLUCIONES POR MINUTO

ADN: ACIDO DESOXIRIBONUCLEICO

RPMI: ROSWELL PARK MEMORIAL INSTITUTE MEDIUM

SB^V: ESTIBOGLUCONATO

INDICE	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	4
2.1. <i>LEISHMANIA</i> Y LEISHMANIASIS.....	4
2.1.1. Definición, clasificación taxonómica de <i>Leishmania</i>	4
2.1.2. La Leishmaniasis.....	6
2.1.3. Distribución geográfica.....	6
2.1.4. Manifestaciones clínicas.....	11
2.1.5. Agente etiológico y ciclo de vida de <i>Leishmania sp</i>	14
2.1.6. Tratamiento de Leishmaniasis.....	16
2.1.7. Tratamiento Fotodinámico (TFD).....	17
3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	26
3.1. OBJETIVOS.....	26
3.1.1. Objetivo general.....	26
3.1.2. Objetivos específicos.....	26
3.2. HIPÓTESIS.....	26
4. MATERIALES Y MÉTODOS.....	26
4.1. MATERIAL BIOLÓGICO.....	26
4.2. MATERIAL QUÍMICO.....	27
4.3. LUGAR DE EJECUCIÓN.....	27
4.4. METODOLOGIA.....	27
4.4.1. OBTENCIÓN DE PARÁSITOS PROMASTIGOTES.....	27
4.4.2. CURVA DE CRECIMIENTO.....	27
4.4.3. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE FTALOCIANINAS.....	28
4.4.4. MANEJO DE LA LÍNEA CELULAR DH82.....	30
4.4.4.1. Actividad fototóxica del fotosensibilizador en la línea celular DH82	30

4.4.5. ACTIVIDAD FOTOTÓXICA DEL FOTOSENSIBILIZADOR EN PROMASTIGOTES	30
4.4.6. ACTIVIDAD FOTÓXICA DEL FOTOSENSIBILIZADOR EN AMASTIGOTE INTRACELULAR	32
5. RESULTADOS	37
5.1. OBTENCIÓN DE PROMASTIGOTES DE <i>LEISHMANIA</i> EN EL CULTIVO A pH 5.5.....	37
5.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE <i>LEISHMANIA</i>	38
5.3. EVALUACIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL FOTOSENSIBILIZADOR.....	39
5.4. CONFIRMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OXIGENO SINGULETE CON 4-CLOROFENOL	40
5.5. ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE AIP _c CIS ₄	41
5.5.1. Toxicidad celular	41
5.5.2. Evaluación de la TFD en promastigotes de <i>Leishmania (V.) peruviana</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> y <i>L. (L.) amazonensis</i>	42
5.5.3. Cambios morfológicos de promastigotes frente al tratamiento	49
5.5.4. Evaluación de la TFD en amastigote intracelular de <i>L. (V.) peruviana</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> y <i>L. (L.) amazonensis</i>	49
5.5.5. Cambios morfológicos de amastigotes intracelulares frente al tratamiento	54
6. DISCUSIÓN	58
7. CONCLUSIONES.....	64
8. RECOMENDACIONES	65
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66
10. ANEXO	72

INDICE DE FIGURAS	Página
Figura 1. Clasificación actualizada de las especies de <i>Leishmania sp.</i>	5
Figura 2. Proporción de casos de Leishmaniasis cutánea y mucosa según forma clínica y país, 2016	6
Figura 3. Distribución global de especies de <i>Leishmania</i> patógenas para el humano. .7	
Figura 4. Proporción de casos de Leishmaniasis cutánea y mucosa por edad y país, Américas, 2016.	8
Figura 5. Tasa de incidencia de Leishmaniasis a nivel distrital de departamentos de mayor notificación. Perú 2017	10
Figura 6. Diferentes especies de <i>Leishmania</i> causan varias manifestaciones clínica. 11	
Figura 7. Leishmaniasis cutánea, Leishmaniasis cutáneo mucosa, Leishmaniasis Tegumentaria difusa, Leishmaniasis visceral.	13
Figura 8. Micrografías morfológicas de (A) Promástigote y (B) Amastigote	14
Figura 9. Ciclo Biológico de <i>Leishmania sp.</i>	15
Figura 10. Modelo de producción de ERO en la TFD.	19
Figura 11. Espectros de Absorción en la región UV-Vis de derivados ftalocianínicos. 22	
Figura 12. Estructura química de ftalocianina de Al (III) tetrasulfónico clorada (AIPcCIS ₄).....	23
Figura 13. Cultivo de parásitos	28
Figura 14. A. Lámpara con focos LED, B. Lámpara con el soporte	29
Figura 15. Radiación de las placas incubadas con el fotosensibilizador.	31
Figura 16. Prueba Colorimétrica MTT	32
Figura 17. Curva estándar	35
Figura 18. Diluciones seriadas de cultivo de <i>L. (V.) braziliensis</i>	35
Figura 19. A. Promastigotes metacíclicos, B. Promastigotes procíclicos	37
Figura 20. Curva de crecimiento de <i>Leishmania (V.) peruviana</i> , <i>L.(V.) braziliensis</i> , <i>L. (L.) amazonensis</i> . Recuento cada 12 horas por 10 días.	38
Figura 21. Solución de Ftalocianina AIPcCIS ₄ , medición de su espectro de absorción, pico absorción de 675nm	39
Figura 22. A. Porcentaje de conversión del Clorofenol en la reacción a diferentes distancias de iluminación.....	40
Figura 23. Porcentaje de viabilidad de la línea celular DH82, frente al tratamiento con AIPcCIS ₄	42
Figura 24. Monitoreo pos tratamiento de la progresión de <i>L. (V.) peruviana</i> , <i>L.(v.) braziliensis</i> y <i>L.(L.) amazonensis</i> a las 24, 48, 72 y 96 horas	43

Figura 25. Monitoreo de la progresión de <i>Leishmania (V.) peruviana</i> , por concentraciones.....	44
Figura 26. Monitoreo de la progresión de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i> , por concentraciones.....	46
Figura 27. Monitoreo de la progresión de <i>Leishmania (V.) amazonensis</i> , por concentraciones.....	47
Figura 28. Gráfico de interacciones de las tres especies de <i>Leishmania</i> en el tiempo, después del tratamiento TFD-AIPcCIS ₄ , comparación de medias.	48
Figura 29. Cambios Morfológicos de promastigotes.....	50
Figura 30 Amplificación por real time PCR, evaluación del tratamiento fotodinámico <i>in vitro</i> frente a amastigotes intracelulares infectado por <i>L.(L.)amazonensis</i> (0 – 72 horas post irradiación).	52
Figura 31. Evaluación de la TFD sobre el número de amastigotes intracelular de <i>Leishmania (V.) peruviana</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> y <i>L.(L.) amazonensis</i> a escala logarítmica en 0 y 72 horas post tratamiento. Comparación entre medianas y error estándar	52
Figura 32. Tendencia del efecto del TFD-AIPcCIS ₄ a 72 horas post irradiación sobre el número de amastigotes intracelular de las tres especies de <i>Leishmania</i> en escala logarítmica.....	54
Figura 33. Cultivo de amastigotes intracelulares infectados de <i>L. (V.) peruviana</i> frente al tratamiento.	55
Figura 34. Microfotografías de amastigote intracelular de <i>L.(V.) braziliensis</i> (aumento 100X), por coloracion giemsa.....	57

INDICE DE TABLAS

Página

Tabla 1. Clasificación por familias de agentes fotosensibilizadores	20
Tabla 2. Preparación del Master Mix	34
Tabla 3. Condiciones de amplificación del gen ribosomal SSU RNA	34
Tabla 4. Concentración de <i>L.(V.) peruviana</i> , <i>L. (V.) braziliensis</i> , <i>L.(L.) amazonensis</i> por días.	39
Tabla 5. Tabla de los valores de Ct y su conversión a ng/ul de ADN parasitario.	51

RESUMEN

La leishmaniasis, tiene un fuerte impacto social, alta morbilidad y se manifiesta por la presentación de cuadros clínicos severos. En nuestro país, las formas clínicas más frecuentes son la Leishmaniasis Cutánea (LC); Leishmaniasis Cutáneo Mucosa (LCM) y Leishmaniasis Cutánea Difusa (LD) causadas principalmente por *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Leishmania) amazonensis* respectivamente. En este contexto, se evaluó la actividad fotodinámica *in vitro* de ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada (AIPcCIS₄) sobre promastigotes y amastigotes de *L.(V.) peruviana*, *L.(V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*. La actividad del fotosensibilizador AIPcCIS₄ sobre promastigotes se determinó por la prueba colorimétrica trimetiltetrazolium (MTT) y su actividad tóxica en amastigotes por qPCR. Los resultados para promastigotes fueron expresados en Concentración Inhibitoria 50 (IC₅₀) y para amastigotes en porcentajes (%) de reducción de ADN parasitario. Se encontró que la actividad de AIPcCIS₄ a 100 µM, 24 horas post tratamiento fue fototóxica en promastigotes, inhibiendo el crecimiento de *L. (V.) peruviana*, *L.(V.) braziliensis* y *L.(L.)amazonensis* en 65,6; 49,6 y 43,9% frente al control respectivamente; Concentraciones inferiores a 50 µM de AIPcCIS₄ no tuvieron efectos significativos en ninguna de las tres especies con respecto al control ($p>0.05$). En cambio para amastigotes intracelulares de las tres especies, la AIPcCIS₄ expuesta a 200 µM, 72 horas post tratamiento logró una reducción del número de amastigotes con respecto al control en un 57,82; 37,13 y 34,85% respectivamente. Asimismo, se observaron alteraciones morfológicas que podrían estar asociados a procesos de apoptosis. Los resultados de avance permiten indicar que la TFD con nuevos fotosensibilizadores como AIPcCIS₄ serían una probable alternativa en el tratamiento de leishmaniasis, sin embargo se requiere contar con ensayos *in vivo* en animales de experimentación.

Palabras clave: Enfermedades tropicales, leishmaniasis cutánea, terapia fotodinámica, fotosensibilizadores, tratamiento alternativo.

ABSTRACT

Leishmaniasis has a strong social impact, high morbidity and is manifested by the presentation of severe clinical symptoms. In our country, the most frequent clinical forms are Cutaneous Leishmaniasis (LC); Cutaneous Mucosa Leishmaniasis (MCL) and Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (LD) caused mainly by *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* respectively. In this context, the *in vitro* photodynamic activity of aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride (AIPcCIS₄) on promastigotes and amastigotes of *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* was evaluated. The activity of the photosensitizer AIPcCIS₄ on promastigotes was determined by the colorimetric assay trimethyltetrazolium (MTT) and its toxic activity in amastigotes by qPCR. The results for promastigotes were expressed in Inhibitory Concentration 50 (IC₅₀) and for amastigotes in percentages (%) of reduction of parasitic DNA. It was found that the activity of AIPcCIS₄ at 100 µM, 24 hours post treatment was phototoxic in promastigotes, inhibiting the growth of *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in 65, 6; 49.6 and 43.9% against the control respectively; concentrations less than 50 µM of AIPcCIS₄ had no significant effect on any of the three species with respect to the control ($p > 0.05$). In contrast, for intracellular amastigotes of the three species, AIPcCIS₄ exposed to 200 µM, 72 hours after treatment achieved a reduction in the number of amastigotes with respect to the control in 57,82; 37,13 and 34,85% respectively. Likewise, morphological alterations that could be associated with apoptosis processes were observed. The advance results indicate that PDT with new photosensitizers such as AIPcCIS₄ would be a probable alternative in the treatment of leishmaniasis, however, it is necessary to have *in vivo* tests in experimental animals.

Key words: Tropical diseases, cutaneous leishmaniasis, photodynamic therapy, photosensitizers, alternative treatment.

1. INTRODUCCIÓN

La Leishmaniasis, es una enfermedad metaxénica, causada por más de 20 especies del género *Leishmania*, protozooario parásito que alterna su ciclo de vida entre un hospedero invertebrado como un flebotomino del género *Lutzomyia* y un hospedero vertebrado, principalmente mamífero el cual dependiendo de la ubicación de las lesiones en el humano (piel, mucosas y órganos internos) pueden ser clasificados como Leishmaniasis cutánea, cutáneo mucosa y órganos internos que al no ser tratadas oportunamente dejan secuelas como cicatrices deformantes o incluso producir la muerte (Ready *et al.*, 2014).

Esta enfermedad es reconocida por la OMS, como un importante problema de salud pública en el mundo, siendo los países de Afghanistan, Argelia, Colombia, Brazil, Iran, Siria, Etiopia, Norte de Sudán, Costa Rica y Perú, los países que representan entre el 70 y el 75% de la incidencia estimada global de Leishmaniasis cutanea, distribuidos en regiones de Asia occidental, Asia central, Mediterránea y América (Alvar *et al.*, 2012). El Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – Ministerio de Salud, en el año 2017, reportó 5369 casos de Leishmaniasis de los cuales el 91.8 % (4929) corresponde a casos de leishmaniasis cutánea (Uta) y el 8,2 % (420) casos de leishmaniasis cutánea mucosa conocida como espundia. El tratamiento convencional recomendado por la OMS para esta enfermedad son los antimoniales pentavalentes (Sb^V), el cual presenta entre sus principales desventajas; la prolongada duración del tratamiento (20 a 30 días, dependiendo de la forma clínica de la enfermedad), la administración parenteral, el costo que representa el suministro del medicamento, los efectos secundarios asociados a la toxicidad como arritmias cardiacas, nauseas, pancreatitis, dolores articulares y musculares que dificultan la culminación del tratamiento lo cual genera, el incremento de pacientes con falla al tratamiento (Arévalo *et al.*, 2007, Mohapatra *et al.*, 2014), otras alternativas al tratamiento convencional son la amfotericina B, paramomicina o miltefosina, cuyo

empleo también presenta efectos secundarios (Camargo y Langoni; 2006) surgiendo cada vez la urgente necesidad de buscar nuevos agentes terapéuticos, asequibles, eficaces y menos tóxicos para el tratamiento de esta enfermedad que sustituyan el tratamiento actual o lo complementen (Kedzierski *et al.*, 2010).

La terapia fotodinámica (TFD) inicialmente fue estudiada para reducir células neoplásicas, esta depende de la combinación de tres elementos; el agente fotosensibilizador, una determinada longitud de onda de la luz y oxígeno molecular; cuya interacción genera oxígeno singulete, que por mecanismos físicos y químicos son capaces de producir radicales tóxicos (ERO) de alta reactividad con capacidad de inducir la muerte de la célula por un proceso de apoptosis o necrosis (Amin *et al.*, 2012). En la última década se han desarrollado estudios sobre la aplicación de la TFD en el tratamiento de la Leishmaniasis cutánea, siendo las porfirinas y ftalocianinas, los FS más empleados (Dutta *et al.*, 2008, Pinto *et al.*, 2011). Las ftalocianinas han recibido particular atención por contener una variedad de iones de metal, responsable de propiedades bioquímicas, como una mayor absorción de luz, afinidad por el tejido blanco, selectividad por compartimentos celulares como la mitocondria y rápida excreción del mismo, lo que minimiza los efectos de fotosensibilización (Dai *et al.*, 2010).

Estudios realizados sobre las formas amastigotes y promastigotes en distintas especies de *Leishmania* causantes de lesiones cutáneas y cutáneo-mucosas (Dutta *et al.*, 2008, Pinto *et al.*, 2011), en los cuales se evaluó el tratamiento fotodinámico de ftalocianinas con Zinc (ZnPc), aluminio (AlPc), tetrasulfonato (AlPcS₄), evidenciaron que la susceptibilidad y los grados de toxicidad dependen de la naturaleza bioquímica de la ftalocianina, debido a que el metal central juega un rol importante en la actividad biológica influenciando el tiempo de vida del estado excitado del triplete. Sin embargo, estos estudios se realizaron principalmente con especies de *Leishmania* circulantes de Europa (Akilov *et al.*, 2007, Dutta *et al.*, 2008, Peli *et al.*, 2011). A la fecha no se han

desarrollado estudios sobre el uso de la TFD en especies endémicas del Perú como *Leishmania (V.) peruviana*, responsable de la uta.

El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto del tratamiento fotodinámico *in vitro* sobre las formas extracelular (promastigote) e intracelular (amastigote) en las especies de *Leishmania* de mayor importancia epidemiológica en Salud Pública para el país.

2. MARCO TEÓRICO

2.1. *LEISHMANIA* Y LEISHMANIASIS

2.1.1. Definición, clasificación taxonómica de *Leishmania*

Leishmania spp. es un protozoo flagelado, considerado agente causal de Leishmaniasis, tiene un ciclo digenético que pasa por dos estadios (Rey, 2008).

Reino: Protista

Subreino: Protozoa

Phylum: Sarcomastigophora

Clase: Zoomastigophora

Ordén: Kinetoplastidae

Familia: tripanosomatidae

Género: *Leishmania*

Sub género: *Leishmania (Leishmania)*

Leishmania (Viannia)

Clasificación Taxonómica de *Leishmania*

Fuente: Ross 1903

Según la data filogenética, el género *Leishmania* se divide en 4 subgéneros, de los cuales los subgénero ***Leishmania*** (incluye las especies de *Leishmania major*, *L. tropica*, *L. donovani*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*) y ***Viannia*** (*Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis* y *L. peruviana*), son de mayor importancia debido a su repercusión en la salud, a su vez de las 54 especies que conforman este género sólo 21 especies son patógenas de humanos (Akhoundi *et al.*, 2017) (Figura 1). Las diferencias entre ellas se debe a su composición en isoenzimas, antígenos, sensibilidad a fármacos (Walton, 1989) y secuencias nucleotídicas (Akhoundi *et al.*, 2017).

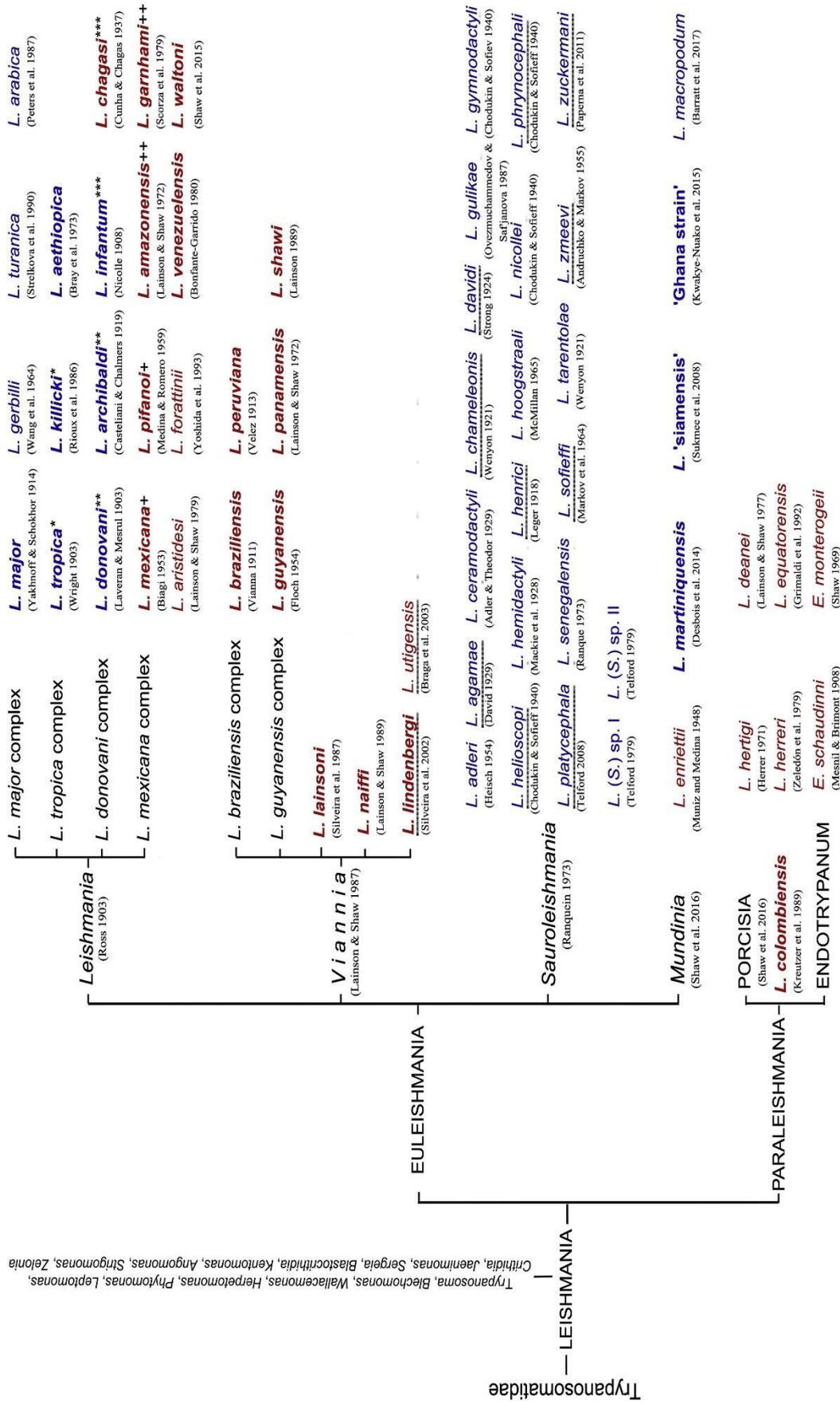


Figura 1. Clasificación actualizada de las especies de *Leishmania* sp.

Fuente: Akhoundi et al., 2017

2.1.2. La Leishmaniasis

La Leishmaniasis, es la enfermedad parasitaria infecciosa no contagiosa, su transmisión al humano se da por más de 30 especies de vectores del género *Phlebotomus* y *Lutzomyia* en el viejo y nuevo mundo (Akhoundi *et al.*, 2017).

Esta enfermedad se encuentra en el grupo de enfermedades “desatendidas”, por el poco interés de empresas públicas y privadas para implementar mecanismo de control e investigación, debido a que la población afectada es de bajo poder adquisitivo (OMS, 2010).

2.1.3. Distribución geográfica

Leishmaniasis es reconocida por la Organización mundial de la Salud y Organización Panamericana de la salud (OMS/OPS), como un importante problema en salud pública global, donde a nivel mundial se estima que 350 millones de personas están a riesgo de contraer la enfermedad, 12 millones actualmente infectados expandidos a 98 países (localizados principalmente en zonas tropicales y sub-tropicales) con una incidencia de 0,7- 1,2 casos de leishmaniasis cutánea (LC) y 0,2- 0,4 millones de casos de Leishmaniasis visceral (LV) (Alvar *et al.*, 2012)(Figura 3).

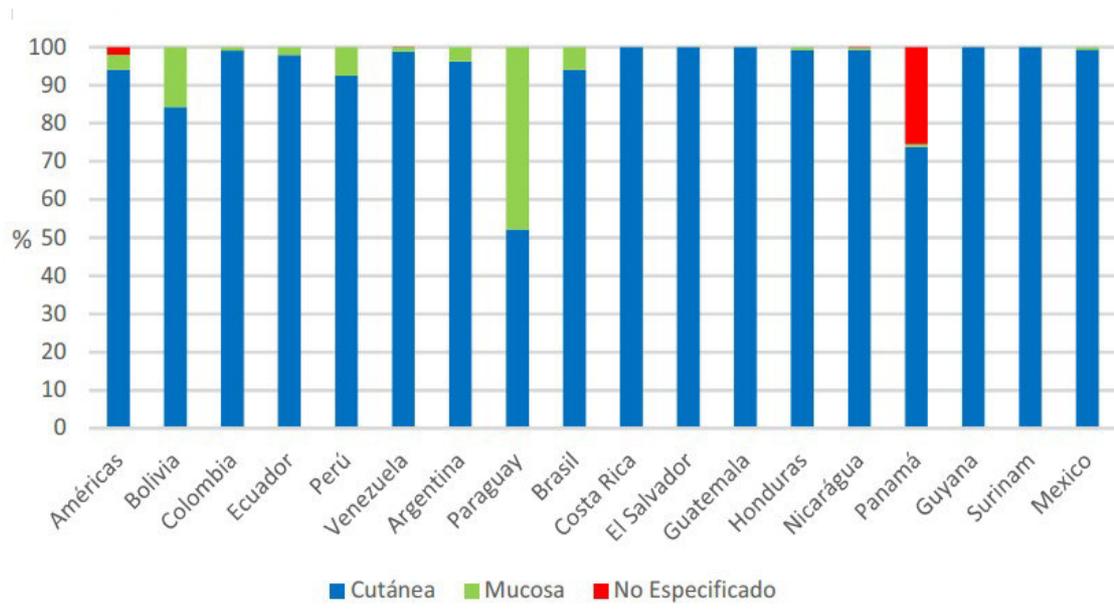


Figura 2. Proporción de casos de Leishmaniasis cutánea y mucosa según forma clínica y país, 2016
Fuente: OPS/OMS: Datos reportados por los Programas Nacionales de Leishmaniasis/Vigilancia, 2018.

En América, 17 de 18 países endémicos al 2016 reportaron 48,915 casos de LC y LM. Del total de casos el 74,3% fue reportados por Brasil (12,690), Colombia (10,966) ,Perú (7,271) y Nicaragua (5,423), con un incremento del 5% de casos en comparación al año anterior para Colombia (31,3%) , Perú (33,03%) y Nicaragua (181,8%) y una reducción cerca del 34% para Brasil. La forma clínica mucosa/ mucocutánea representa el 3,9%, donde países como Paraguay, Brasil, Perú, Bolivia, reportaron el 85,5% de casos, siendo Paraguay de mayor casos registrados (47,8%) (Figura 2). Mientras que las formas cutáneas atípicas fueron observadas en 817 casos, distribuido en Honduras (93,2%), Nicaragua (5,4%) y el Salvador (1,4%).

En todos estos países el grupo más afectado es el sexo masculino (67,2%), entre jóvenes (18- 29 aa) y adultos (30-59 aa), en el caso de Perú se registra una incidencia de 22,4% y 34,5% respectivamente (OPS; Informe epidemiológico de las Américas, 2018) (Figura 4).

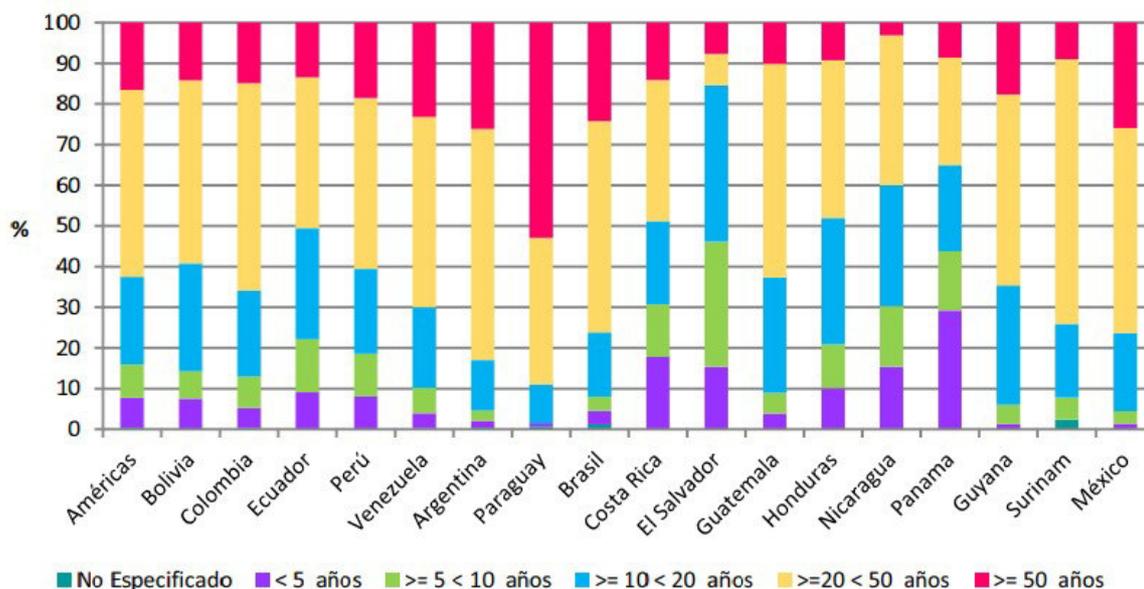


Figura 4. Proporción de casos de Leishmaniasis cutánea y mucosa por edad y país, Américas, 2016.

Fuente: OPS/OMS: Datos reportados por los Programas Nacionales de Leishmaniasis/Vigilancia, 2018.

En el Perú la Leishmaniasis es la tercera causa de morbilidad por enfermedades transmisibles después de la malaria y la tuberculosis (Sanchez-Saldaña *et al.*, 2004), la transmisión activa de la enfermedad ocurre en 19 departamentos del país (Figura 5). A la fecha existen 6 especies predominantes que son *Leishmania (V.) braziliensis*, causante del 98% de los casos de leishmaniasis mucosa y cutáneo mucosa, *L. (V.) peruviana*, causante de la leishmaniasis cutánea, endémica de los Andes, *L. (L.) amazonensis*, causante de lesiones mucosas y difusas, endémica en el sur de América, Amazonas, Ucayali, Junín, Ayacucho, *L. (V.) guyanensis*, que va de la región oeste de los valles interandinos de Ancash hasta Ucayali, *L. (V.) lainsoni* propia de los bosques Amazónicos en el departamento de San Martín, Huánuco, Pasco, Ayacucho y Cusco y *L. (V.) shawi*, reportado en Madre de Dios (Lucas *et al.*, 1998; Kato *et al.*, 2010).

Según el Centro Nacional de Epidemiología, Prevención y Control de Enfermedades – MINSA, la Leishmaniasis cutánea (uta) representa el 91,8% de casos con mayor incidencia en los departamentos de Cusco, San Martín, Madre de Dios, Cajamarca, Junín, Ucayali, Piura, Amazonas, Puno, Ancash, Loreto, La Libertad, mientras que el 8,2% de casos es leishmaniasis mucocutánea, registran mayor incidencia en los departamentos de Cusco, Madre de Dios, Ucayali, Huánuco, Junín, Pasco y Ayacucho. Siendo Cusco y Madre de Dios las áreas de alto riesgo por la continua migración de la población a zonas mineras, madereras o de actividades ilícitas (MINSA. Boletín epidemiológico del Perú, 2017).

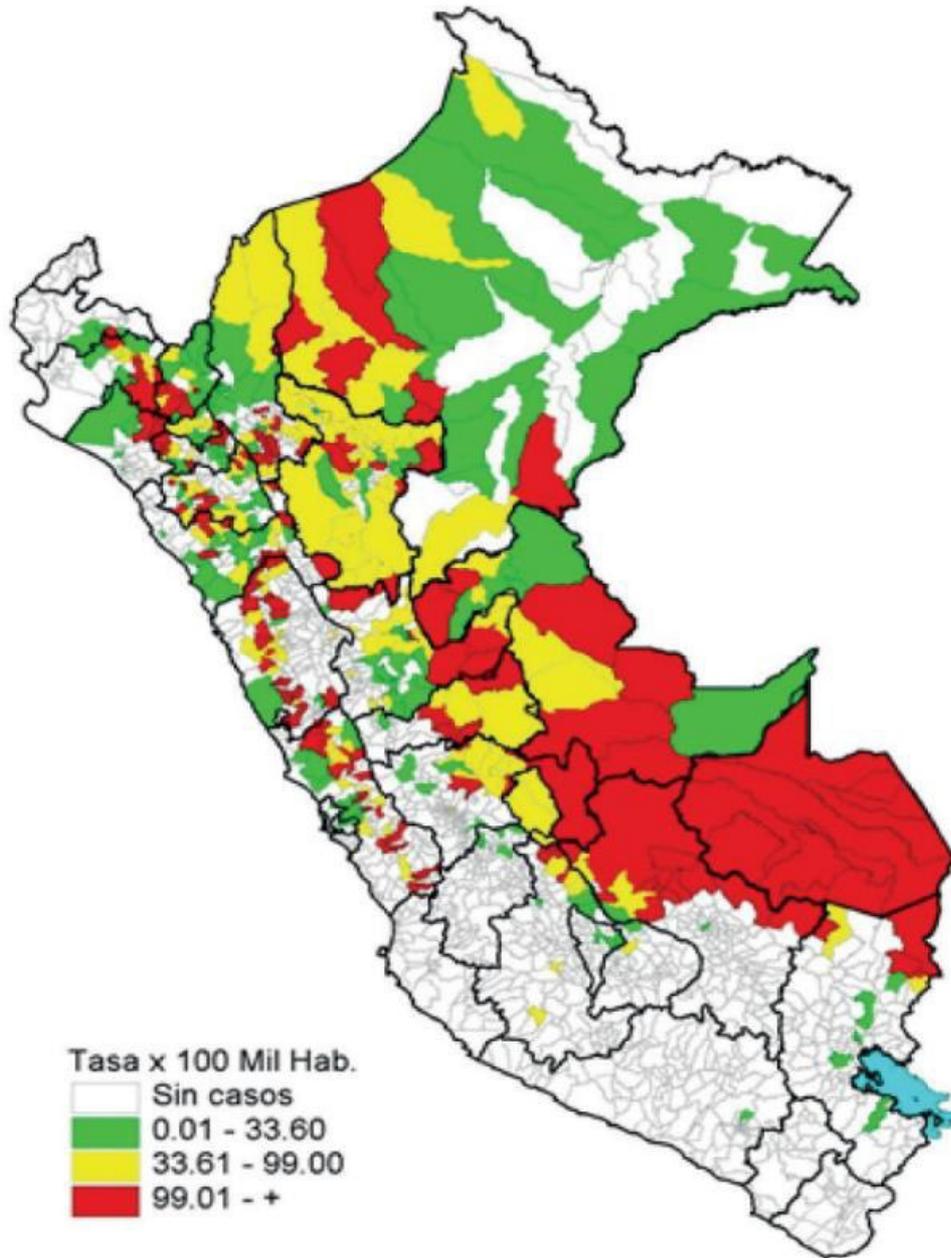


Figura 5. Tasa de incidencia de Leishmaniasis a nivel distrital de departamentos de mayor notificación. Perú 2017

Fuente: Centro Nacional de Epidemiología, prevención y Control de Enfermedades *Hasta la SE 45.

2.1.4. Manifestaciones clínicas

La interacción de las especies de *Leishmania* infectante con otros factores principalmente el sistema inmunológico del paciente puede generar diversas manifestaciones de la enfermedad (Figura 6) las cuales son definidas por la localización del parásito en el tejido infectado.

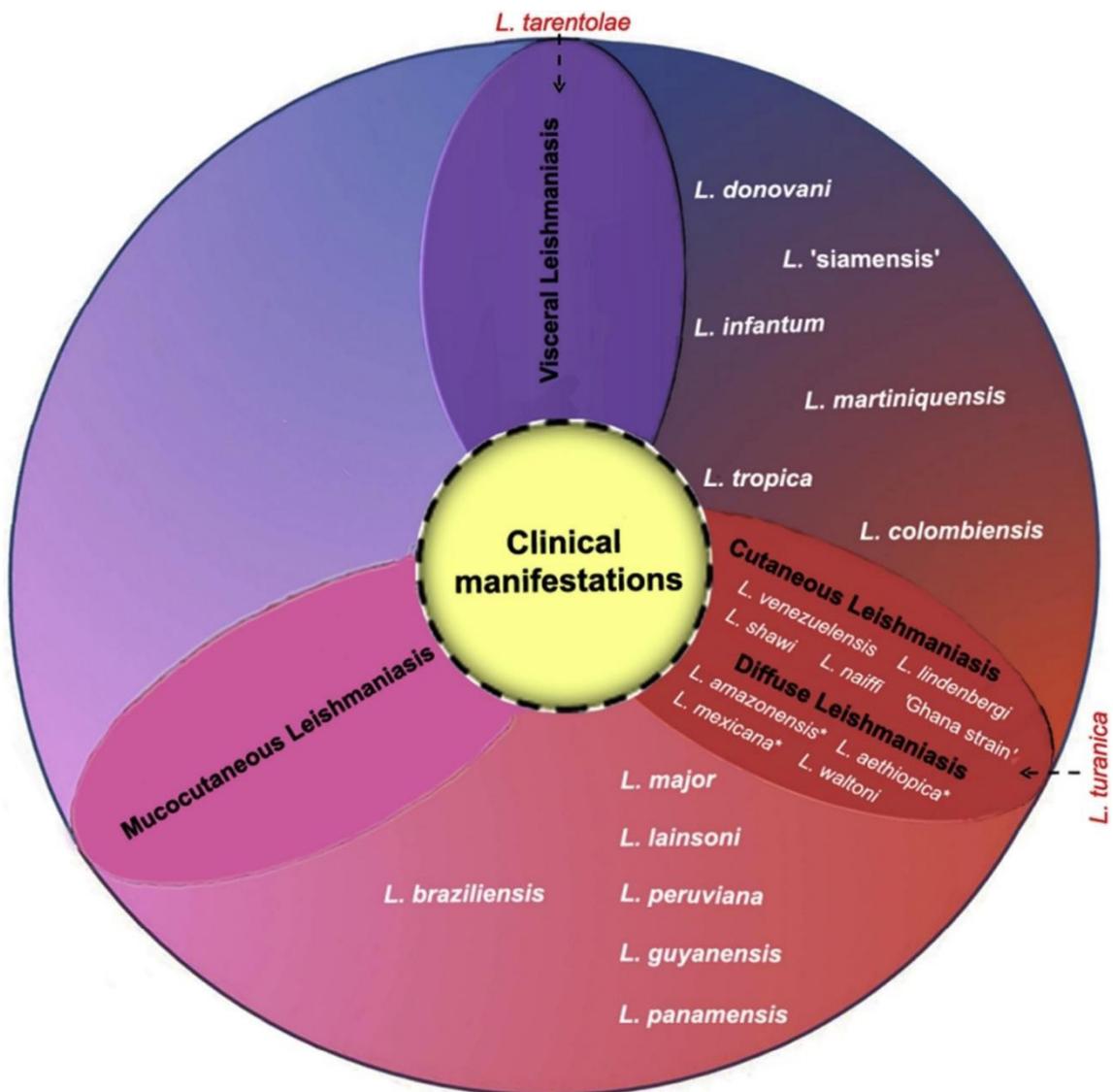


Figura 6. Diferentes especies de *Leishmania* causan varias manifestaciones clínicas, las principales formas están mostradas en la figura.

El color del rango demuestra la cercanía de las especies a la manifestación clínica, basados en la frecuencia de los casos clínicos. *L. tarentolae*, *L. turanica* fueron recientemente reportadas especies patógenas para el humano por lo que están en un grupo fuera.

Fuente: Akhouni et al., 2017

Leishmaniasis tegumentaria o cutánea (LC). Se caracteriza por presentar lesiones ulcerativas en la piel que pueden ser únicas o múltiples, no dolorosas, ni pruriginosa (Figura 7-1A). Esta manifestación es de buen pronóstico a tener cura (Alvar *et al.*, 2012). En el Perú esta forma clínica es causado por las especies *L. (V.) peruviana*, *L.(V.) guyanensis*, *L.(V.) lainsoni*. *L. (V.)braziliensis* (Lucas *et al.*, 1998).

Leishmaniasis cutánea difusa (LCD). Es la forma clínica caracterizada por presentar lesiones no ulcerosas en distintas partes del cuerpo, su aparición es muy similar a la lepra su tratamiento es complicado y difícil de curar (Figura 7-1C). Esta forma clínica es producida por *L.(L.) amazonensis* (Lucas *et al.*, 1998; Alvar *et al.*, 2012).

Leishmaniasis mucocutanea (LMC). Esta forma clínica es causante de la destrucción de la cavidad oral – nasal, faríngea (Figura 7-1B), puede llevar a mutilaciones de la cara, dependiendo de la progresión de la enfermedad, principalmente causada por especies de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L.(L.)amazonensis* (Lucas *et al.*, 1998; Alvar *et al.*, 2012).

Leishmaniasis visceral (LV). Conocida como Kala-azar es la forma más severa de la enfermedad y que sin un tratamiento oportuno puede causar la muerte ya que podría afectar órganos como el bazo, hígado, tejidos linfoides, (Fig.7-1D) sin embargo esta forma clínica ni su vector principal *Lutzomyia longipalpis* no están presentes en Perú. (Alvar *et al.*, 2012).



Figura 7. Leishmaniasis cutánea, Leishmaniasis cutáneo mucosa, Leishmaniasis Tegumentaria difusa, Leishmaniasis visceral.

1A. Leishmaniasis cutánea; casos de úlcera reciente y de borde bien definido. **1B.** Leishmaniasis cutáneo mucosa, que implica parte de la nariz y labio superior. **1C.** Paciente con Leishmaniasis tegumentaria difusa. **1D.** Niños con Leishmaniasis visceral.

Fuente: Rey, 2008.

2.1.5. Agente etiológico y ciclo de vida de *Leishmania sp*

Las dos formas del parásito son amastigote y promastigote (Figura 8), la forma amastigote son aflageladas ubicados en el hospedero vertebrado dentro de macrófagos, células dendríticas o fibroblastos, tiene una longitud de 3,0 - 6,5 μm y un ancho de 1,5 - 3,0 μm , mientras que la forma promastigote (flageladas) posee una longitud de 10,0 a 20,0 μm y 1,5 -3,0 μm de ancho y se encuentra en el invertebrado (vector) (Rangel y Laison; 2009).

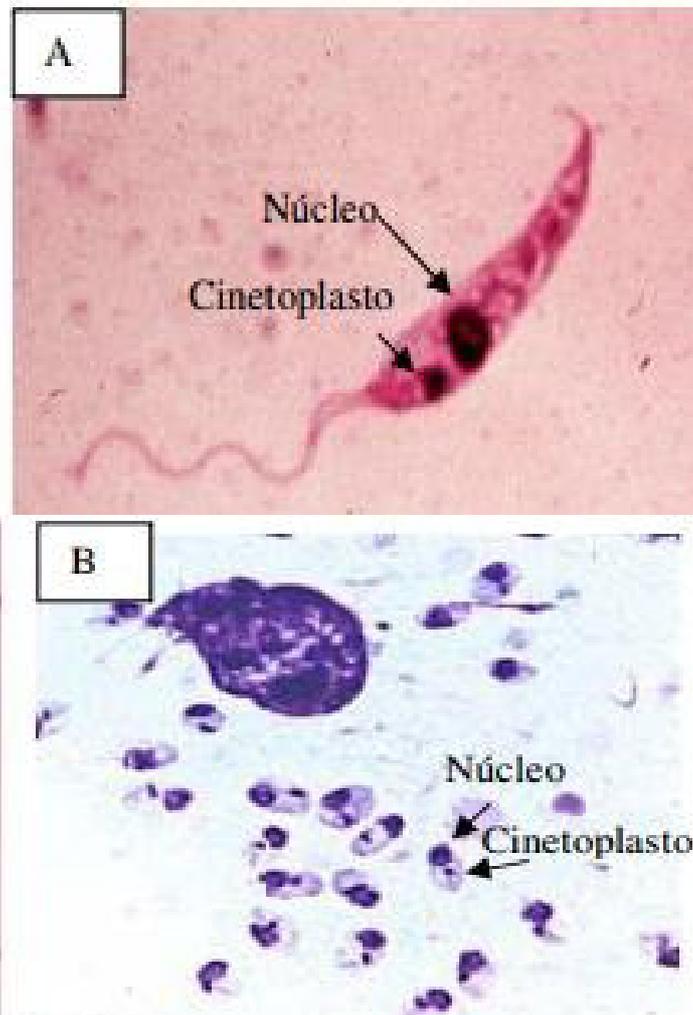


Figura 8. Micrografías de las formas morfológicas de (A) Promástigote y (B) Amastigote

Fuente: Rey, 2008

2.1.5.1. Ciclo Biológico

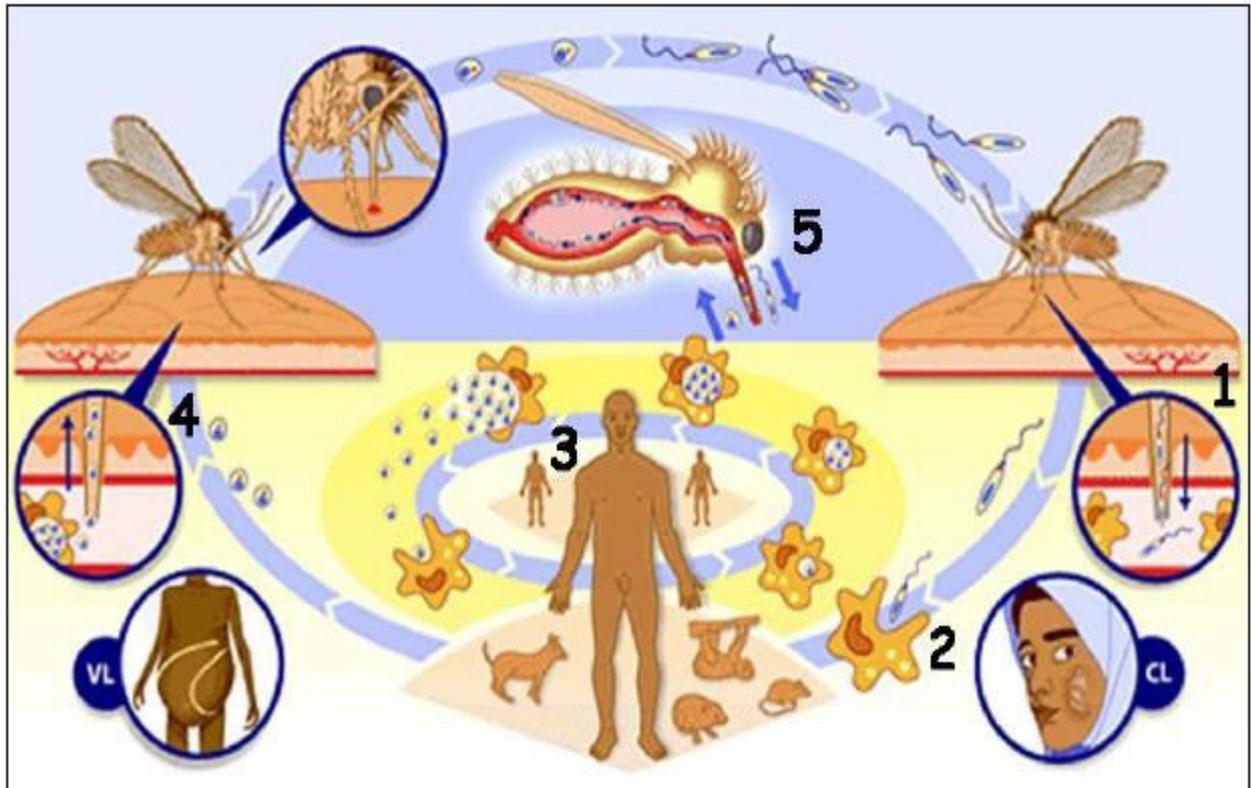


Figura 9. Ciclo Biológico de *Leishmania* sp.

Fuente: Rey, 2008

Estos protozoarios son unicelulares, digenéticos, su ciclo vital incluye dos hospederos; el insecto vector hematófago hembra y un vertebrado que puede incluir mamíferos silvestres o domésticos (canes, roedores, marsupiales, murciélagos) y el humano. (1) El vector regurgita los promastigotes metacíclicos (forma infectiva) presente en la probóscide sobre el hospedero mamífero al alimentarse de su sangre. (2) Estos son fagocitados por los macrófagos u otro tipo de células fagocíticas mononucleares y habitan en la vacuola parasitófora de las células. (3) En este sitio pierden su flagelo y se transforman en amastigotes, donde sufren cambios bioquímicos, moleculares y morfológicos para resistir a la acción de enzimas hidrolíticas, peróxidos (H_2O_2), superóxidos (O_2^-) de la vacuola fagocitaria y garantizar su replicación por fisión binaria. (4) Los amastigotes son liberados de la célula hospedera e infectan otras células contiguas (5).

Cuando el vector hembra se alimenta de la sangre de un hospedero infectado, toma células infectadas que llegan hasta el intestino (el cual dependiendo de la ubicación en que se desarrolla permite la clasificación de dos subgéneros, *Leishmania Viannia*, si se ubica en el intestino posterior y *Leishmania (Leishmania)* si se ubica en el intestino medio , finalmente los amastigotes se transforman en promastigotes procíclicos (forma flagelada) y sufren una serie de modificaciones morfológicas que llevan a la forma infectiva denominada metacíclicas migrando a la probóscide hasta la próxima infección (Figura 9) (Rey, 2008).

2.1.5.2. Vector

El vector de la Leishmaniasis en América son dípteros de la familia Psychodidae, popularmente conocidos como “manta blanca” o “titira”, son pilosos de color marrón claro, de las 300 especies descritas en América, alrededor de 32 están implicadas en transmisión de *Leishmania* (MINSA. Boletín epidemiológico del Perú, 2017), en América el género de importancia es *Lutzomyia*, vector de Leishmaniasis (Thies *et al.*, 2013). Su hábitat es de lugares húmedos, oscuros de abundante vegetación y algunos son peri domésticos. Las *Lutzomyias* son hematófagos, por lo que la sangre es fuente de proteínas y aminoácidos para desarrollo de sus huevos, su distribución está limitada a lugares donde la temperatura media es superior a 20°C, garantizando buen desarrollo de las larvas y actividades de los adultos (Mestre *et al.*, 2011).

2.1.6. Tratamiento de Leishmaniasis

El esquema de tratamiento sistémico actual para todas las formas de Leishmaniasis humana, se basa en el uso de antimoniales pentavalentes como el Estibogluconato de sodio (Sb^V), recomendado por la OMS como medicamento de primera línea debido a su rápida depuración renal y baja acumulación en tejidos, como segunda opción se utiliza la Anfotericina B (Amb), Pentamidina y Miltefosina. El tratamiento mediante antimoniales es parenteral, emplea dosis de 20mg/kg de peso por 20-30 días dependiendo de la manifestación clínica (Almeida y Santos, 2011), sin embargo entre los inconvenientes

de su uso están el tiempo de duración del tratamiento, la administración parenteral y su toxicidad con efectos colaterales entre ellos náuseas, vómitos, mialgias, efectos nefrotóxicos, además de no poderse suministrar a mujeres embarazadas, ni en pacientes con arritmias cardíacas o enfermedad de Chagas (Murray, 2012).

La búsqueda de tratamientos alternativos son motivo de estudios en base a un bajo costo, alta tolerabilidad y baja tasa de complicaciones, entre ellos los tratamientos localizados, como el uso de cremas, ungentos e inyecciones en el sitio de la lesión. El uso de cremas como la paramomicina e Imiquimod (Actividad Inmunomoduladora), que es recomendado durante las dos primeras semanas del tratamiento ya que después hay reactivación de la lesión (Seeberger *et al.*, 2003). Entre los tratamientos físicos tenemos la crioterapia con nitrógeno líquido que se aplica sobre las lesiones cutáneas por 20-30 segundos (Layegh *et al.*, 2009) y la termoterapia que mediante láser infrarrojo, se aplica sobre las lesiones, incrementando la temperatura hasta los 55°C por 5 minutos, obteniendo una curación de vesículas cutáneas en la zona de tratamiento (Blum *et al.*, 2004), ambas opciones pueden utilizarse solas o en combinación con otros medicamentos sin embargo se necesita profundizar en el tratamiento de *Leishmania*.

Asimismo, durante los últimos 10 años se vienen realizando ensayos con la Terapia Fotodinámica (TFD) como tratamiento contra la Leishmaniasis con distintos fotosensibilizadores, de ellos se han obtenido resultados prometedores en la reducción parasitaria con favorables resultados cosméticos (Escobar *et al.*, 2006, Dutta *et al.*, 2008, Peloit *et al.*, 2011).

2.1.7. Tratamiento Fotodinámico (TFD)

2.1.7.1. Generalidades

Este procedimiento inició en el año 1900 cuando describieron la foto inhibición de microorganismos (*Paramecium*) empleando concentraciones de tintes de acridina (Raab, 1900) y posteriormente fue evaluado sobre muchas formas de cáncer, vitiligo, psoriasis, herpes, inactivación de virus, bacterias, hongos, levaduras y otras infecciones

locales (Jori,y Brown 2004; Fu *et al.*, 2013), logrando una reducción de la morbilidad y con un mejor efecto estético (Sohl *et al.*, 2007). Aunque el mecanismo de acción del TFD no es completamente entendible, se sabe que requiere de un fotosensibilizador (FS), luz y oxígeno molecular que produce una reacción fotoquímica, causando la destrucción selectiva del tejido irradiado por medio de especies reactivas de Oxígeno (ERO). Cada componente posee sus propias características entre ellas la de mayor importancia es el fotosensibilizador, de pureza química o natural, con una absorción de la luz entre los 600 a 850 nm, de baja o nula toxicidad en condiciones oscuras, de rápida acumulación en la célula blanco y rápida excreción del organismo (Aureliano *et al.*, 2014). La TFD se da por la capacidad que tiene el FS de excitarse en presencia de luz a una longitud de onda específica, que al interactuar con el Oxígeno molecular produce especies reactivas de Oxígeno (ERO), este proceso se debe a que el FS al absorber el fotón de luz, sus electrones pasan de un estado basal (electrones apareados) a un estado excitado inestable (singulete) (Figura 10), allí el FS puede realizar interacciones intersistemas que le permite pasar a un estado triplete cuya vida media es de 10^{-3} segundos (Andreeva *et al.*, 2010) y llevar a cabo reacciones de tipo I o tipo II, donde en la primera involucra la transferencia de electrones o átomos de hidrógeno a moléculas orgánicas produciendo una forma radical del FS que al reaccionar con el oxígeno forma peróxido, iones superóxido y radicales hidroxilo. Mientras que por la reacción del tipo II: la energía se transfiere directamente del FS excitado al oxígeno en estado basal generando oxígeno singulete (3O_2) considerado como especie reactiva, es de considerar que el mecanismo II tiene un relevante efecto de foto-oxidación, mientras que el mecanismo I conlleva a la degradación del FS (Aureliano *et al.*, 2014).

Los radicales producidos tienen un tiempo de vida corto y su actividad destructiva se da cerca al área de producción (células que contienen el agente fotosensibilizador) siendo capaces de dañar moléculas subcelulares e inducir apoptosis o necrosis (Robertson *et al.*, 2009; Taylor *et al.*, 2011).

Aunque el mecanismo de acción del TFD no es entendible, el resultado de la terapia *in vitro* e *in vivo* es tanto del tipo apoptótico (iniciado por señales intra- extra celular por activación transcripcional de ciertos genes que genera descomposición de la célula y condensación de la cromatina) como necrótico (genera disrupción de la membrana celular, hinchazón osmótica y liberación de material intracelular) (Samanamú *et al.*, 2003). El proceso fisiológico de la TFD tiene como target (blanco), lisosomas, retículo endoplasmático, membranas plasmáticas y mitocondriales, este último importante en la apoptosis por liberación de factores apoptóticos como citocromo C, peroxidación de cardiolipina que involucran perturbación metabólica o integridad estructural y produce alteraciones físicas sobre las vías catabólicas y muerte celular (Tamietti *et al.*, 2007). El tipo de respuesta celular de la TFD depende de la estructura, solubilidad, localización intracelular del FS, cantidad de ERO producidas, células implicadas y la fluencia de irradiación que optimicen una mejor respuesta y dirija a procesos de apoptosis o necrosis (Taylor *et al.*, 2011).

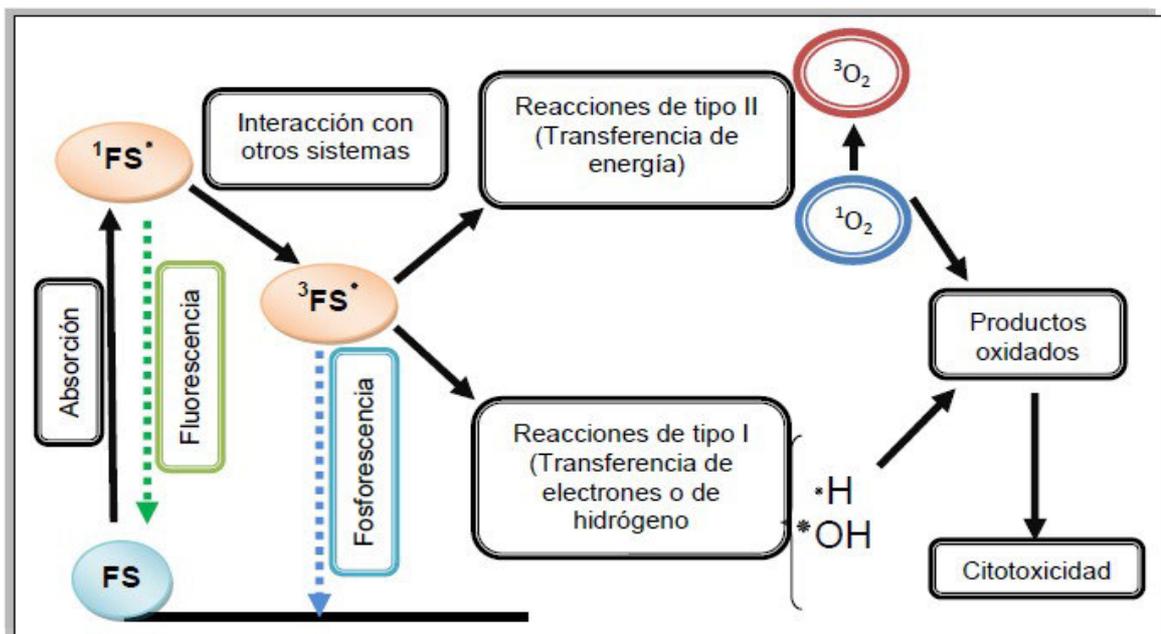


Figura 10. Modelo de producción de ERO en la TFD.

Fuente: Konan *et al.*, 2002

2.1.7.2. Fuentes de luz

La fuente de luz empleada para TFD pueden ser: Laser, lámparas de amplio espectro, dispositivos a base de diodo LED (Tomazini *et al.*, 2007). Los LED son fuente de luz monocromática de alta fluencia con una longitud de onda específica, la dosificación (J/cm^2) es ajustada a cada protocolo de acuerdo al espectro de absorción y emisión del FS utilizado, en el caso de las ftalocianinas su absorción máxima es de 600-900nm, permitiendo una mayor penetración del tejido (Samanamu *et al.*, 2003; Dai, *et al.*, 2010).

2.1.7.3. Fotosensibilizador (Fs)

Los FS son moléculas en su mayoría heterocíclicas, que pueden ser de origen natural (hipericina, Riboflavin) (Montoya *et al.*, 2015) o químicamente sintetizadas (Ácido aminolevulinico) (Akilov *et al.*, 2007). Los fotosensibilizadores pueden ser distribuidos en tres familias, porfirinas (p.e.PpIX), clorofila (p.e. clorinas, purpurinas) y colorantes (Ftalocianinas) (Dai *et al.*, 2010), como se muestra en la Tabla 1.

Tabla 1. Clasificación por familias de agentes fotosensibilizadores

Familia	Nombre	Presentación comercial	Utilización y uso común	Dosimetría, Propiedades Fotoquímicas y foto físicas
Porfirinas	Hematoporfirina y derivados	Fotofrin R Fotosan R Fotocan R	Diferentes tipos de tumores.	2mg/Kg a 150 J/cm ²
	Prodroga ALA	Levulan R	Tumores y Lesiones cutáneas.	20% ALA a 150 J/cm ²
	Benzoporfirina	Visudine R	Trastornos neurovasculares, degeneración macular, coriorretinopatias y lesiones cutáneas.	Aplicaciones sencillas de una inyección de 6mg/kg a 100 J/cm ²
	Texafirinas	Antrin R Lutex o Optrin	Algunas formas de cáncer, enfermedades oculares, coronaria y placa ateromatosa	Soluble en agua, se activa aproximadamente a 730 nm.
Clorinas	Temoporfinas	Foscan R	Diferentes tipos de tumores	0.15 mg/Kg a 660 nm.
	Purpurinas	Purlitina R	Cáncer de células escamosas y sarcoma de Kaposi	Activa a 660 nm.
	El mono-L-aspartil- Clorina o NPe6	-----	Lesiones del tipo oftálmico	2.5 y 3.5 mg/kg a 100J/cm ² o 664 nm.
	Talaporfina de sodio	Ls 11	Cáncer- Lesiones cutáneas	Amplio espectro de absorción (400-664 nm).
	Fotoclorina	Fotoclo R	Tratamientos de tumores en perros y gatos y cáncer de esófago en humanos.	0.15mg/Kg con dosis de luz de 48 horas a 150 J/cm ² .
Ftalocianinas	Ftalocianinas de aluminio y zinc	Fotosens R	Lesiones cutáneas, tumores de cabeza y cuello.	Activa entre 650 – 850 nm y a 100 J/cm ²

AF, utilizados en estudios *in vitro* e *in vivo* para fototerapia en Leishmaniasis cutánea.

Actualmente las ftalocianinas (compuestos coloreados), pertenecen a la segunda generación de fotosensibilizadores, dada su estructura macrocíclica, posee una alta coefición de extinción molar y una alta absorción en el espectro rojo (640-710 nm), que al incorporar un metal diamagnético como Zn o Al, genera un mayor tiempo de vida del estado triplete, buena penetración, rápida acumulación y excreción por el tejido, minimizando efectos de fotosensibilidad prolongada. Mientras que ftalocianinas sin centro metálico o con metales paramagnéticos como Cu y Fe, tienen un menor tiempo de vida del estado triplete y con ello menor grado de foto toxicidad, su estabilidad térmica y química de baja toxicidad, los convierten en candidatos para TFD, siendo empleadas tanto de naturaleza hidrofílica e hidrofóbica (Samanamu *et al.*, 2003, Moraima *et al.*, 2008, Oliveira *et al.*, 2015).

Su espectro de absorción consiste por la presencia de dos bandas (Figura 11), una en la región visible llamada banda Q, comprendida entre (600 nm – 700nm) y una banda débil en la región UV denominada banda B entre (300nm – 400nm). Ambas están asociadas a las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$ debido a los 18 electrones π conjugados de la estructura (Dai *et al.*, 2010).

2.1.7.4. Ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada

Ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada (AIPcClS₄) (Figura 12) posee un alto número de isómeros que varían en el grado de sulfonación, donde al aumentar el grado de sulfonación aumenta su hidrofílicidad, característica que incrementa su solubilidad facilitando la administración endovenosa en animales y de producir poca foto sensibilidad en la piel (Chan *et al.*, 1990). Su efecto inicialmente fue medido en células neoplásicas, donde por análisis de fluorescencia y microscopía electrónica se demostró que la TFD con AIPcClS₄ conlleva a una alteración a nivel de la membrana mitocondrial, causando pérdida del potencial y desintegración de la membrana por un incremento de la peroxidación lipídica (Tamietti *et al.*, 2007) asimismo, por microscopía confocal laser scanning se demostró que la localización intracelular de este FS se da en el citoplasma

y compartimentos lisosomales (Amin *et al.*, 2012).

Plaetzer *et al.*, 2012, evaluaron los cambios en la función mitocondrial y a nivel intracelular de ATP, a distintas dosis de radiación de AIPcClS₄ y demostró que el modo de muerte de la TFD con este compuesto es por apoptosis y necrosis que dependía de la radiación, donde a dosis de 2,5 – 3,5 J/cm², el 50% de las células murió por apoptosis y que a dosis mayores a 6 J/cm² todas las células murieron por necrosis, el mecanismo de apoptosis fue regulado por el incremento o mantenimiento del ATP mientras que una reducción de niveles de ATP fue indicador de un proceso necrótico.

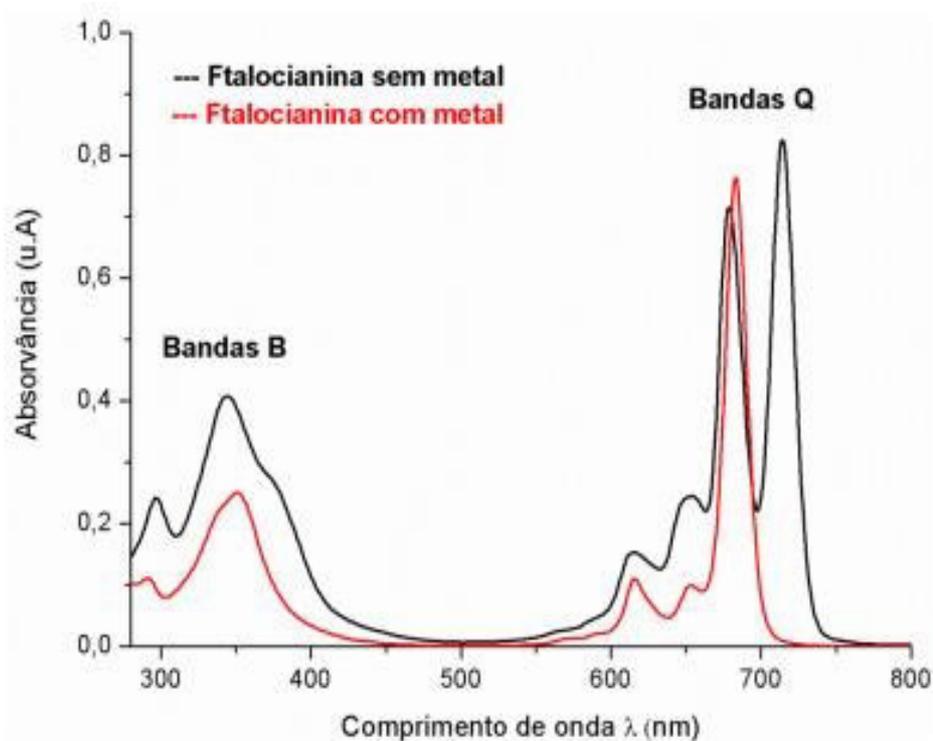


Figura 11. Espectros de Absorción en la región UV-Vis de derivados ftalocianínicos.

Fuente: Dai *et al.*, 2010

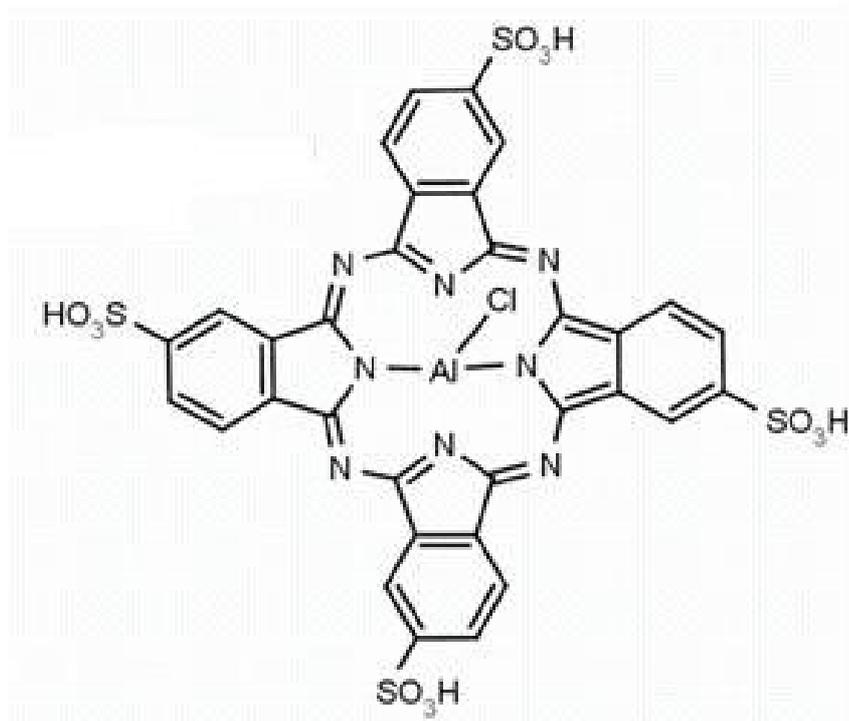


Figura 12. Estructura química de ftalocianina de Al (III) tetrasulfónico clorada (AlPcClS₄).

Fuente: Chang *et al.*, 1990

2.1.7.5. Terapia fotodinámica en *Leishmaniasis*

Estudios *in vitro* e *in vivo* con TFD para tratamiento de leishmaniasis cutánea, han evaluado la actividad de varios agentes fotosensibilizadores como el ácido delta aminolevulinico (ALA) (Dutta *et al.*, 2008), porfirinas (Morgenthaler *et al.*, 2008), ftalocianinas (Pinto *et al.*, 2011) de este último, mediante estudios *in vitro* evaluaron la TFD de ftalocianinas de diferentes simetrías moleculares entre ellas Zinc (ZnPc), aluminio (AlPc), tetrasulfonato (AlPcS₄) sobre promastigotes de diferentes especies de *Leishmania* como; *L. panamensis*, *L. chagasi*, *L. braziliensis* y *L. major*, donde la susceptibilidad y los grados de toxicidad dependen de la especie y la naturaleza bioquímica de la ftalocianina, debido a que el metal central juega un rol importante en la actividad biológica influenciando el tiempo de vida del estado excitado del triplete. En estos estudios el mejor resultado correspondió a un tratamiento de 10 µm y a 10 J/cm² de irradiación, llegando a presentar tasas de muerte del 90% del parásito; se consideró

que los factores que influyen en una reducción de los parásitos son la concentración del FS, el tiempo de aplicación, la estructura molecular y su carga, además la longitud de onda del láser (Pinto *et al.*, 2011). Asimismo, Escobar *et al.*, (2006), demostró que promastigotes de *L. chagasi* fueron susceptibles a la terapia fotodinámica *in vitro* utilizando ftalocianina de aluminio (AlPc) vs ftalocianina de zinc (ZnPc).

También se evaluó la exposición de ftalocianina (AlPhCl) frente a ambos estadios (amastigote, promastigote) de *L. amazonensis*, transfectados con una proteína fluorescente GFPs, en el que se observó por microscopía electrónica pérdida de fluorescencia, como indicador de la pérdida de integridad de la membrana y lisis celular después de la radiación. El amastigote intracelular fue menos susceptible que el promastigote bajo las mismas condiciones, lo cual indica que podría deberse a un mecanismo antioxidante que obtiene de la célula hospedera (Dutta *et al.*, 2008).

Asimismo, Akilov *et al.*, (2007), realizó estudios *in vivo* en ratones infectados con *L. major*, demostrando que el ácido delta aminovulínico (ALA) (precursor de PpIX), tiene alta efectividad sobre amastigotes, indicando que se necesita más de dos sesiones para eliminar el parásito ya que el FS no actúa de forma directa sino por medio de la muerte de la célula hospedera, los resultados del análisis histopatológico y del frotis confirmaron la eficacia *in vivo* del compuesto, con ligeras inflamaciones e irritaciones en la oreja post tratamiento.

En un posterior estudio de ratones infectados con *L. amazonensis*, se demostró que usando azul de metileno (MB) acoplado a luz como tratamiento fotodinámico, registró una reducción del tamaño de la lesión y de la carga parasitaria en los nódulos linfáticos sin efectos tóxicos asociados al tratamiento (Pelo *et al.*, 2011).

Fritsch *et al.*, (2003), iniciaron estudios pilotos del tratamiento fotodinámico en pacientes con lesiones cutáneas, consiguiendo una reducción del 67% del tamaño de la lesión y diagnóstico negativo post tratamiento para amastigote, sin efectos adversos y con un notable resultado estético. Posteriormente, en otro estudio se ha hecho comparaciones

entre la TFD con medicamentos actuales aceptado por la OMS tales como la paramomicina, antimonio pentavalente y otro tipo de tratamiento como crioterapia, indicando la ventaja del TFD de una rápida curación total y cicatrización de la lesión, muy superior frente a lesiones tratadas con los métodos convencionales (Asilian y Davami, 2006, Sohl *et al.*, 2007, Pizinger *et al.*, 2009).

Asi mismo, Enk *et al.*, 2015 mediante un estudio clínico, utilizando como FS, una solución al 16% de metil aminolaevulinato, y una administración del compuesto a una exposición de 2-5 horas de luz de día, consiguió una curación del 92% de los pacientes. Por lo que se enfoca el empleo de este tratamiento como una alternativa viable de fácil acceso a la población afectada, con la ventaja de actuar localmente y ser un procedimiento no invasivo.

3. OBJETIVOS E HIPÓTESIS

3.1. OBJETIVOS

3.1.1. Objetivo general

Evaluar la actividad fotodinámica de ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada (AlPcClS₄) sobre los estadios promastigote y amastigote de *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

3.1.2. Objetivos específicos

Obtener curva de crecimiento en medio líquido Schneider de promastigotes de *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*.

Evaluar la viabilidad *in vitro* del estadio promastigote frente al tratamiento fotodinámico de ftalocianina de aluminio tetrasulfonada clorada.

Detectar y cuantificar el ADN parasitario mediante PCR cuantitativo y estimar la carga parasitaria frente al tratamiento fotodinámico.

3.2. HIPÓTESIS

La Ftalocianina de aluminio, al ser irradiada con una lámpara LED ejerce actividad tóxica sobre promastigotes y amastigote de *Leishmania (Viannia) peruviana*, *Leishmania (Viannia) braziliensis* y *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

Se emplearon cepas de *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, pertenecientes al cepario del Laboratorio de Referencia Nacional de Leishmaniasis del CNSP del Instituto Nacional de Salud, previamente identificados mediante la secuencia del gen Citocromo B por el personal del laboratorio en mención según metodología de Foulet *et al.*, (2007).

Línea celular DH82, proporcionada por el Laboratorio de Cultivo Celular. Sede Biomedicina - Instituto Nacional de Salud.

4.2. MATERIAL QUÍMICO

Solución de Ftalocianina tetrasulfonada Clorada (AIPcClS₄), de la marca Frontier Scientific, suministrada por el Laboratorio de Química Orgánica de la Universidad Nacional Mayor de San Marcos (UNMSM).

4.3. LUGAR DE EJECUCIÓN

La fase experimental fue desarrollado en el Laboratorio de Leishmaniasis del Instituto Nacional de Salud.

4.4. MÉTODOLÓGÍA

4.4.1. OBTENCIÓN DE PARÁSITOS PROMASTIGOTES

Las cepas fueron reactivadas independientemente en medio Schneider suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (SBFi) (Figura13 A.B), inducidas por pH ácido (5,5) al estadio de promastigote metacíclico, formas que fueron aisladas por precipitación empleando lectina de mani. Los parásitos aislados fueron infectados en *Mesocricetus auratus*, para obtener formas parasitarias de mayor capacidad infectiva. Protocolo que se detalla en Anexo 1.

4.4.2. CURVA DE CRECIMIENTO

La curva de crecimiento en medio Schneider a pH 5,5 inició a una concentración de 5×10^5 parásitos/3mL, se incubó a 26⁰ C (etapa inicial o T₀), siguiendo la metodología de Gamboa *et al.*, (2008). El recuento de parásitos se efectuó durante los 10 días consecutivos utilizando Azul de trypan 0,4 %, como colorante de viabilidad en una cámara de Neubauer, el conteo se realizó por duplicado cada 12 horas. Se elaboró la curva de crecimiento de las tres cepas de *Leishmania* el cual se presentó en un gráfico el número de parásitos por mL vs días de cultivo.

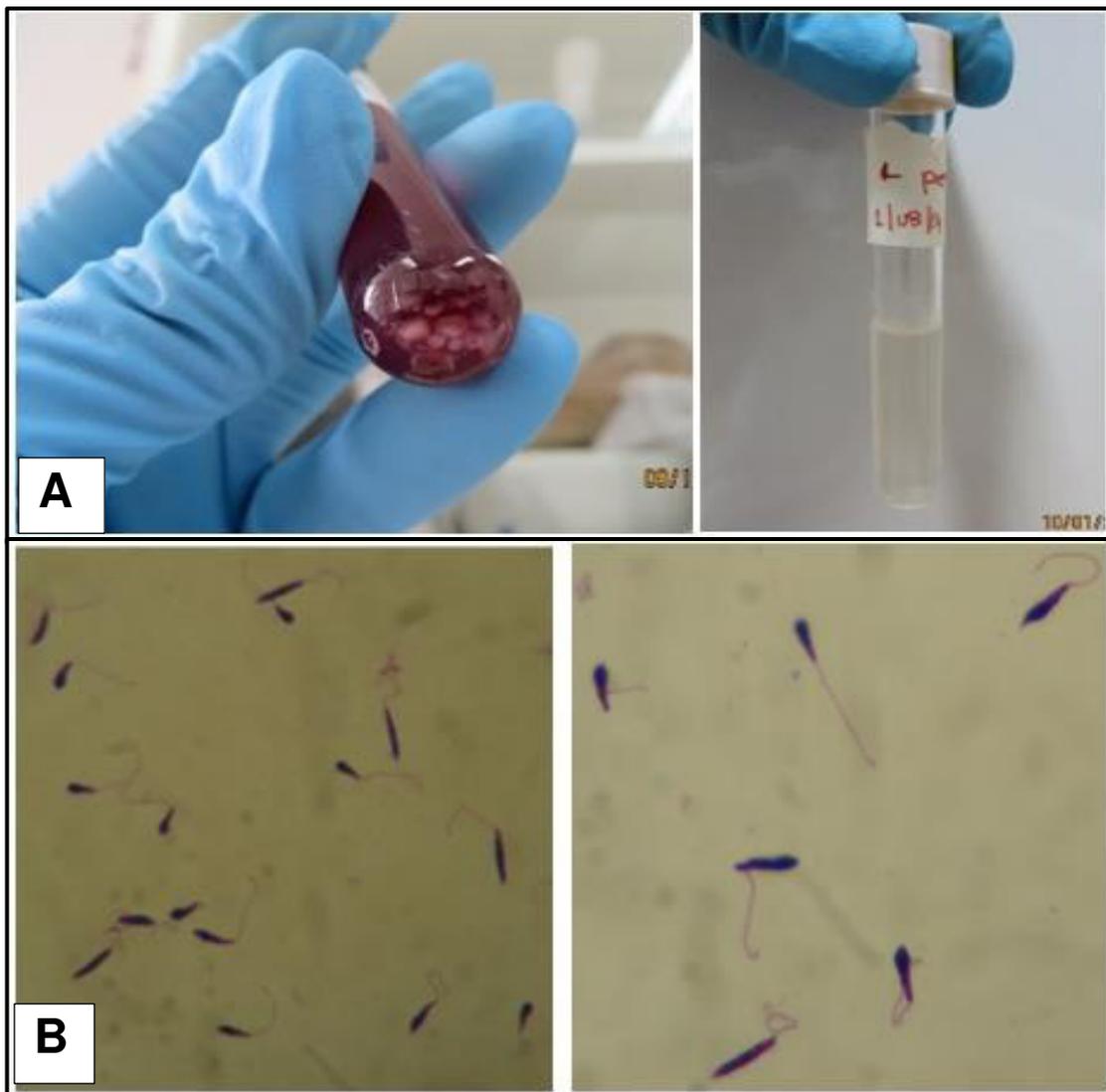


Figura 13. Cultivo de parásitos

13. A. Cultivo de parásitos en medio bifásico (izquierda) y cultivo de mantenimiento en medio schneider (derecha). **B.** Promástigotes metacíclicos observados al microscopio a 100 X.

4.4.3. PREPARACIÓN DE LA SOLUCIÓN STOCK DE FTALOCIANINAS

La Ftalocianina de aluminio tetrasulfonada Clorada ($AlPcClS_4$) fue disuelta en agua ultra pura a una concentración stock de $1000 \mu M$, con DMSO al 0,5% de concentración final, se mantuvo en refrigeración protegida de la luz. Posteriormente de la solución stock de ftalocianina se diluyó a las concentraciones de trabajo ($25, 50, 75, 100, 200, 350 \mu M$) con el medio Schneider (pH6,65-6,75), tomando como referencia el trabajo de (Amin *et al*, 2012). Como control positivo se utilizó Estibogluconato a concentraciones de $200 \mu M$

y 20000 μM . Ambas soluciones fueron mantenidas en refrigeración hasta el momento de su uso.

Sistema de Irradiación: Se utilizó como fuente de luz una lámpara diseñada por el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Química de la UNMSM, la lámpara dispone de focos LED colocados en serie, con emisión de 670 nm y una potencia de 30 $\text{J/s}\cdot\text{m}^2$. La distancia utilizada para los ensayos fue a 10 cm, por 30 minutos. Se acopló un sistema de ventilación para evitar calentamiento (Figura 14 A,B).

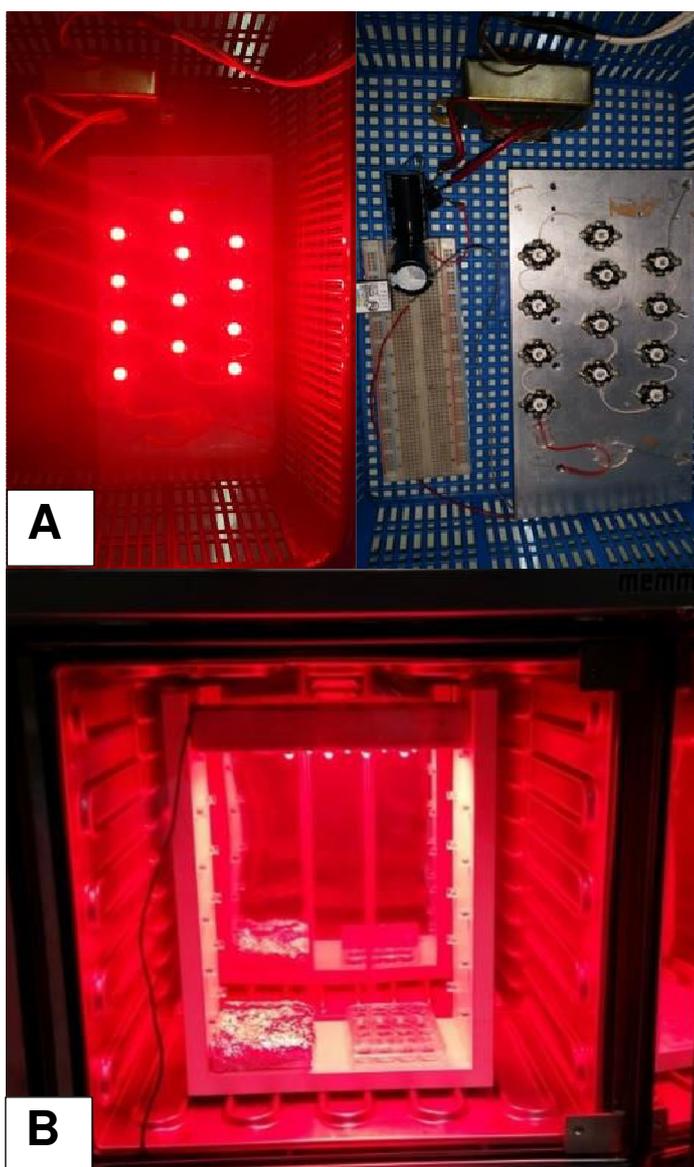


Figura 14. A. Lámpara con focos LED, B. Lámpara con el soporte

4.4.4. MANEJO DE LA LÍNEA CELULAR DH82

La Línea celular canino DH82, crece adherida a la superficie del frasco, en medio MEM (Medio Mínimo Esencial), suplementada con Suero Fetal Bovino al 15%. Su mantenimiento es por pasajes cada 72 horas, previo desprendimiento de las células utilizando Tripsina-EDTA 2,5%.

4.4.4.1. Actividad fototóxica del fotosensibilizador en la línea celular DH82

La línea celular DH82 a una concentración de 1×10^5 células fueron tratadas con concentraciones distintas de AIPcClS₄ (25, 50, 75, 100, 200, 350 μ M) disuelto en DMSO al 0,5% y Estibogluconato (200 y 20000 μ M). Las células controles fueron mantenidos sin compuesto. Las células tratadas fueron irradiadas por única vez a una distancia de 10 cm, por 30 minutos. Después de 24 horas se determinó la toxicidad del compuesto por el método colorimétrico MTT, se adicionó 20 μ l de sal tetrazolium (5mg/ml) a cada pozo y se incubó por 4 horas. Luego se adicionó 100 μ l de SDS 10% HCL 0,01N por pozo para diluir los cristales de formazán. Los cultivos *in vitro* fueron realizados por triplicado en dos oportunidades. La absorbancia fue determinada a 570 nm.

4.4.5. ACTIVIDAD FOTOTÓXICA DEL FOTOSENSIBILIZADOR EN PROMASTIGOTES

Promastigotes de las tres especies de *Leishmania* fueron colectadas de la fase exponencial de crecimiento a una concentración de 5×10^5 parásitos/mL y fueron tratados a concentraciones de 25, 50, 75, 100, 200, 350 μ M de AIPcClS₄ y Estibogluconato a la concentración de 100, 200, 20000 μ M. Como controles negativos se cultivaron parásitos en medio sin tratamiento. Después de 24 horas de incubación con el compuesto, los parásitos fueron irradiados por única vez a una distancia de 10 cm, e incubados por 24, 48, 72, 96 horas más (Figura 15).

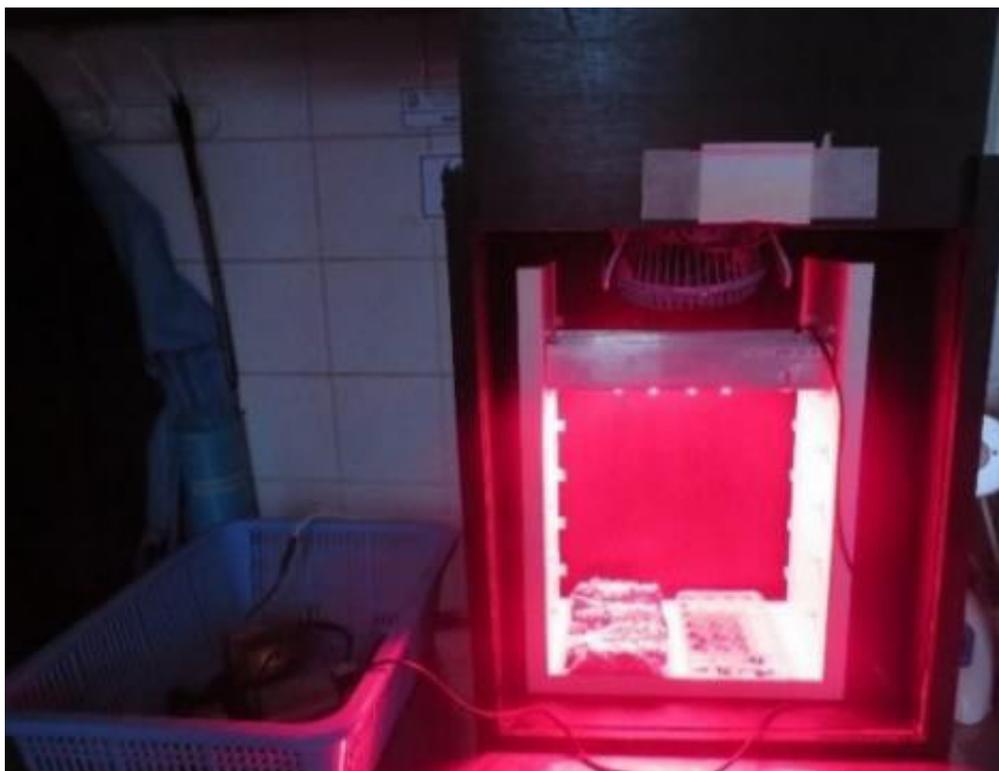


Figura 15. Radiación de las placas incubadas con el fotosensibilizador.

La actividad del compuesto en promastigotes no irradiados también fue evaluada. La toxicidad del compuesto fue determinado por el método colorimétrico MTT por metodología de Simioni *et al.*, (2012). Las placas se centrifugaron para retirar el sobrenadante y se agregó medio Schneider nuevo (450 μ l), se adicionó 50 μ l de MTT (5mg/ml), después de 6 horas de incubación se agregó SDS 10% HCL 0,01N para diluir los cristales de formazán y se leyó a una absorbancia de 570 nm (Figura 16).



Figura 16. Prueba Colorimétrica MTT

Ensayo colorimétrico usado para medir la viabilidad celular, por reducción de la sal tetrazolium en cristales de formazán dando el color púrpura.

4.4.6. ACTIVIDAD FOTÓXICA DEL FOTONSENSIBILIZADOR EN AMASTIGOTE INTRACELULAR

4.4.6.1. Infección

Se realizó el procedimiento descrito por Zauli *et al.*, (2010), para lo cual se preparó placas de 24 pocillos con cubreobjetos redondos en el fondo de estos, se añadió a cada pocillo 1×10^5 macrófagos, se incubó a 37°C y 5% CO₂ por 15 horas. Para la infección se usó promastigotes de la fase estacionaria de *Leishmania* obtenido entre el quinto y sexto día de cultivo, en una proporción parásitos – macrófagos de 20:1 en un volumen de 500 µl. Se incubó por 5 horas a 33°C y 5% CO₂, después se hizo tres lavados con medio de mantenimiento MEM al 2% SFB, para eliminar los parásitos no fagocitados.

4.4.6.2. Tratamiento

Se añadió el compuesto AlPcClS₄ (50, 75, 100, 200 µM) disuelto en DMSO al 0,5%

(concentración no tóxica para la célula) y Estibogluconato a 200 μ M como control de referencia. Se incubó por 24 horas, luego se irradió con una lámpara LED de 675 nm y se dejó en evaluación durante 72 horas post irradiación. Cada concentración del compuesto o control se realizó por triplicado en dos oportunidades.

4.4.6.3. Alteraciones morfológicas

Después de la TFD, los promastigotes fueron lavados con PBS a 8000 rpm por 5 minutos, se diluyó y fijó con formalina en láminas. Se realizó lavados continuos de las laminillas de células DH82 infectadas con promastigotes y se dejó secar a temperatura ambiente. Para ambos casos se fijó con metanol y se coloreó con Giemsa por 20 minutos. Finalmente las laminillas se adhirieron sobre una lámina porta objeto, utilizando el medio de montaje bálsamo de Canadá y se observaron al microscopio a 1000 aumentos. Se realizó registro fotográfico de 5 campos por condición evaluada.

4.4.6.4. Determinación de carga parasitaria por PCR cuantitativo

Se colectó la muestra de los pocillos de la placa post tratamiento, se hizo dos lavados con PBS, para retirar remanente de medio, se agregó 100 μ l de tripsina - EDTA en las laminillas, por 10 minutos para desprender las células, luego se adicionó 100 μ l de PBS 1X, se retiró la suspensión de células y se puso en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL, para su posterior extracción de ADN.

4.4.6.5 Extracción de ADN

La extracción de ADN, se realizó con el kit de invitrogen, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se eluyó en un volumen final de 60 μ L.

4.4.6.6. PCR cuantitativo (qPCR)

Para detectar y evaluar la carga parasitaria de *L.(V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis*, *L.(L.) amazonensis*, de cultivo de macrófagos infectados con promastigotes del parásito, se empleó la técnica qPCR, basado en la amplificación del gen ribosomal SSU RNA, gen específico para el género de *Leishmania*, siguiendo la metodología de Gomes *et al.*, (2012). Para la amplificación del producto esperado de 67 pb, se emplearon los

oligonucleótidos y sonda que se detalla a continuación:

Oligonucleótidos:

Forward Leish. U1-AAGTGCTTTCCCATCGCAACT.

Reverse Leish. L1 – GACGCACTAAACCCCTCCAA.

Sonda

LEIS.P1 (FAM 5' CGGTTCCGGTGTGTGGCGCC-3' TAMRA).

Condiciones: Se utilizó el Mix de Kapa Probe Fast Qpcr Kit, que incluye la polimerasa, solución tampón, los nucleótidos trifosfato y cloruro de magnesio. Las condiciones en la preparación del mix fueron las siguientes.

Tabla 2. Preparación del Master Mix

Componente	Concentración inicial	Concentración final	Reacción
Master Mix	1X	-----	10 µl
Forward	10 Mm	0,2 µM	0,4 µl
Reverse	10 Mm	0,2 µM	0,4 µl
Sonda	10 Mm	0,2 µM	0.08 µl
ADN			5 µl
DdH2			4,12 µl
Volumen final			20 µl

Tabla 3. Condiciones de amplificación del gen ribosomal SSU RNA

Ciclaje de PCR	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Activación de enzima	95°C	00:30	1
Reacción de PCR			
Denaturación	95°C	00:30	40 ciclos
Hibridación/Extensión	60°C	00:30	

La intensidad de fluorescencia de cada muestra es proporcional a la cantidad de ADN presente expresado en valor del ciclo umbral CT (número de ciclos de PCR requeridos para que la señal de fluorescencia exceda el umbral de detección). La detección y amplificación se logró empleando el equipo Rotor gene.

4.4.6.7. Curva de calibración

La curva estándar fue realizada con diluciones seriadas de ADN de *Leishmania*. El stock de ADN de *L. (V.) braziliensis* fue el equivalente a la concentración 5×10^6 parásitos/µl,

asegurando que la extracción fue 100% eficiente (120 parásitos tienen 10 pg de ADN). Se realizó 8 diluciones del stock de ADN que abarca de 0,1 – 10⁶ parásitos, por cada punto se consideró dos réplicas (Sudarshan *et al.*, 2011) (Figura 17). Esta curva ofrece un coeficiente de determinación de 0,99970 y una eficiencia del 1,0 (Figura 18). Se interpolaron los valores de CT de cada muestra tratada con las diluciones seriadas conocidas de ADN.

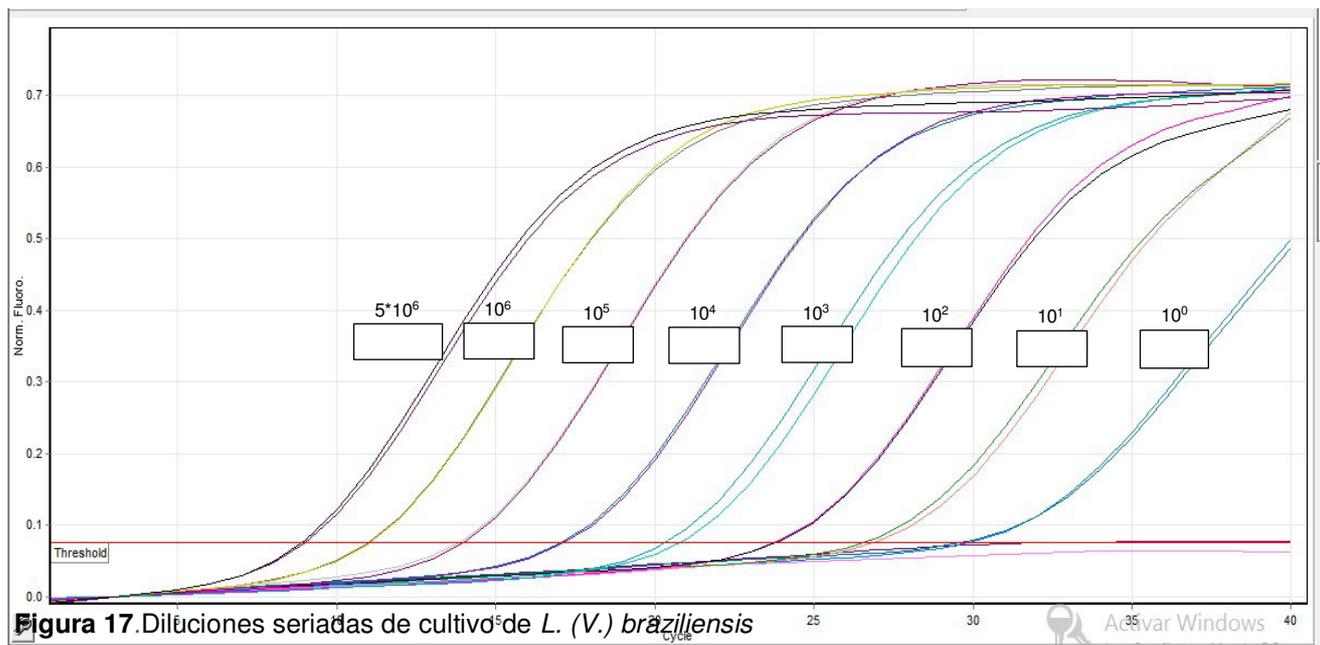


Figura 17. Diluciones seriadas de cultivo de *L. (V.) braziliensis*

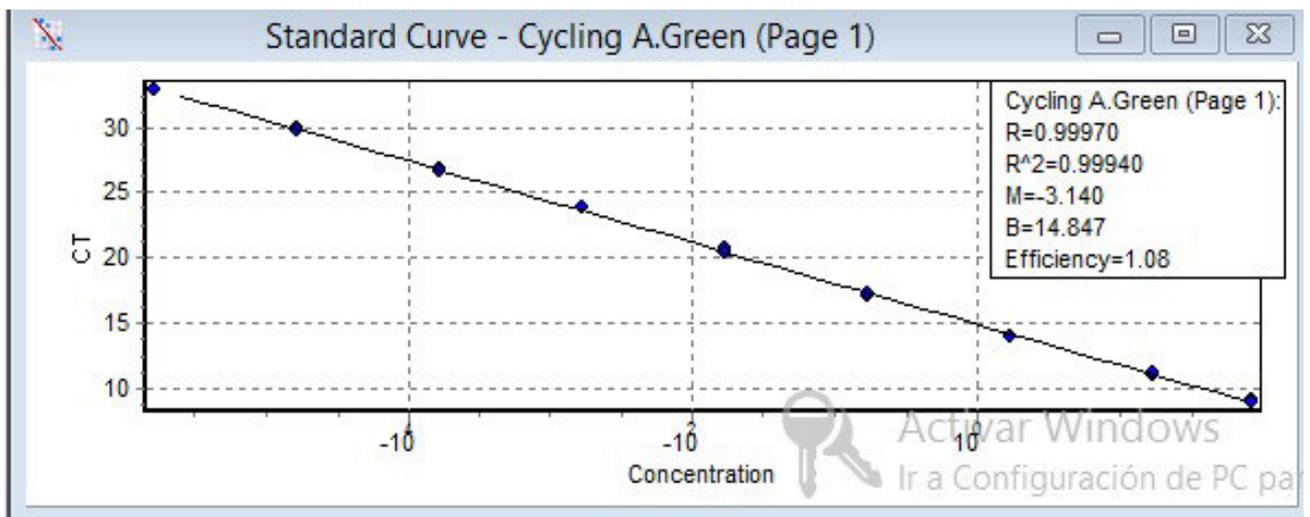


Figura 18. Curva estándar

Curva estándar con un coeficiente de determinación de 0,99970, R²: 0,99940 y una eficiencia del 1,08.

4.5. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Esta investigación es de tipo experimental, se determinó la media y desviación estándar de los resultados mediante el programa Microsoft Excel versión 2010. La actividad del compuesto frente a los promastigotes y a la línea celular, fueron expresados como la concentración capaz de inhibir el 50% de parásitos (IC_{50}), obtenido con el paquete Graph Pad Prism 6. El índice de selectividad (IS) se determinó como la Relación entre la actividad del compuesto en las células DH82 (CC_{50}) y actividad del compuesto en promastigotes (IC_{50}).

El efecto de la luz se evaluó por Anova Unifactorial a un intervalo de confianza del 95%, se evaluó la actividad de la TFD- AIPcCIS₄ sobre promastigotes mediante un modelo factorial con las variables tratamiento y horas. Previamente se analizó la normalidad por el test de Shapiro y la homogeneidad de varianzas por Levene, seguido del test de Tukey para discriminar por pares entre las medias de los tratamientos y al encontrarse interacción entre tratamientos y horas se aplicó la prueba LSD ($\alpha=5\%$).

La actividad de la TFD- AIPcCIS₄ en amastigote intracelular al no cumplir distribución normal ni homogeneidad de varianza, se realizó prueba de Kruskal Wallis de comparaciones múltiples para comparar medianas entre los grupos tratados y de aquellas con diferencia significativa se aplicó el test de Dunn para determinar el mayor o menor efecto.

5. RESULTADOS

5.1. OBTENCIÓN DE PROMASTIGOTES DE *LEISHMANIA* EN EL CULTIVO A pH 5.5

Los parásitos de *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, conservados en criopreservación fueron reactivados en medio Schneider suplementado con SFB al 10% y antibióticos, posteriormente estos parásitos fueron repicados en medio Schneider pH 5,5 con la finalidad de obtener una mayor concentración de parásitos metacíclicos. Se colectó la fase estacionaria que consistió de un cultivo heterogéneo de promastigotes procíclicos y promastigotes metacíclicos (con un flagelo 2 o 3 veces mayor al soma), obteniéndose un 46 %, 73 %, 69 % de promastigotes metacíclicos para *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*, respectivamente (Figura 19A – 19B).

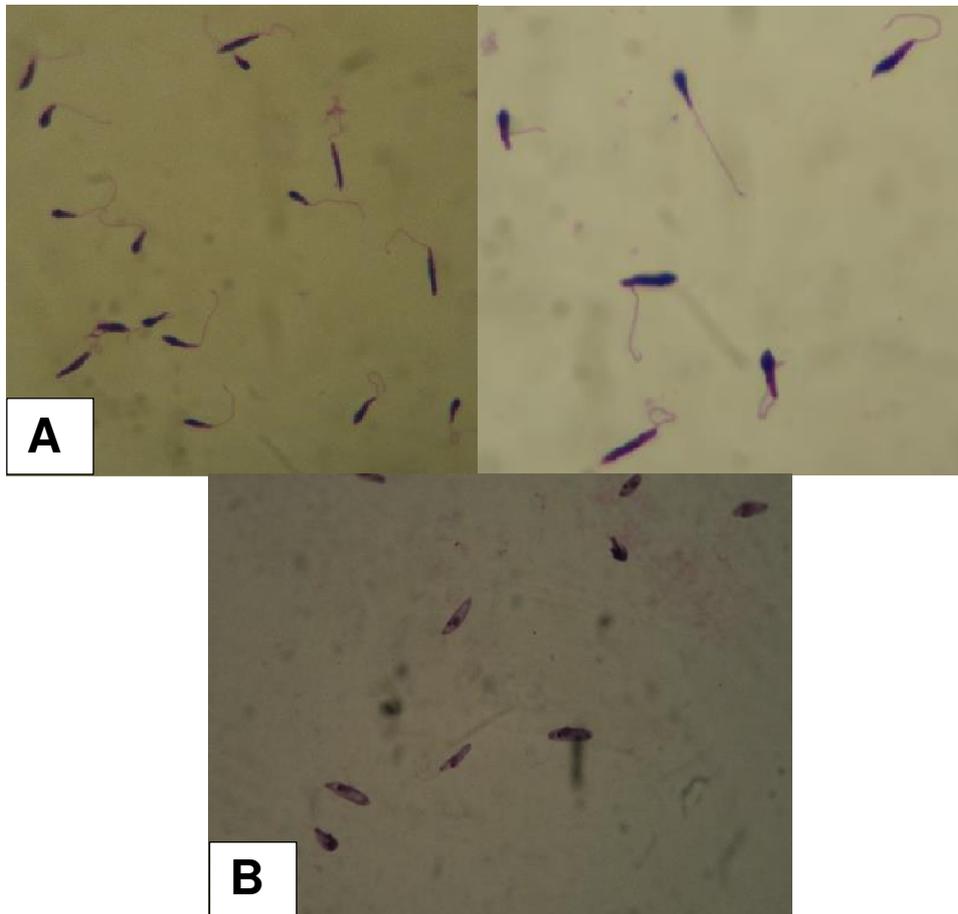


Figura 19.A. Promastigotes metacíclicos, B. Promastigotes procíclicos

5.2. CURVA DE CRECIMIENTO DE CEPAS DE *LEISHMANIA*

Se determinó la curva de crecimiento a un pH de 5,5 para las tres especies *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*, los resultados de la curva se presentaron como logaritmo de parásitos viables/mL vs número de días (Figura 20).

Leishmania (V.) peruviana alcanzó la fase estacionaria entre el 7- 8 día, mientras que *L.(V.) braziliensis* y *L.(L.) amazonensis* lograron esta fase entre el día 4-5, las concentraciones parasitarias alcanzadas fueron de 9×10^6 , $7,2 \times 10^7$, 13×10^7 , respectivamente. *L.(L.) amazonensis* y *L.(V.) braziliensis* son las especies que presentaron mejor adaptabilidad al cambio de pH, frente a *L. (V.) peruviana*.

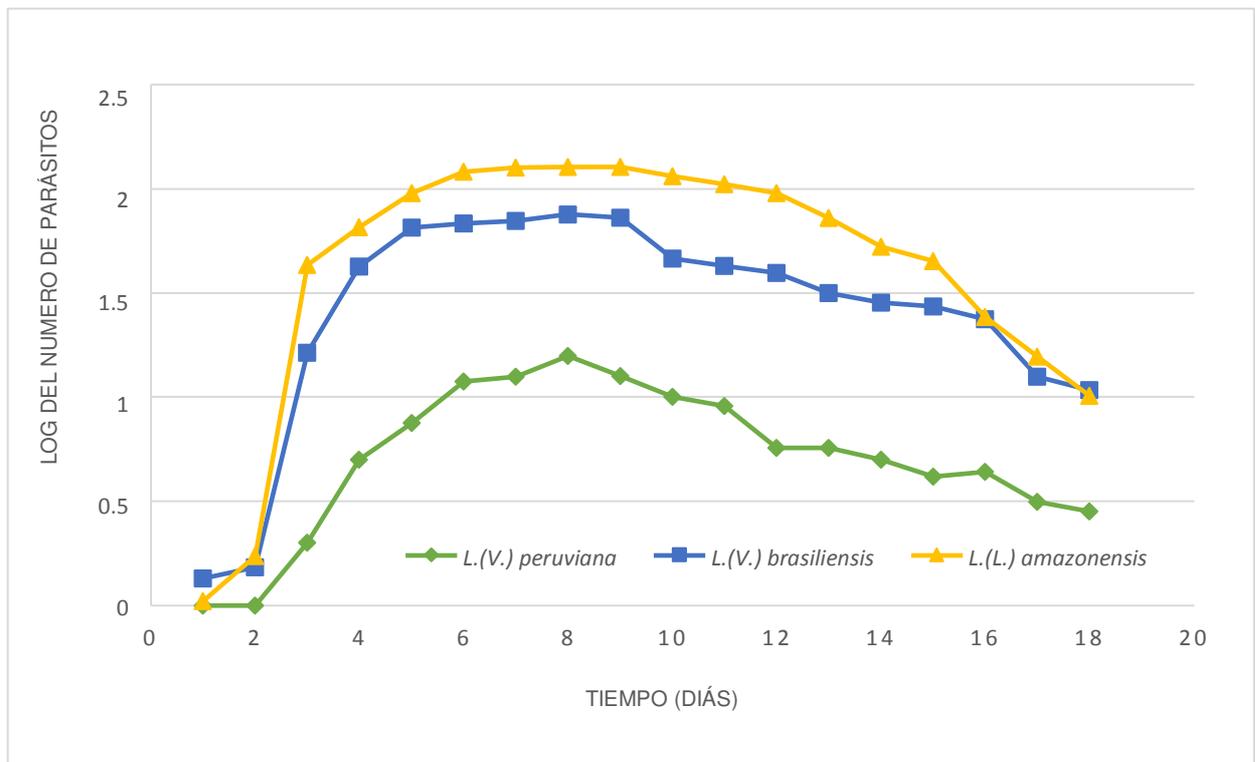


Figura 20. Curva de crecimiento de *Leishmania (V.) peruviana*, *L.(V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*. Recuento cada 12 horas por 10 días.

Tabla 4. Concentración de *L.(V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis*, *L.(L.) amazonensis* por días.

	<i>L. (V.) peruviana</i> (días)	Concentración	<i>L. (V.) braziliensis</i> (días)	Concentración	<i>L.(L.) amazonensis</i> (días)	Concentración
Inicio	0	$0,5 \times 10^5$	0	$0,5 \times 10^5$	0	$0,5 \times 10^5$
Fase adaptación	1- 2	$0,6 \times 10^5$	1-2	$0,7 \times 10^5$	1	$0,9 \times 10^5$
Fase exponencial	3 - 7	8×10^5 – 5×10^6	3 - 4	1×10^6 – 6×10^7	3 - 4	1×10^6 – 10×10^7
Fase estacionaria	8 -11	9×10^6	5 - 9	$7,2 \times 10^7$	5 -10	13×10^7

5.3. EVALUACIÓN DEL ESPECTRO DE ABSORCIÓN DEL FOTOSENSIBILIZADOR

La solución de AIPcClS₄ de coloración verde presentó picos máximos de absorción de aproximadamente 675 nm (Figura 21). El FS conservó su estado monomérico en las bandas Q característica de la región roja y no hubo alteraciones del patrón de absorción al compararse con AIPcClS₄ en Schneider. Se observó una disminución de la absorbancia de los picos correspondientes al clorofenol (Aprox. 227 nm) a medida que

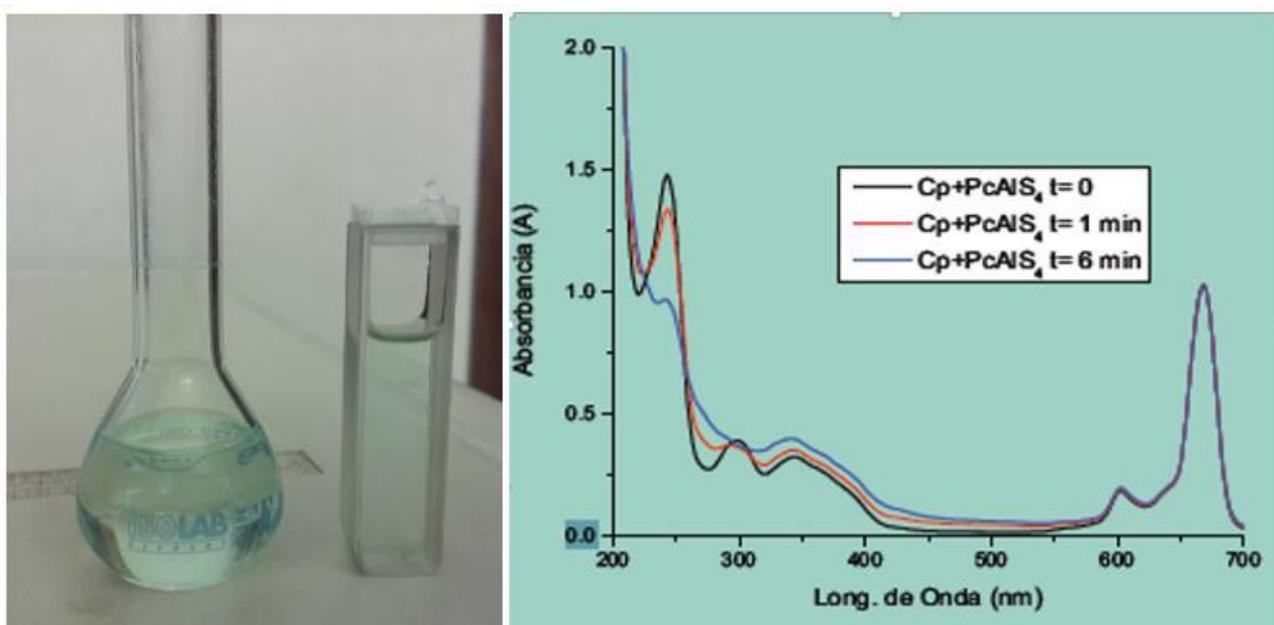


Figura 21. Solución de Ftalocianina AIPcClS₄, medición de su espectro de absorción, pico absorción de 675nm

avanza el tiempo de la reacción (producto de la descomposición del clorofenol por reacción con el oxígeno singlete fotogenerado), mientras que el pico característico de la AIPcClS₄, se mantiene constante en el tiempo.

5.4. CONFIRMACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE OXIGENO SINGULETE CON 4-CLOROFENOL

Para la detección de oxígeno singlete se empleó el atrapante químico 4- clorofenol, donde la descomposición de este es inversamente proporcional a la producción de oxígeno singlete, el medio de cultivo Schneider no alteró la generación de oxígeno singlete. A 10 y 15 cm de irradiación del AIPcClS₄, se produjo un 76,4 y 76,23 % de conversión del 4-clorofenol en 420 segundos de iluminación, mientras que concentraciones altas (1×10^{-5} M y 2×10^{-5} M) de AIPcClS₄ producen un 78,41 y 86,22% de conversión del clorofenol respectivamente (Figura 22).

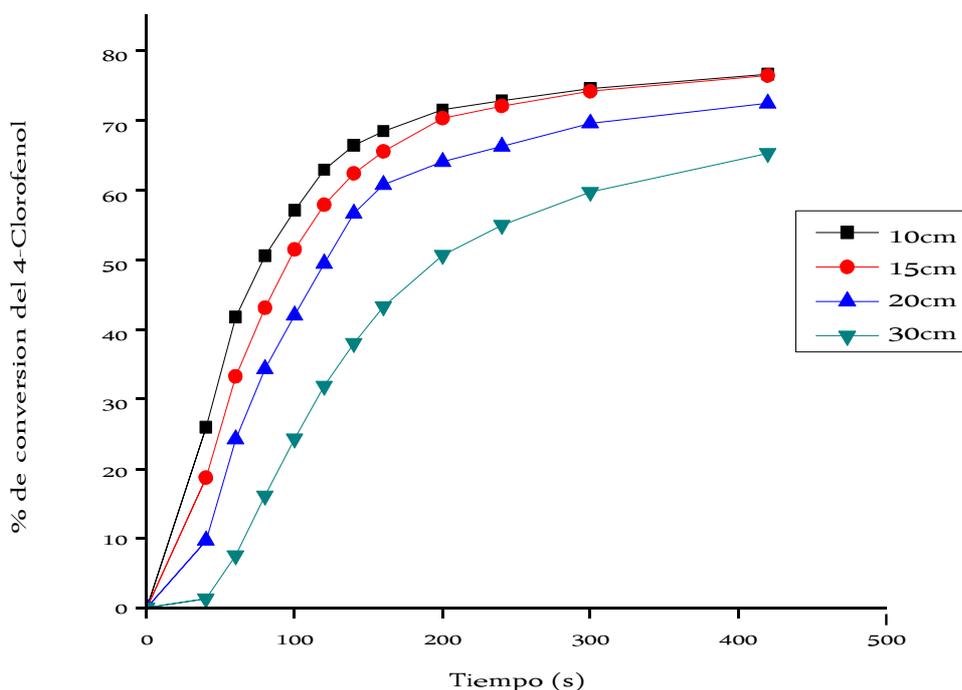


Figura 22. A. Porcentaje de conversión del Clorofenol en la reacción a diferentes distancias de iluminación. B. Porcentaje de conversión del Clorofenol en la reacción a diferentes distancias de iluminación.

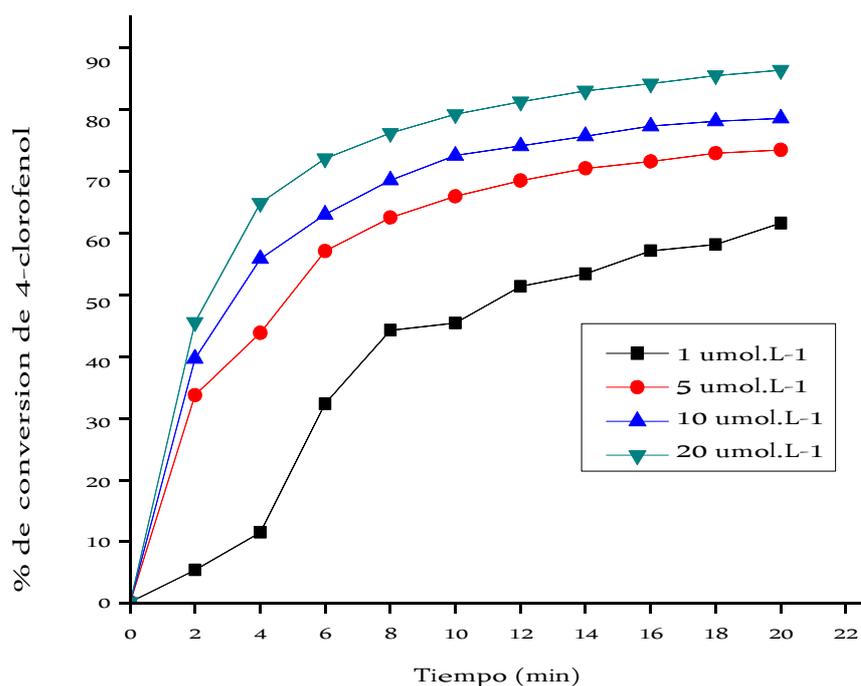


Figura 22.B Porcentaje de conversión del clorofenol en la reacción a diferentes concentraciones de AIPcClS₄

5.5. ACTIVIDAD *IN VITRO* DE AIPcClS₄

5.5.1. Toxicidad celular

El TFD - AIPcClS₄ sobre la célula DH82, a una concentración de 200 μM, genera 48% de muerte celular, presentando un IC₅₀ de 243,18 μM ± 3,18, mientras que el tratamiento sin luz no mostró variación con respecto al control de crecimiento, por lo cual no se pudo determinar el IC₅₀. El Estibogluconato actúa de manera independiente con luz o sin luz y a una concentración de 2 x10⁴ μM, generó un 96% de muerte celular muy similar al control de inhibición (Tritón 0,01%) (Figura 23).

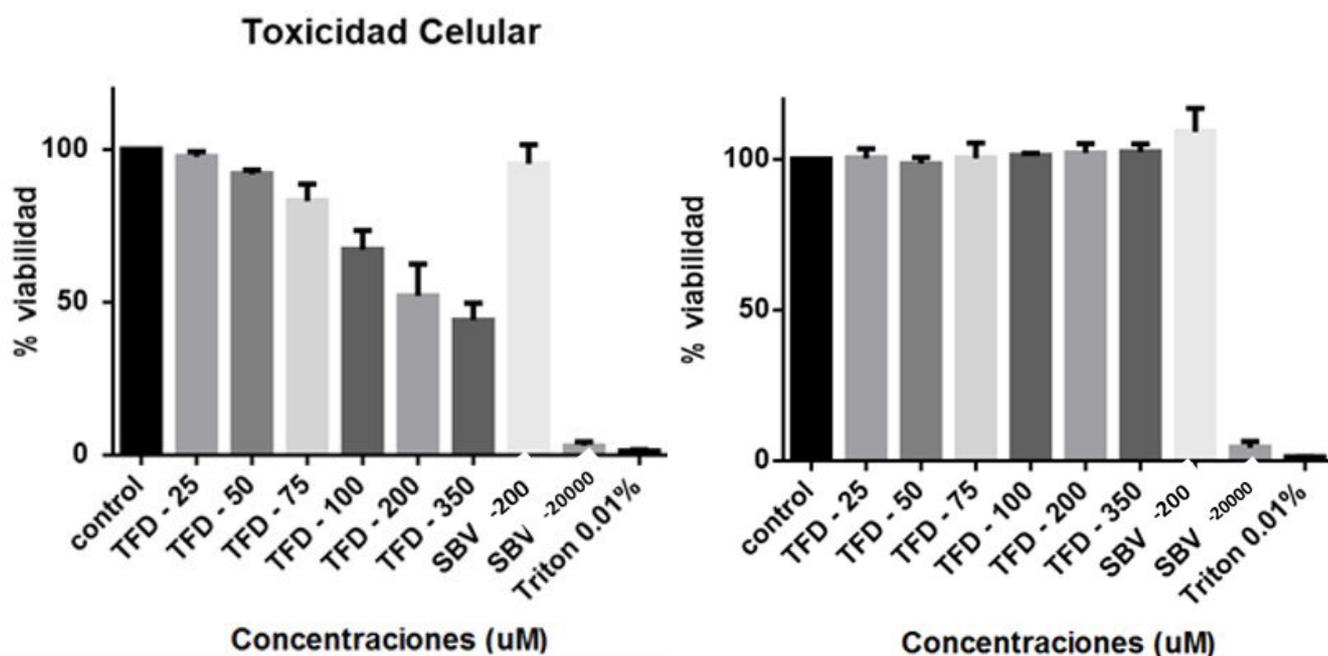


Figura 23. Porcentaje de viabilidad de la línea celular DH82, frente al tratamiento con AIPcCIS4 Con luz (Grafico izquierda), sin luz (Gráfico derecha), comparación entre medias y error estándar.

5.5.2. Evaluación de la TFD en promastigotes de *Leishmania (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*

El efecto tóxico sobre promastigotes fue evaluada y cuantificada en densidad óptica por espectrofotometría mediante el ensayo colorimétrico MTT, los valores obtenidos son proporcional al número de parásitos viables. El tratamiento con TFD - AIPcCIS₄, después de irradiar a una potencia de 30 J/s*m² fue tóxico para el promastigotes de *Leishmania* con actividades de IC50 de 75,4 µm ± 3,18; 175,2 µm ± 2,36; 211,1 µm ± 2,50 para *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.)amazonensis* respectivamente, 24 horas post radiación, mientras que el tratamiento sin luz no mostró variación con respecto al control de crecimiento, por lo cual no se pudo determinar el IC50 la actividad del Estibogluconato es independiente de la luz (Figura 24).

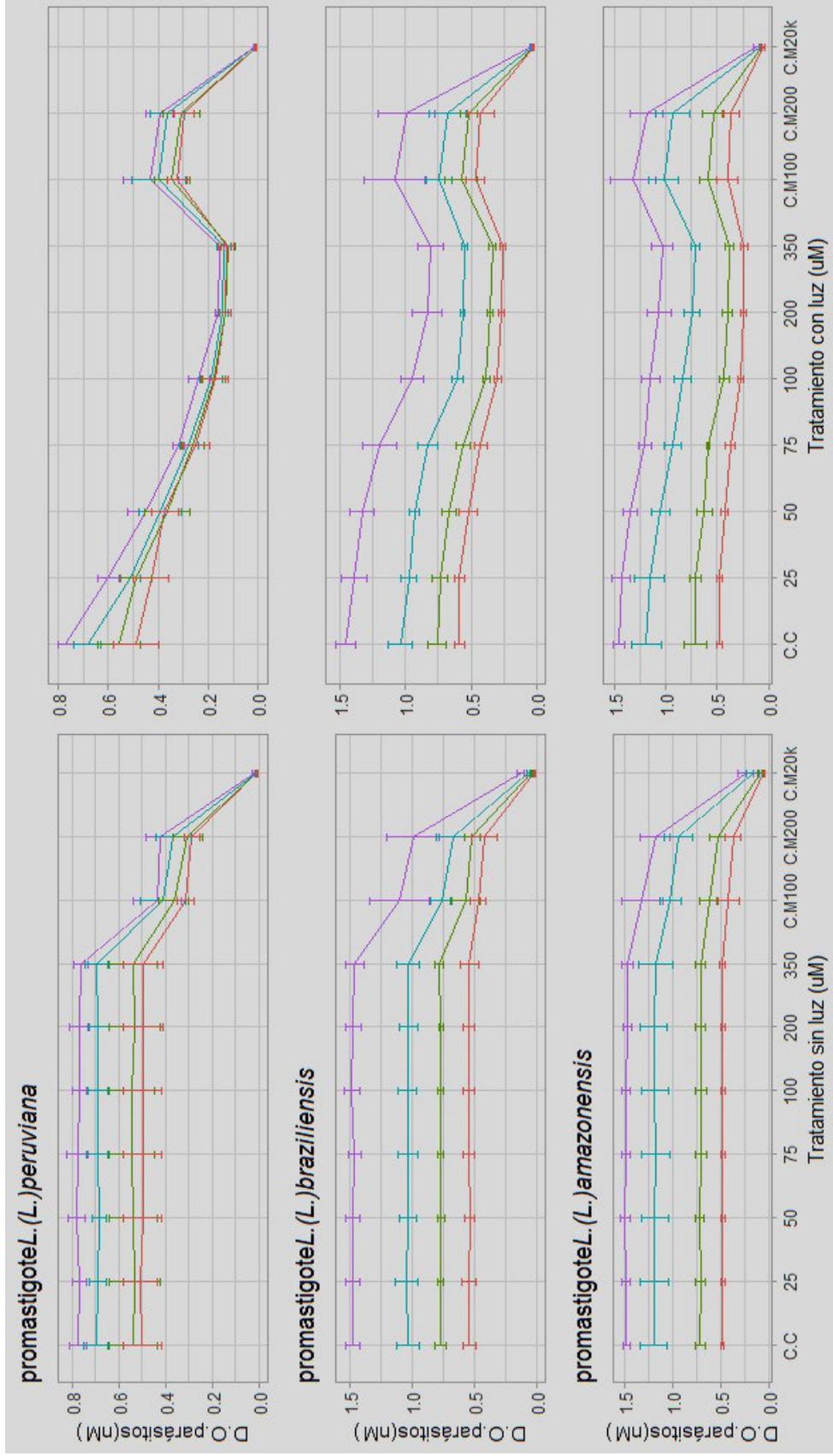


FIGURA 24. MONITOREO POS TRATAMIENTO DE LA PROGRESIÓN DE *L. peruviana*, *L. braziliensis* y *L. amazonensis* a las 24, 48, 72 y 96 horas (—), 48 horas (—), 72 horas (—), 96 horas (—), sin irradiación (gráfico izquierda) y con irradiación

Terapia fotodinámica – AIPcClS₄ vs *Leishmania (Viannia) peruviana*

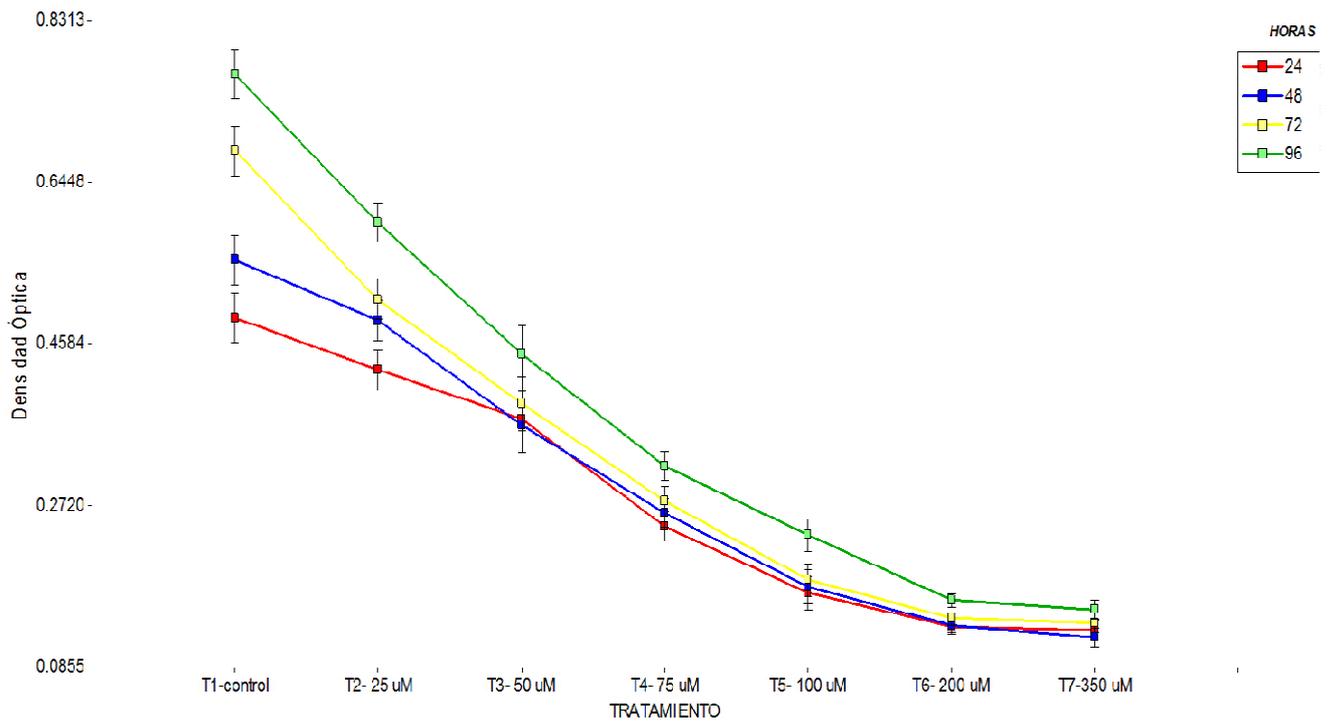
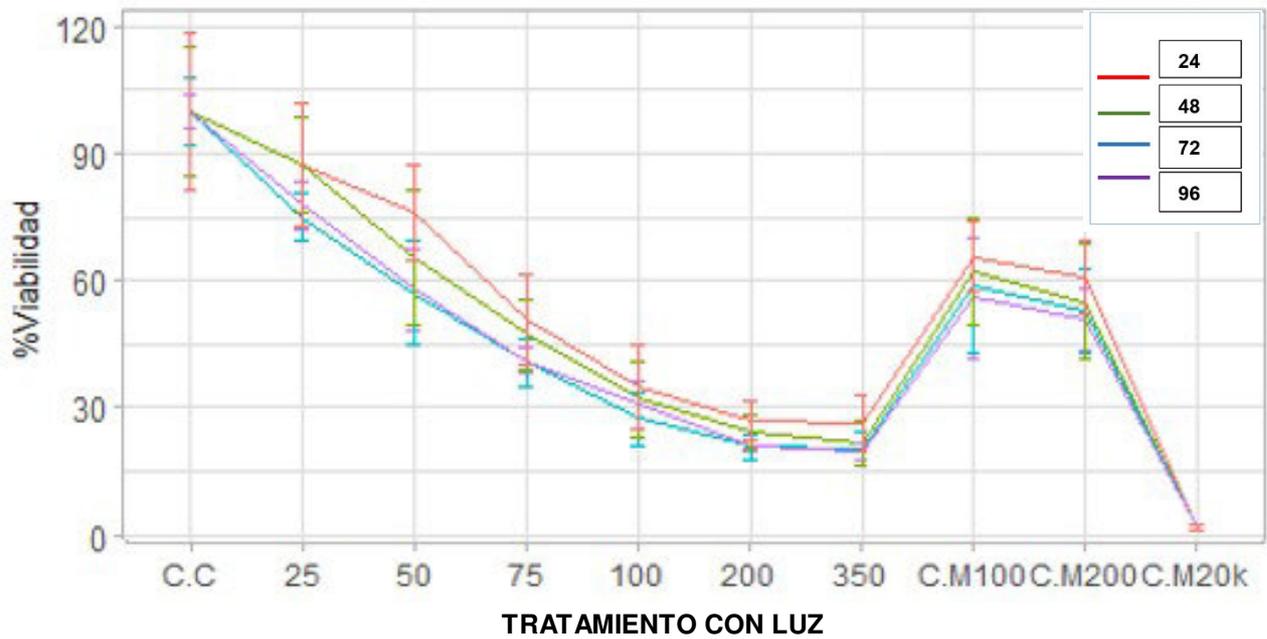
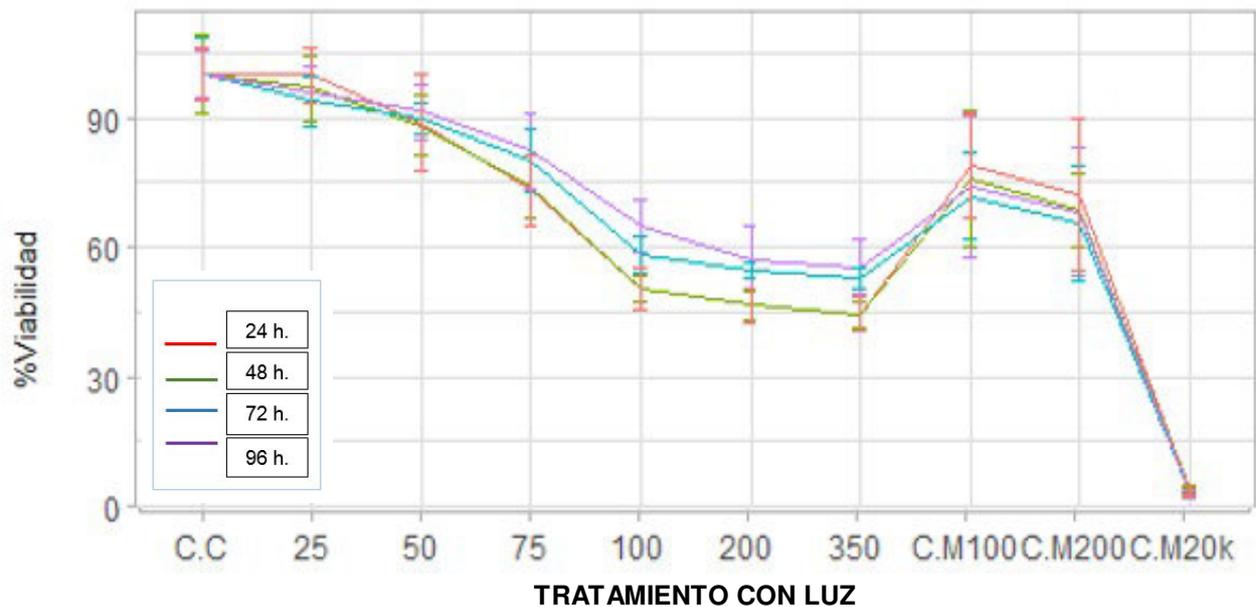


Figura 25. Monitoreo de la progresión de *Leishmania (V.) peruviana*, por concentraciones (Primer gráfico) y en el tiempo a 24, 48, 72 y 96 horas post irradiación (segundo gráfico). Comparación entre medias y error estándar.

La TFD-AIPcClS₄ en *L. (V.) peruviana* después de 24 horas post irradiación tuvo un efecto tóxico a partir de 50 μM frente al control (*p value*=0,0047), las concentraciones de 100 μM, 200 μM, 350 μM generaron 65,6; 72,9 y 73,9% de muerte parasitaria, estos valores no presentaron diferencias significativas entre ellas (*p value*=0,29, *p value* =0,48, *p value* =0,28). Por otro lado, el porcentaje de muerte de estas concentraciones se mantuvo constante hasta las 96 horas post irradiación alcanzando porcentajes de muerte del 68,9; 78,76 y 80,13%. La concentración de 100 μM, 200 μM de Sb^v, a 24 horas generó un 35,78; 45,69% de muerte parasitaria incrementándose el efecto a las 96 horas alcanzando valores del 46,43; 49,09%, así mismo, durante las 96 horas la concentración de Sb^v a 20000 μM alcanzó una reducción parasitaria en un 98,33% (Figura 25).

Terapia fotodinámica – AIPcClS₄ vs *Leishmania (Viannia) braziliensis*



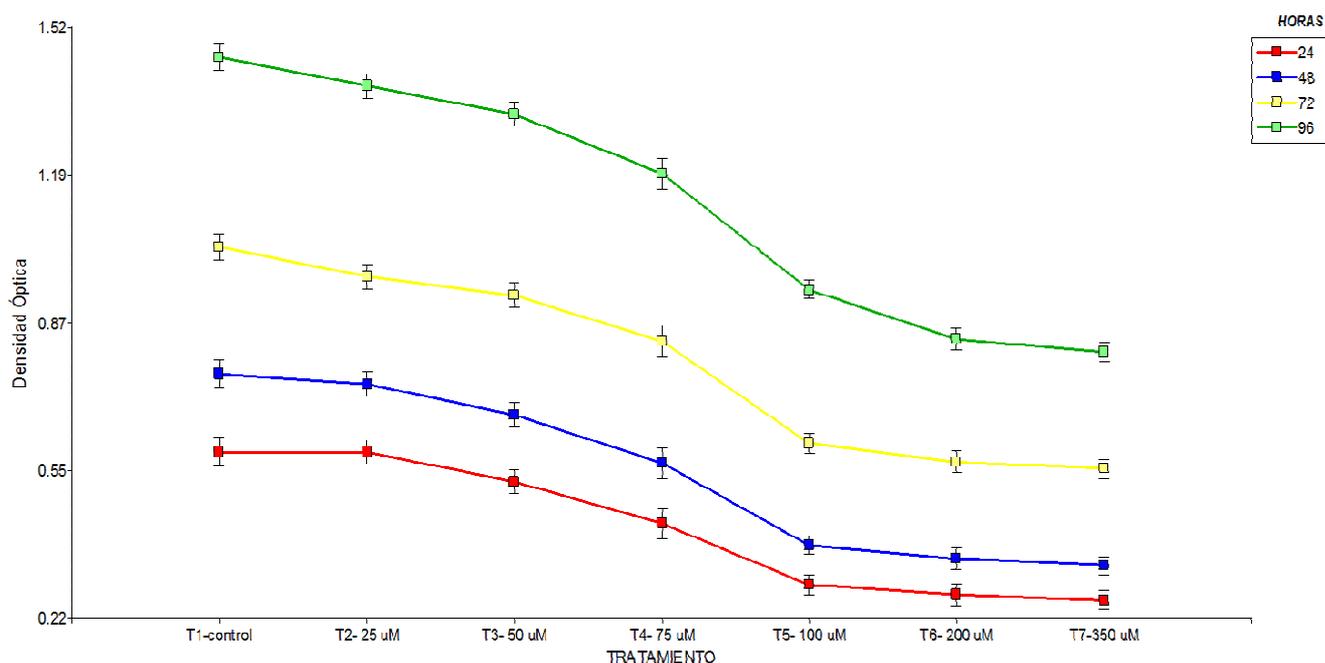


Figura 26. Monitoreo de la progresión de *Leishmania (V.) braziliensis*, por concentraciones (Primer gráfico) y según el tiempo a 24, 48, 72 y 96 horas post irradiación (segundo gráfico). Comparación entre medias y error estándar.

La TFD-AIPcCIS₄ en *L. (V.) braziliensis* después de 24 horas post irradiación tuvo un efecto tóxico a partir de 75 µM frente al control ($p\ value = 0,0287$), concentraciones altas de 100 µM, 200 µM, 350 µM generaron 49,6; 53,4 y 55,5% de muerte parasitaria. Sin embargo, no hay una diferencia estadística entre ellas ($p\ value = 0,3148$, $p\ value=0,2490$, $p\ value= 0,4214$). Por otro lado el parásito presentó una fase de recuperación a las 72 horas en todas las concentraciones evaluadas donde a las 96 horas post radiación las mismas concentraciones de 100 µM, 200 µM, 350 µM presentaron una reducción parasitaria de 35, 42.58, 44.38% respectivamente. Por otro lado, concentraciones de 100, 200 µM Sb^v generaron un 21,18% y 31,41% muerte parasitaria a 24 horas post tratamiento, incrementándose el efecto a 30,96; 33,47%, 96 horas post irradiación, así mismo, durante las 96 horas la concentración de Sb^v a 20000 µM, alcanzó una reducción parasitaria en un 97,08% (Figura 26).

Terapia fotodinámica – ALPcCIS₄ vs *Leishmania (Viannia) amazonensis*

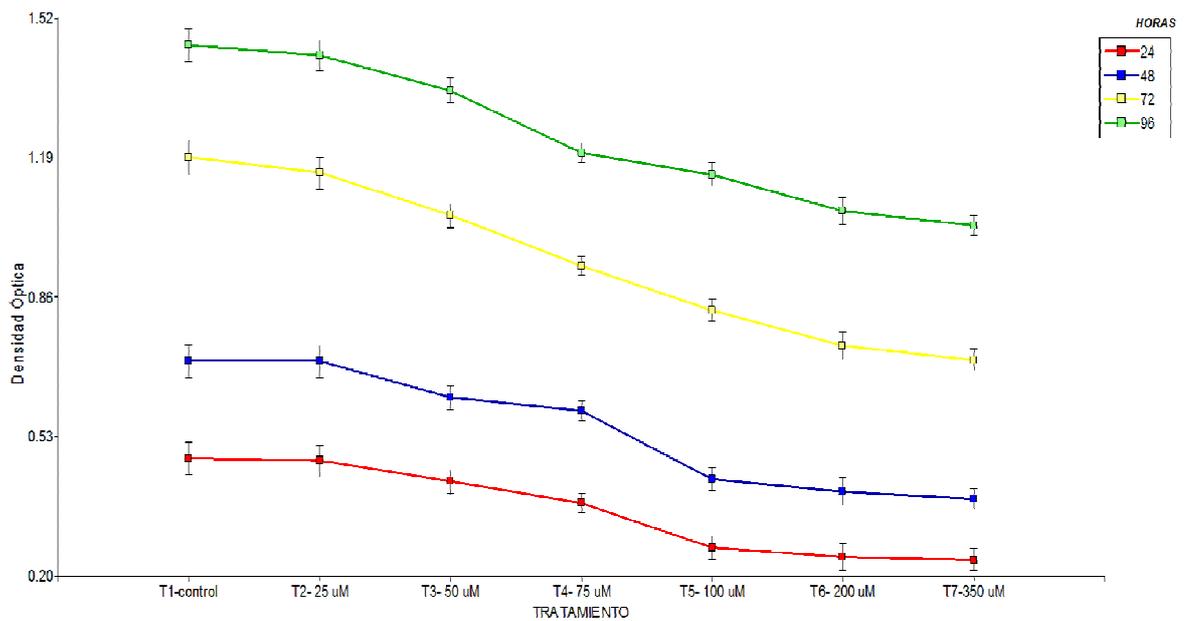
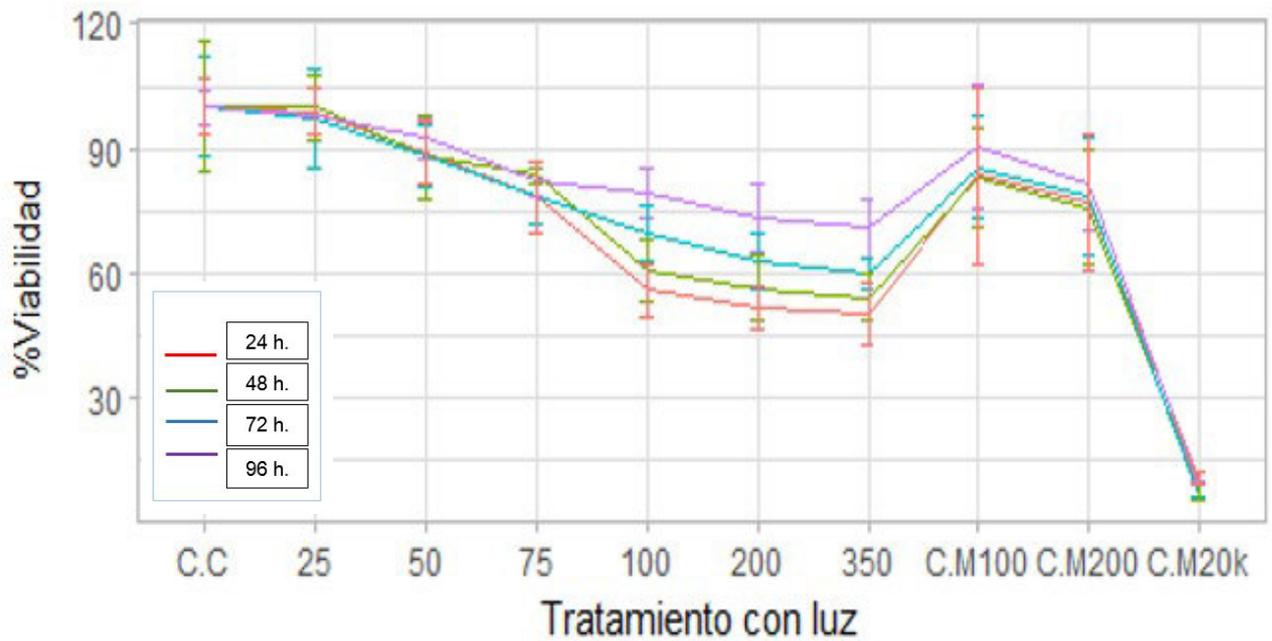


Figura 27. Monitoreo de la progresión de *Leishmania (V.) amazonensis*, por concentraciones (Primer gráfico) y en el tiempo a 24, 48, 72 y 96 horas post irradiación (segundo gráfico). Comparación entre medias y error estándar.

La TFD-AIPcCIS₄ en *L.(L.) amazonensis* después de 24 horas post irradiación tuvo un efecto tóxico a partir de 75 µM frente al control (*p value* = 0,0345). Concentraciones altas de 100 µM, 200 µM, 350 µM generaron un 43,9; 48,5 y 49,7% de muerte parasitaria. Sin embargo, no hay una diferencia estadística entre estas tres concentraciones (*p value* =0,3100, *p value*=0,4944, *p value*=0,3042). Por otro lado el parásito tiene una fase de recuperación a las 72 horas en todas las concentraciones evaluadas donde a 96 horas post radiación, las mismas concentraciones de 100 µM, 200 µM, 350 µM presentaron una reducción parasitaria del 20,90; 26,70 y 28,96% respectivamente. Además concentraciones de 100, 200 µM Sb^v generaron 15,39 y 26,09% de muerte parasitaria 24 horas post radiación, reduciéndose el efecto a 12,62 y 21,41% a 96 horas post radiación. Concentración de Sb^v a 20000 µM genera la muerte en un 91,85 % (Figura 27).

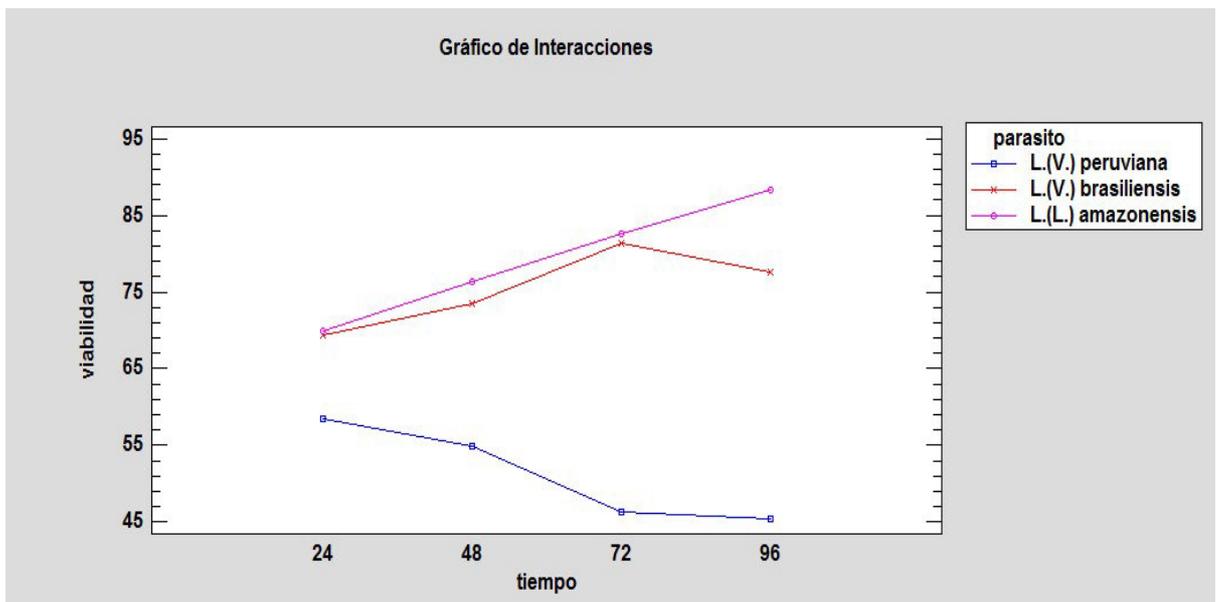


Figura 28. Gráfico de interacciones de las tres especies de *Leishmania* en el tiempo, después del tratamiento TFD-AIPcCIS₄, comparación de medias.

La TFD-AIPcCIS₄, en promastigotes de *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) brasiliensis*, *L. (L.) amazonensis*, a las 24 horas post tratamiento presentó valores de IC₅₀ de 75,4 µM ± 3,18; 175,2 µM ± 2,36; 211,1 µM ± 2,50, respectivamente alcanzando valores de 52,76

$\pm 2,31 \mu\text{m}$, $269,96 \pm 2,96 \mu\text{m}$, $306,920 \pm 3,65$, después de 96 horas post radiación. Se determinó que la TFD- AIPcCIS₄, presentó un índice de selectividad de 3,22; 1,38; 1,15 para *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* respectivamente (Figura 28).

5.5.3. Cambios morfológicos de promastigotes frente al tratamiento

Por tinción Giemsa se observó la morfología y/u otras anormalidades, 48 horas después del tratamiento, se observó que los promastigotes tratados disminuyeron su tamaño en comparación a los promastigotes del grupo control, además se evidenció fragmentación de la membrana celular, pérdida de flagelo, concentraciones altas del compuesto (100 y 200 μM), indujo alteraciones en las tres especies (Figura 29).

5.5.4. Evaluación de la TFD en amastigote intracelular de *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*

El efecto de la TFD - AIPcCIS₄, sobre amastigotes intracelulares fue evaluado y cuantificado por la determinación del número de parásitos intracelulares en un sistema de infección *in vitro* utilizando PCR en tiempo real (Tabla 5, Figura 30).

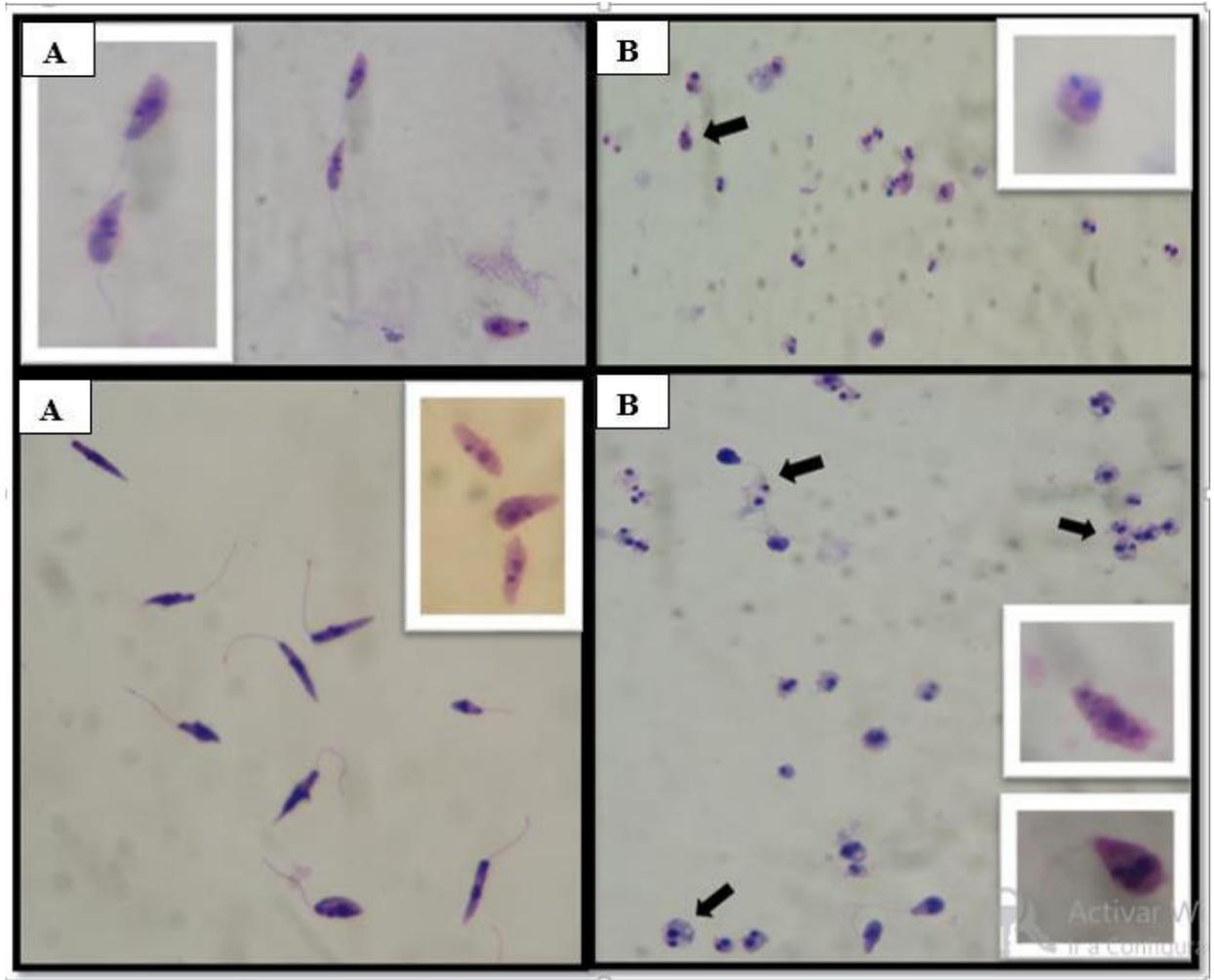


Figura 29. Cambios Morfológicos de promastigotes

(A) Promastigotes no tratados (control), **(B)**. Promastigotes tratados con AIPcClS₄ e irradiados y observados 48 horas después, los promastigotes disminuyeron su tamaño, comparados con el grupo control. Con el paso del tiempo se observó pérdida del kinetoplasto y del flagelo. La flecha indica membrana celular fragmentada.

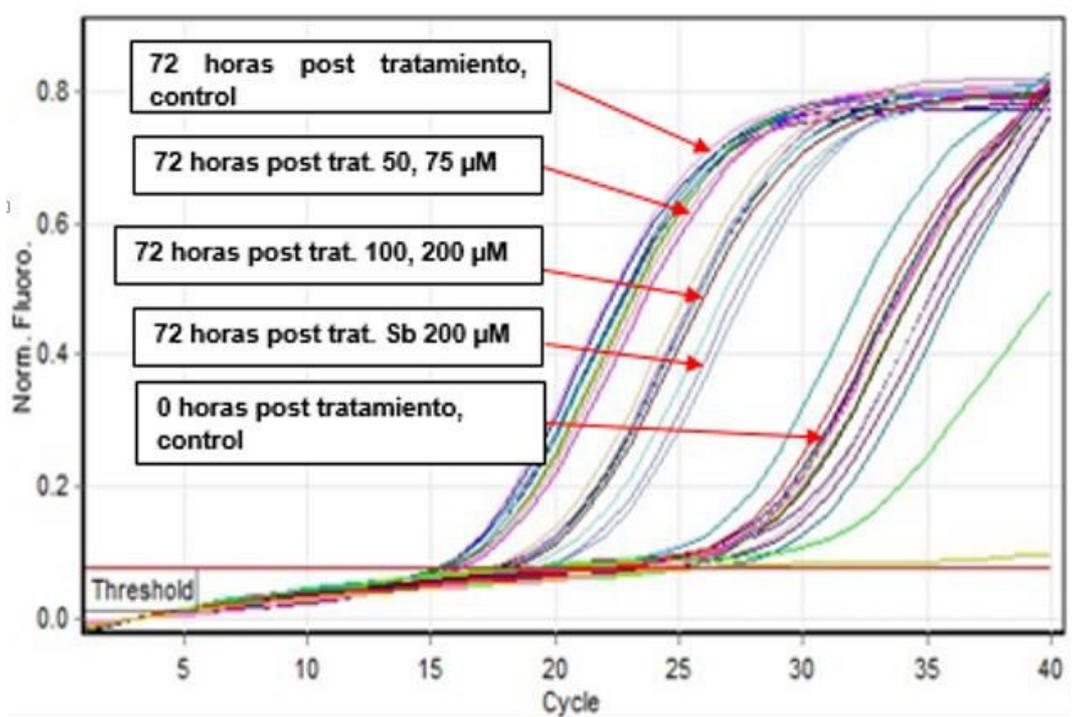


Figura 30. Amplificación por real time PCR, evaluación del tratamiento fotodinámico in vitro frente a amastigotes intracelulares infectado por *L.(L.)amazonensis* (0 – 72 horas post irradiación).

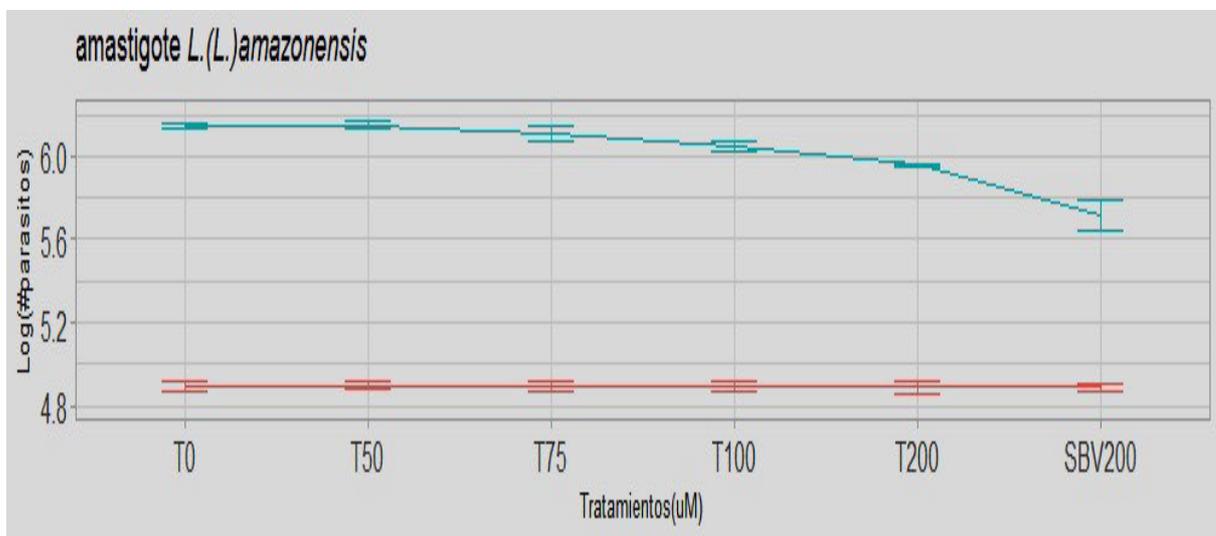


Figura 31. Evaluación de la TFD sobre el número de amastigotes intracelular de *Leishmania* (*V. peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L.(L.) amazonensis* a escala logarítmica en 0 y 72 horas post tratamiento. Comparación entre medianas y error estándar

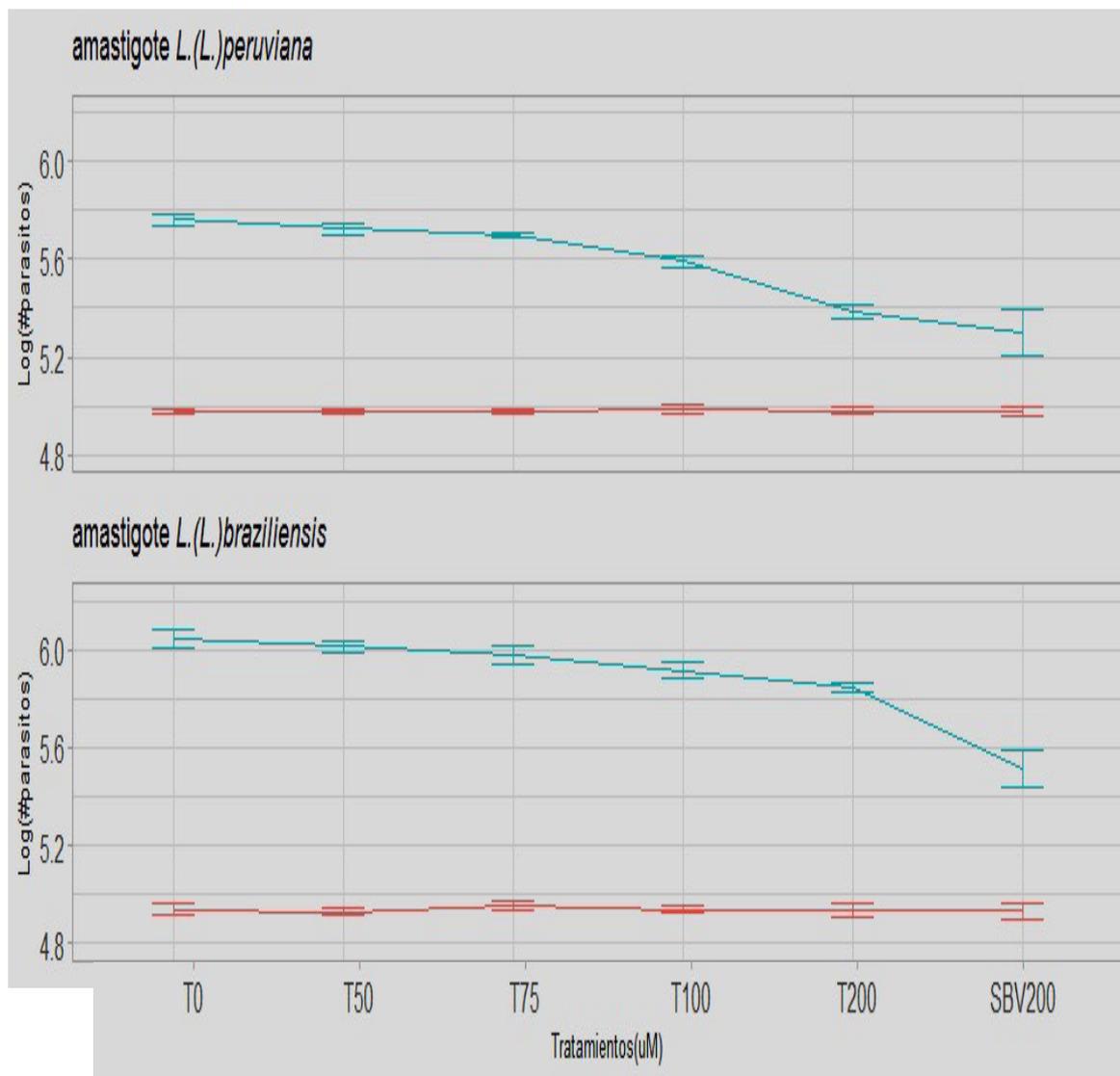


Figura 31. Evaluación de la TFD sobre el número de amastigotes intracelular de *Leishmania* (*V.*) *peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L.(L.) amazonensis* a escala logarítmica en 0 y 72 horas post tratamiento. Comparación entre medianas y error estándar.

La TFD-AIPcCIS₄ en el tiempo 0 posterior al tratamiento, no mostró variación con respecto a la concentración ADN del que se partió antes de darle el tratamiento, mientras que 72 horas después de TFD-AIPcCIS₄ tuvo un efecto tóxico a partir de 100 μM para las tres especies de *Leishmania*, a la máxima concentración de 200 μM se obtuvo una reducción del 57,82; 37,13 y 34,85% de parásitos en comparación al grupo control (medio de crecimiento) para *L. (V.) peruviana*, *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*. Mientras que Sb^v a esa misma concentración presentó un 54,57; 50,31; 40,64% de reducción en el crecimiento parasitario.

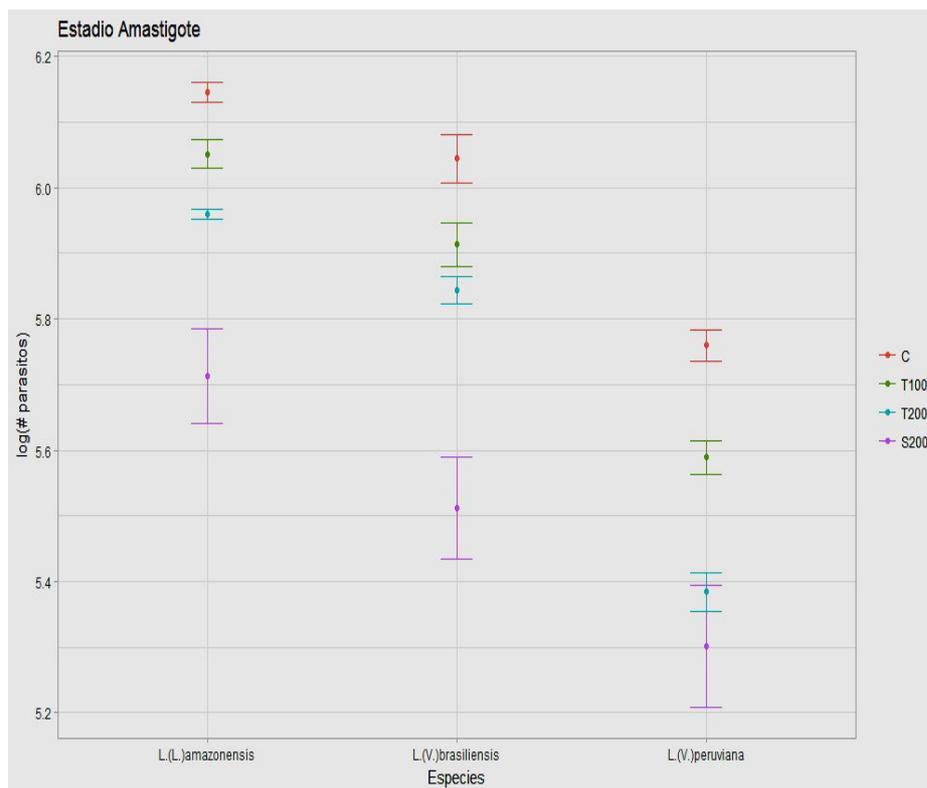


Figura 32. Tendencia del efecto del TFD-AIPcCIS4 a 72 horas post irradiación sobre el número de amastigotes intracelular de las tres especies de *Leishmania* en escala logarítmica.

Por otro lado, concentraciones de 50 y 75 μM , no redujeron la carga parasitaria en ninguna de las tres especies con respecto al control ($p \text{ value} > 0,05$). El tratamiento solo con irradiación LED ó con AIPcCIS₄ sin irradiación, no causó cambios a ninguna concentración.

5.5.5. Cambios morfológicos de amastigotes intracelulares frente al tratamiento

Similar al ítem 5.5.3, se observó cambios morfológicos u otras anomalías, sobre células hospedera (línea celular DH82) y en amastigotes intracelular (Figura 33 y Figura 34). Se observó que altas concentraciones inducen alteraciones morfológicas de vacuolas citoplasmáticas, irregularidad en la membrana nuclear y citoplasmática, como ausencia de núcleo y kinetoplasto. El tratamiento solo con irradiación LED ó con

AIPcCIS₄ sin irradiación, no generó cambios morfológicos.

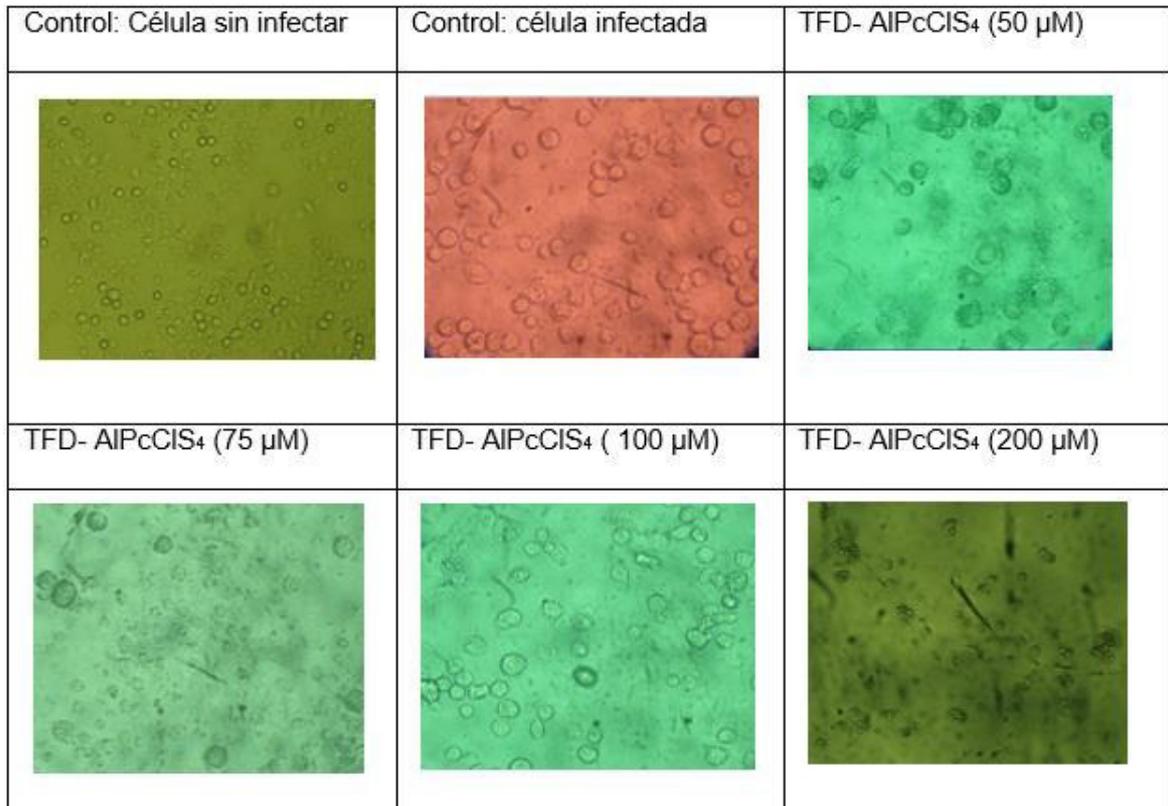
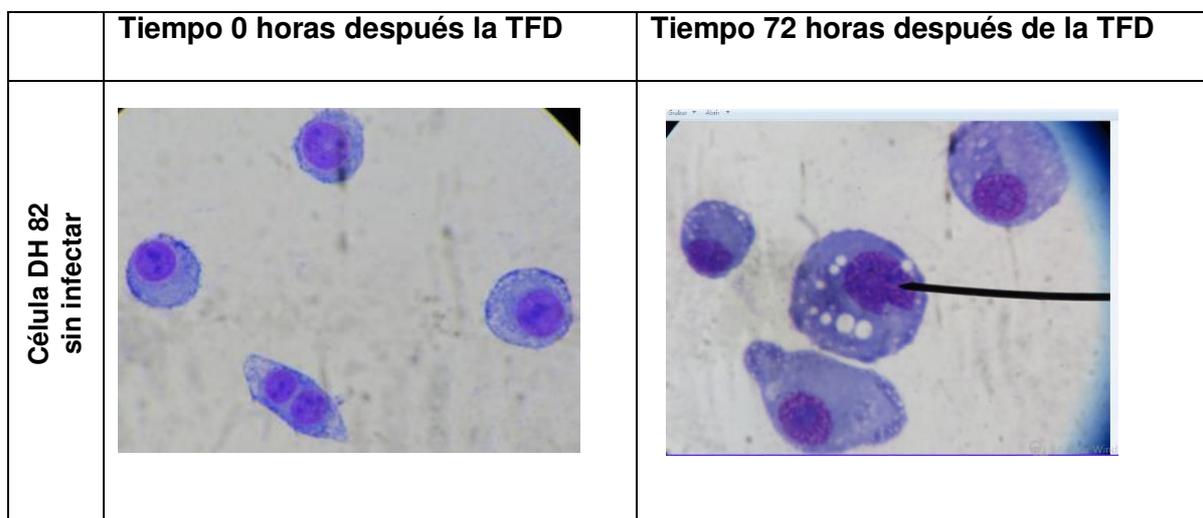
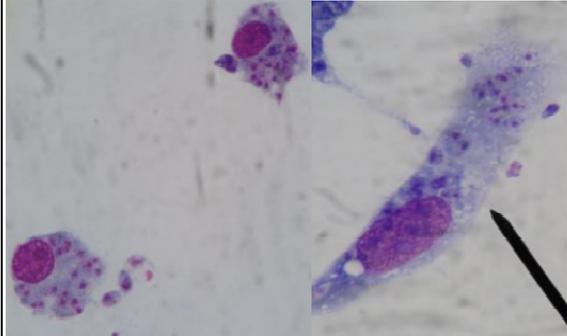


Figura 33. Cultivo de amastigotes intracelulares infectados de *L. (V.) peruviana* frente al tratamiento. Fotografías observados con microscopio invertido al 40X, sobre frasco de 24 pocillos de cultivo de amastigote intracelular de *L. (V.) peruviana* frente al TFD - AIPcCIS₄

Morfología de la línea celular DH82 infectados por *Leishmania* frente al tratamiento.



TFD– 100 µM: DH82 infectado		
TFD– 75 µM: DH82 infectado		
TFD– 50 µM: DH82 infectado		
Control: DH82 infectado		

(Continúa siguiente página)

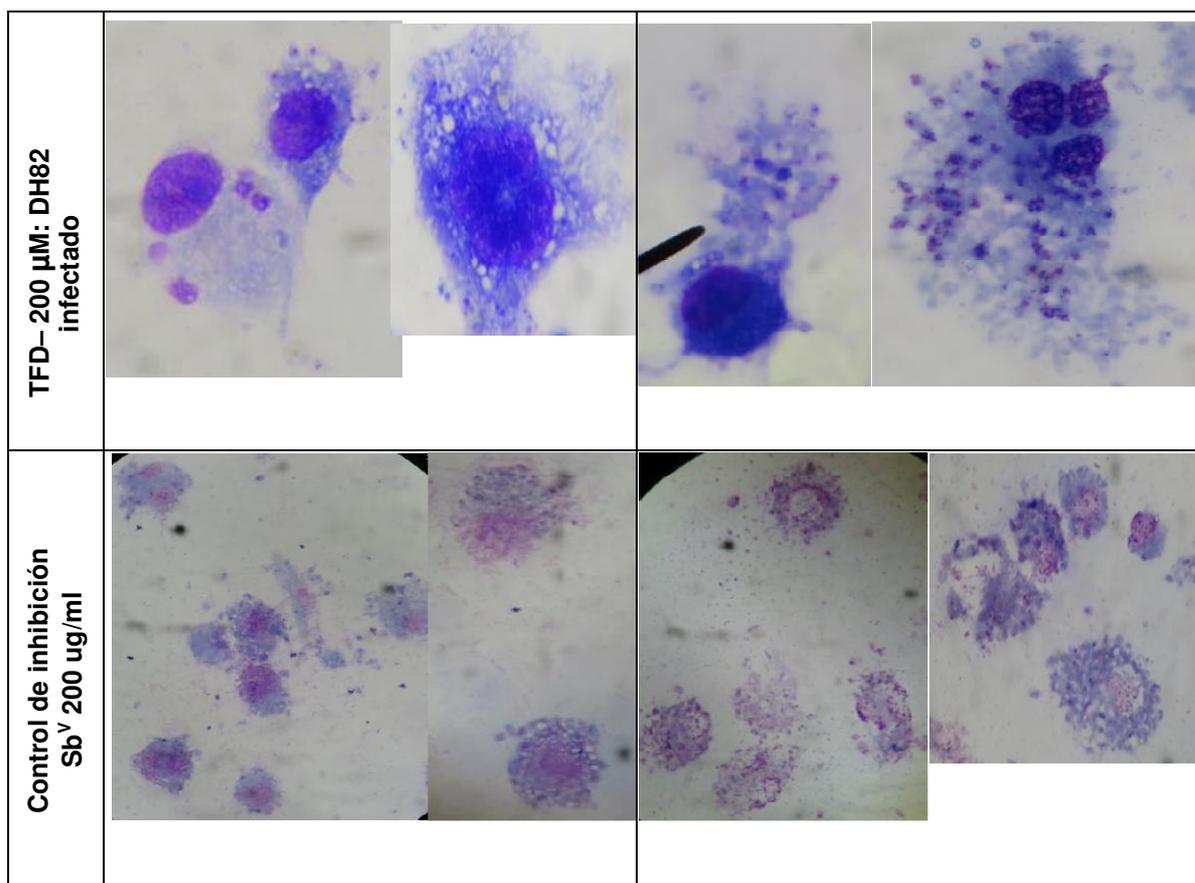


Figura 34. Microfotografías de amastigote intracelular de *L.(V.) braziliensis* (aumento 100X), por coloración Giemsa.

a. Amastigote control (se indica la posición del núcleo y del kinetoplasto). De **b** hasta **f** (de amastigote intracelular tratado con AIPcClS₄ e irradiados, observados inmediatamente (b – e), y observados a 72 horas post irradiación (b.1 – e).

6. DISCUSIÓN

La terapia fotodinámica (TFD), ha sido evaluada como tratamiento para infecciones tópicas locales causadas por virus, bacterias, y hongos (Fu *et al.*, 2013), en este estudio se evaluó la eficacia del fotosensibilizador AIPcCIS₄ y el efecto tóxico sobre promastigotes y amastigotes de *Leishmania (V.) peruviana*, *L.(V.) braziliensis* y *L.(L.) amazonensis*, agentes causales de Leishmaniasis cutánea, cutánea – mucosa y difusa, respectivamente (Kato *et al.*, 2010), especies de alta importancia en la Salud Pública peruana (MINSA. Boletín epidemiológico del Perú, 2017).

Se desarrolló la curva de crecimiento de las especies descritas, empleando medio Schneider a pH 5.5, se logró determinar las fases de crecimiento exponencial y estacionaria, se evidenció que *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis* presentaron un crecimiento similar, la fase estacionaria en ambas especies ocurrió al 5to día de incubación con aproximadamente 73-69% de promastigotes metacíclicos respectivamente, encontrando que el tiempo de replicación de *L.(V.) amazonensis* en medio Schneider suplementado al 10% de SFB es mayor en comparación a *L.(V.) braziliensis*, por lo que al quinto día alcanzaron una concentración total de parásitos de 13×10^7 frente a un 7.2×10^7 respectivamente, ambas especies presentaron mejor adaptabilidad al medio de Schneider ácido a diferencia de *L.(V.) peruviana*, que alcanzó la fase estacionaria al 8avo día, con 45% de promastigotes metacíclicos y a una concentración total de parásitos de 9×10^6 , estos resultados se asemejan al estudio realizado por Menezes (2014), quien al determinar curvas de crecimiento para *L. (L.) amazonensis* y *L. (V.) braziliensis* en medio Schneider pH ácido suplementado al 20% y 10% SFB respectivamente, alcanzaron la fase estacionaria al 3er y 4to día, respectivamente, ambas especies presentaron un patrón de crecimiento similar que puede estar asociado a su patogenicidad y alta virulencia de sus formas clínicas por presentar lesiones mucosas y cutáneas en la selva amazónica mientras que *L.(V.)*

peruviana presenta baja patogenicidad y virulencia manifestando solo lesiones cutáneas benignas (Victoir *et al.*, 2005, Gamboa *et al.*, 2008 y Menezes, 2014).

Cortes *et al.*, (2011) al comparar el crecimiento y comportamiento *in vitro e in vivo* de *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana* e híbridos de ambos, encontró que *L. (V.) braziliensis* presenta mayor plasticidad para tolerar cambios de temperaturas y/o condiciones de cultivo a diferencia de *L. (V.) peruviana*, que presenta una baja densidad de parásitos por un crecimiento lento.

Por otro lado, Lemesre *et al.*, (1988), al comparar la curva de crecimiento de distintas especies de *Leishmania* en medios de crecimiento como GLSP, RPMI, LITR9, concluye que concentraciones altas del inóculo inicial, tiene una relación directa con el incremento de la división celular del parásito independientemente del medio utilizado, alcanzando más rápido la fase estacionaria con periodos cortos de la fase de latencia – logarítmica, al parecer el pico de crecimiento del parásito depende de una concentración mínima de algunos metabolitos del medio de cultivo que fueron secretados, procesados y excretados por los mismos parásitos.

La obtención de promastigotes metacíclicos a pH ácido en el medio de cultivo, generó en nuestro estudio una población heterogénea entre procíclicos y metacíclicos, con un mayor porcentaje de este último estadio en *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*. El estudio reportado por Gamboa *et al.*, (2008), demostró que los metacíclicos de *L. (V.) braziliensis* y *L. (V.) peruviana* obtenidos a pH 5.5 a diferencia de un cultivo a pH neutro, fueron resistentes a lisis por complemento, más infectivos *in vitro* y generaron lesiones en hámster post infección a la segunda semana y a la décimo cuarta semana respectivamente.

El efecto tóxico de AIPcCIS₄ en ensayos *in vitro* frente al estadio de promastigotes del parásito de las tres especies de *Leishmania* está directamente relacionada a la concentración del FS empleado; se evaluó concentraciones de 25, 50, 75, 100, 200, 350

μM del FS tomando como referencia el estudio de *Amin et al.*, (2012) quien lo aplicó sobre células neoplásicas, encontrando un efecto dosis dependiente y de toxicidad nula. El efecto de la terapia en promastigotes se valoró mediante la prueba colorimétrica MTT, por medición de la actividad de la enzima mitocondrial deshidrogenasa de las células viables sobre la sal tetrazolium, el cual es reducido a cristales de formazan (complejo coloreado), resultando en una densidad óptica directamente proporcional a la cantidad de células vivas (*Ginouves et al.*, 2014). Mediante esta técnica se confirmó que las concentraciones de 100, 200 y 350 μM AIPcClS₄ a una sola dosis de radiación, presentaron un mayor efecto citotóxico sin diferencias significativas entre ellas (p value >0.05), por lo que se asume que 100 μM , es la concentración límite de mayor actividad fototóxica en promastigotes de las tres especies de *Leishmania*. Esto se puede deber a que altas concentraciones de porfirinas y ftalocianinas tienden a formar agregados en soluciones acuosas, alterando sus propiedades fotofísicas y fotoquímicas en reacciones de transferencia de energía, generando la disminución del rendimiento cuántico y con ello una baja producción de oxígeno singulete (*Harriman, et al.*, 1982; *Giovannetti et al.*, 2010,); otros trabajos como los realizados por *Escobar et al.*, (2006), *Akilov et al.*, (2009), *Pinto et al.*, (2011), emplearon concentraciones bajas de otras ftalocianinas como el de Zinc, de aluminio tetrasulfatada, entre otros; la diferencia de las concentraciones empleadas y su efectos, puede deberse a la naturaleza del compuesto empleado (isómeros distintos), la fluencia de irradiación, el tiempo de exposición del FS, factores que hacen difícil su comparación.

Las propiedades fisicoquímicas que influyen en la internalización celular de la AIPcClS₄ están la carga molecular, el rendimiento cuántico de oxígeno singulete, la localización subcelular y el grado de sulfonación, este fenómeno fue demostrado en el estudio realizado por *Akilov et al.*, 2006, quienes correlacionaron la carga molecular del FS, con la actividad biológica en *L. major*, concluyendo que los FS catiónicos de las familias benzofenoxazinasto presentan mayor capacidad fototóxica en promastigotes de esta

especie, debido a la carga negativa de la membrana superficial del promastigote. Así mismo, a mayor grado de sulfonación aumenta la hidrofiliidad del compuesto, haciendo que tenga mayor dificultad de atravesar la bicapa lipídica de la membrana celular del parásito (Chan *et al.*, 1997). En nuestro caso es posible que la carga aniónica del FS y el grado de sulfonación influyera en la entrada del compuesto, debido a ello concentraciones de 25 μ M, 50 μ M, no tuvieron ningun efecto tóxico (p value>0.05).

Se observó mayor sensibilidad de TFD- AIPcCIS₄ en promastigotes de *L.peruviana*, con un efecto tóxico continuo hasta las 96 horas post irradiación a diferencia de las otras dos especies de *Leishmania*, en el caso de los promastigotes de *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*, el efecto tóxico alcanzó hasta las 48 horas, logrando una recuperaron a partir de las 72 horas post tratamiento. Este resultado es similar al realizado por Pinto *et al.*, (2011), sobre *L.(L.) mayor* y *L. (V.) braziliensis*, quien afirma que la TFD, no es suficiente para erradicar completamente a los parásitos, y que la efectividad del tratamiento se evidenció mediante un mayor número de dosis de radiación.

El comportamiento distinto entre especies, puede estar ligada a mecanismos de respuesta, donde cada una tiene características moleculares y bioquímicas que define su taxonomía, virulencia y refleja su sensibilidad a distintas drogas entre ellas a los antimoniales pentavalente, (Areválo *et al.*, 2007). Se conoce que *Leishmania* posee mecanismos enzimáticos de detoxificación como peroxidasa, protegiéndoles de peróxido de hidrogeno, radicales hidroxilo y especies reactivas de nitrógeno. Sin embargo, algunas especies de *Leishmania* carecen de estas enzimas que intervienen en la eliminación de las ERO, como se reporta con *L. donovani* donde los procesos de detoxificación del parásito son insuficientes para inactivar la gran cantidad de radicales libres y/u oxígeno singulete producidos por la activación de AIPcCIS₄ (Abok, *et al.*, 1988). En nuestro caso la TFD – AIPcCIS₄ ,mostró bajos índices de selectividad de 3,22;1,38;1,15, para promastigotes de *L.(V.) peruviana*, *L.(V.) braziliensis*, *L.(L.) amazonensis* respectivamente, por lo tanto la célula hospedera DH82 como el parásito

fueron afectados por el tratamiento, similares resultados son reportados por Akilov *et al.*, (2007), quien sugiere mejorar la selectividad de los compuestos con biomoléculas conjugadas al FS que dirija la ruta de internalización y aseguren la especificidad por el parásito.

Al igual que Amin *et al.*, (2011), la irradiación de por sí, no indujo efecto tóxico sobre las células DH82, promastigotes y amastigote del parásito, además el FS sin exposición a luz no fue tóxico en ninguna de las concentraciones empleadas. Esto concuerda con el principio de la TFD, donde la aplicación independiente del compuesto y la irradiación no generan efecto alguno sobre la viabilidad celular, a diferencia de la interacción de los tres componentes (FS, luz, oxígeno molecular), demostrando que la actividad del FS depende de la presencia de luz, constituyendo un filtro para continuar con la siguiente fase de estudio (Taylor *et al.*, 2011; Aureliano *et al.*, 2015).

Se determinó la carga de ADN parasitaria afectada por el tratamiento mediante PCR cuantitativo (Ordoñez – Gutierrez *et al.*, 2009), dada su especificidad y sensibilidad, este ensayo permite determinar el ADN parasitario total (número de amastigotes), siendo una limitación al no discriminar entre parásitos vivos y muertos.

El efecto del compuesto fue detectado por esta metodología a partir de las 72 horas, donde altas concentraciones de AIPcCIS₄ (200 µM), producen mayor muerte parasitaria que es proporcional a una baja concentración de ADN parasitario (donde los amastigotes que sobrevivieron al tratamiento continuaron replicándose) frente al control de crecimiento (amastigotes que no se han visto alterados su capacidad de replicación). Sin embargo la reducción de amastigotes fue menor al 50% para *L. (V.) braziliensis* y *L. (L.) amazonensis*, esto podría deberse a una baja internalización del compuesto por atravesar la membrana celular y del fagolisosoma antes de ubicar al amastigote (Castano *et al.*, 2004), mientras que la internalización en promastigotes se da por el bolso flagelar (Asilian *et al.*, 2016). Adicional a ello, el tiempo de vida de las ERO producidos por AIPcCIS₄, en nanosegundos (Aureliano *et al.*, 2015) pudo haberse

activado en compartimentos distintos al fagolisosoma y haber producido daños a la célula hospedera sin afectar al parásito intracelular (Castano *et al.*, 2004).

Este fenómeno es también reportado por Dutta *et al.*, 2005, quien evaluó la TFD-AIPcCI frente a ambos estadios (amastigote, promastigote) de *L.(L.) amazonensis*, afirmando que el amastigote intracelular de *L.(L.) amazonensis* fue menos susceptible que el promastigote, debido a un mecanismo antioxidante que obtiene de la célula hospedera. Sin embargo dado los resultados morfológicos y la sensibilidad de la línea DH82 frente a la TFD - AIPcCIS₄ (Figura 23, Figura 34) podría sospecharse que la muerte del amastigote, se da como un efecto de la muerte de la célula hospedera.

Se evidenció alteraciones morfológicas en ambas formas del parásito, en promastigotes se visualizó pérdida de motilidad, fragmentación citoplasmática, pérdida del kinetoplasto y del flagelo, ya mencionado por Sousa *et al.*, 2016, cuya pérdida de la estructura fusiforme sugiere alteración de los microtúbulos, propio de la membrana plasmática mientras que en los amastigotes; las alteraciones en las vacuolas citoplasmáticas, ausencia de núcleo y kinetoplasto, podría sugerir un mecanismo apoptótico (Hernandez, 2010).

En nuestro estudio el Sb^v, tuvo mayor efecto que AIPcCIS₄ en la inhibición del parásito intracelular que en los promastigotes, esto podría deberse a que su mecanismo de muerte es distinto a la TFD por lo que actúa como una pro droga dentro del fagolisosoma del macrófago para ser reducida a su forma antimonial trivalente SB III, forma activa con actividad leishmanicida, (Frézard *et al.*, 2014), sin embargo concentraciones muy altas de 20000 µM, causan toxicidad celular muy similar al efecto que produce tritón al 0.01%.

7. CONCLUSIONES

La TFD-AIPcCIS₄ tuvo un efecto tóxico sobre ambos estadios de especies de *L.(V.) peruviana*, *L.(V.) braziliensis* y *L.(L.) amazonensis*. El efecto del compuesto AIPcCIS₄ depende de la concentración empleada, la distancia de exposición a la irradiación, la especie de *Leishmania* y el estadio evaluado.

Leishmania (V.) braziliensis y *L.(L.) amazonensis* muestran similares porcentaje de promastigotes metacíclicos (73 – 69%), alcanzando la fase estacionaria al quinto día de cultivo y con mejor adaptación al medio de crecimiento a diferencia de *L. (V.) peruviana* que alcanzó la fase estacionaria al octavo día con un bajo porcentaje de promastigotes metacíclicos (45%) y una baja adaptación al medio.

La evaluación del efecto tóxico de TFD-AIPcCIS₄ realizada por 96 horas en promastigotes y a la concentración de 100 µM produjo mayor porcentaje de muerte de promastigotes para *L.(V.) peruviana*, *L.(V.) braziliensis* y *L.(L.) amazonensis* con un IC₅₀ de 75,4 µm ± 3,18; 175,2 µm ± 2,36; 211,1 µm ± 2,50. Sin embargo, las especies de *L.(V.) braziliensis* y *L.(L.) amazonensis* iniciaron un proceso de recuperación a partir de las 72 horas post tratamiento, a diferencia de *L. (V.) peruviana* que fue más sensible al tratamiento y no presentó una fase de recuperación.

La TFD- AIPcCIS₄, a una concentración de 200 µM mostró mayor porcentaje de reducción de DNA parasitario frente al control en las tres especies de *Leishmania* seguido de alteraciones en las vacuolas citoplásmáticas, ausencia de núcleo y kinetoplasto, 72 horas después del tratamiento.

8. RECOMENDACIONES

Este trabajo proporciona información de la actividad biológica de AIPcCIS₄ y su efecto tóxico sobre promastigotes y amastigotes de las tres especies de *Leishmania*. Dada la solubilidad del compuesto podría evaluarse nuevas formulaciones (películas conjugadas con el compuesto, liposomas y nanopartículas), y otras vías de inoculación que mejoren la selectividad por el parásito y eviten daños en la célula.

Debido a que en este ensayo *in vitro*, tanto la línea celular DH82 como el parásito fueron afectados a una radiación continua en toda su dimensión, para ensayos *in vivo*, podría controlarse la aplicación de la luz, restringiendo el efecto de la TFD, al sitio donde se administró el fotosensibilizador y a varias dosis de radiación.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABOK, Kisia., CADENAS, Enrique., Brunk, Ulf. An experimental model system for Leishmaniasis. Effects of porphyrin – compounds and menadione on *Leishmania* parasites engulfed by cultured macrophages. *Journal of Pathology Microbiology and Immunology*.1988, Vol 96,pp, 543-551.

AKHOUNDI Mohammad., Downing Tim., Votýpka Jan., Kuhls Katrin., Luke Julius., Cagnet Arnaud, Ravel Christophe., Pierre Marty., Pascal Delaunay., Mohamed Kasbar.i, Bruno Granouillac., Luigi Gradoni ., Denis Sereno. Leishmania infections: Molecular targets and diagnosis. *Molecular Aspects of Medicine*. 2017. Vol 57. N° 1, pp 29.

AKILOV, Oleg., Kosaca, Sachiko., O’Riordan Katie., Hasan, Tayyaba. Parasitocidal effect of δ -aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Experimental dermatology*, 2007, vol. 16, N° 8, p. 651-660.

ALMEIDA, Laura., Santos, Jussamara. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática da literatura. *Anais. Brasileiros de Dermatologia*, 2011, Vol.86, N°3.

ALVAR, Jorge., Vélez, Iván., Bern, Caryn., Herrero, Mercé., Desjeux, Philippe., Cano, Jorge., Jannin Jean., Boer., Margriet. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS one*, 2012, Vol. 7, N° 5, pp 356-368.

AMIN Rehab, Hauser Carmen, Rueck Angelica, Scalfi- Happ Claudia. Evaluation of photodynamic treatment using aluminum phthalocyanine tetrasulfonate chloride as a photosensitizer. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2012. N° 11, pp.1156- 1163.

ANDREEVA, E., Udartseva , O., Vozovikov I., Kuzmin S., Tararak E. Effects of photodynamic exposure on endothelial cells *in vitro*. *Bulletin of experimental biology and medicine*. 2010, Vol. 149, N° 2, p. 262–264.

AREVALO, Jorge, Ramirez, Luis., Adai, Vanessa, Zimic, Mirko., Tulliano, Gianfranco., Miranda, César., Lazo, Marcela., Chappuis, Francois., Llanos Cuentas Alejandro. Influence of *Leishmania (Viannia)* species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *Journal of Infectious Diseases*, 2007, Vol. 195, N° 12, pp. 1846-1851.

ASILIAN, Ali; DAVAMI, Majid. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clinical and experimental dermatology*, 2006, vol. 31, N° 5, pp. 634-637.

AURELIANO, Debora., Ribeiro, Martha., Lauletta, José., Fabio C., Pogliani, Fábio Sellera, Dennis., Mauricio S. Baptista. Treatment and Control of Leishmaniasis Using Photodynamic Therapy. En: INTECH. *Leishmaniasis - Trends in Epidemiology*. 2014, pp. 393-412.

BLUM J, Desjeux P, Schwartz E, Beck B, Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. *J Antimicrob Chemother*. 2004 .Vol. 53, N° 2, pp158-66.

CAMARGO, L. B.; LANGONI, Hélio. Impact of leishmaniasis on public health.*Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 2006, Vol. 12, N° 4, pp. 527-548.

CASTANO, Ana., Demidova, Tatiana., Hamblin, Michael., Mechanisms in photodynamic therapy: part one—photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagnosis Photodyn Ther*. 2004, Vol. 1, Nro.4, pp: 279–293.

CHAN, Wai., MARSHALL, John., SVENSEN, Russel., BEDWELL, Janne, HART, I.R. Effect of sulfonation on the cell and tissue distribution of the photosensitizer aluminium phthalocyanine. *Cancer Research* 1990, N° 50, pp. 4533.

CORTES Sofia, Esteves Carina, Maurício Isabel, Maia Carla, Cristovão José Manuel, Miles Michael, Campino Lenea. *In vitro* and *in vivo* behaviour of sympatric *Leishmania (V.) braziliensis*, *L. (V.) peruviana* and their hybrids. 2012. *Parasitology*, Vol 139, N° 2, pp.191–199.

DAI, Tianhong.; HUANG, Ying; HAMBLIN, Michael. R. Photodynamic therapy for localized infections - state of the art. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 2010, Vol. 6, N° 3-4, pp. 170–188.

DUTTA, Sujoy, *et al.* Transgenic *Leishmania* model for delta-aminolevulinic acid-inducible monospecific uroporphyrin: cytolytic phototoxicity initiated by singlet oxygen-mediated inactivation of proteins and its ablation by endosomal mobilization of cytosolic uroporphyrin. *Eukaryotic cell*, 2008, Vol. 7, N° 7, pp. 1146-1157.

ENK C.D., A. Nasereddin, R. Alper, M. Dan-Goor, C.L. Jaffe, H.C. Wulf. Cutaneous leishmaniasis responds to daylight-activated photodynamic therapy: proof of concept for a novel self-administered therapeutic modality. *British Journal of Dermatology*. 2015; Vol. 172. N°5, pp.1364-1370.

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

FREZARD, F; Monte-Neto, R; Reis, P. Antimony transport mechanisms in resistant *Leishmania* parasites. *Biophysical review*. 2014, Vol.6, N° 1, pp. 119-132.

FRITSCH Clemens, Claes Enk, Flory Jonas., Abdelmajeed Nasereddin, Arie Ingber, Charles Jaffe. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis With Photodynamic Therapy. *Arch Dermatol*. 2003, Vol. 139, N° 4, pp. 432-434.

FOULET Franc_oise, Botterel Franc_oise, Buffet Pierre, Morizot Gloria, Rivollet Danie`le, Costa Jean-Marc. Detection and Identification of *Leishmania* Species from Clinical Specimens by Using a Real-Time PCR Assay and Sequencing of the Cytochrome b Gene. 2007. *American Society for Microbiology*. Vol. 45, N° 7, pp. 2110–2115.

GAMBOA, D., TORRES, K., DE DONCKER S., ZIMIC, M., AREVALO J., DUJARDIN C. Evaluation of an *in vitro* and *in vivo* model for experimental infection with *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) peruviana*. *Parasitology*, 2008, Vol. 135, N° 03, pp. 319-326.

GINOUVES Marine., Carme, Bernard., Couppie Pierre., Prevot Ghislaine. Comparison of Tetrazolium Salt Assays for Evaluation of Drug Activity against *Leishmania* spp. *Journal of Clinical Microbiology* 2014.p. 2131–2138. Volume 52, no 20, pp.124-128.

GIOVANNETTI Rita, Alibabaei Leila, Petetta Laura. "Aggregation behaviour of a tetracarboxylic porphyrin in aqueous solution". *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. 2010, Vol.211, N° 2-3. pp. 108-114.

GOMES Luciana, Gonzaga Felipe M., Morais-Teixeira Eliane, Souza Bruna S. Validation of quantitative real-time PCR for the *in vitro* assessment of antileishmanial drug activity. *Experimental parasitology*. 2012. Vol. 131.p. 175-179.

HARRIMAN A., G. Poter, M. Richoux. Metal phthalocyanines and porphyrins as photosensitizers for reduction of water to hydrogen. *Coordination Chemistry Reviews*. 1982, Vol. 44, N° 1, pp 83-126.

HERNÁNDEZ Peñaranda Indira. "Actividad Foto toxica *in vitro* e *in vivo* de Ftalocianina de Aluminio Clorada contra *Leishmania amazonensis*". Asesor Robledo Restrepo Maria. Tesis Titulo

de maestría. Universidad Industrial de Santander, Facultad de Salud. Escuela de Medicina, Bucaramanga, Colombia, 2010.

HERNÁNDEZ, Indira Paola., Montanari Jorge., Valdiviezo Wilfredo., Morilla Maria José., Romero Lilia., Escobar Patricia. *In vitro* phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World Leishmania species. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2012, vol. 117, N° 5, pp. 157-163.

JORI, Giulio; Brown, Stanley B. Photosensitized inactivation of microorganisms. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2004, vol. 3, N° 5, . 403-405.

KATO, Hiroto. Caceres, Abraham. Mimori, Tatsuyuki. Ishimaru Yuca, Y. Sayed, A. Fujita, Megumi. Iwata, Hiroyuki. Uezato, H. Velez, Lenin. Gomez, Eduardo. Hashiguchi Yoshihisa. Use of FTA cards for direct sampling of patients' lesions in the ecological study of cutaneous leishmaniasis. *Journal of Clinical Microbiology*. 2010. Vol. 48. Nro 10, pp. 3661–3665.

KEDZIERSKI, Lukasz. Leishmaniasis vaccine: where are we today?. *Journal of global infectious diseases*, 2010, vol. 2, N° 2, pp. 177 – 185.

KONAN Yvette, Gurny Robert , Allemann Eric. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic 2002, *Therapy Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*. Vol, 66 pp.89–106

LAYEGH, Pouran., Pezeshkpoor, Fakhrozaman., Soruri, Amir.; Parisa Naviafar; Moghiman Tokman. Efficacy of Cryotherapy versus Intralesional Meglumine Antimoniate (Glucantime) for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis in Children. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 2009, Vol. 80, N° 2. pp. 172 – 175.

LEMESRE J. L., F. Kweider Darcy, M., A. Capron, F. Requirements of defined cultivation conditions for standard growth of Leishmania promastigotes *in vitro*. *Acta Tropica*. 1988, Vol. 9, p. 99-108. LUCAS, C. Franke, E. Cachay, M. Tejada, A. Cruz, M. Kreutzer, R. Barker, D. McCann, Watts, D. Distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru. *The Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 1998, Vol. 59, N° 2, pp. 312-317.

LUCAS CM, Franke ED, Cachay MI, Tejada A, Cruz ME, Kreutzer RD, Barker DC, McCann SH, Watts DM. Geographic distribution and clinical description of leishmaniasis cases in Peru, *Am J Trop Med Hyg*. 1998, Vol, 59, nro 2, pp. 312- 317.

MESTRE, Gustavo., Ribeiro Ana Lucia., Djunko Rosina., Senotre Jorge., Franco Valéria., Missawa Nanci. Phlebotomine sand flies and canine infection in areas of human visceral leishmaniasis, Cuiabá, Mato Grosso. *Revista brasileira de 74 parasitologia veterinária*. 2011. vol. 20, N° 3, p. 228–234.

MENEZES MACHADO, MICHELLE. ANÁLISE DE DIFERENTES CEPAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis* y *Leishmania (Viannia) braziliensis* quanto a infectividade/virulência e perfil de citocinas e quimiocinas produzidas por macrófagos murinos infectados. Asesor: Mendonça, Sérgio Tesis Título Mestrado em Biologia Parasitária. MINISTÉRIO DA SAÚDE FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ INSTITUTO OSWALDO CRUZ. Rio de Janeiro. Maio de 2014.

MINSA. BOLETÍN EPIDEMIOLÓGICO. INS (Lima). 2017; Vol. 24, Semana Epidemiológica N° 30. Del 26 de Julio al 01 de Agosto del 2017, p. 608 – 612. Disponible en: <http://www.dge.gob.pe/boletin.php>.

MOHAPATRA, Sarita. Drug resistance in Leishmaniasis: Newer developments. *Tropical Parasitology*, 2014, Vol. 4, N° 1, pp. 4-9.

MONTOYA Andrés., Diana Alejandro., Muñoz Karina., Taylor Viviana., Cedeño David., Vélez Iván, Echeverri Fernando, Robledo Sara. Development of a Novel Formulation with Hypericin To

- Treat Cutaneous Leishmaniasis Based on Photodynamic Therapy in *In Vitro* and *In Vivo* Studies. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 2015. Vol. 59, Nº 9, pp 237 – 257.
- MORAIMA, Leonardo Marmo, Santos Fabio., Pereira Juliana., Costa Maira., Pacheco Cristina, Newton Soares da Silva. Photodynamic therapy: porphyrins and phthalocyanines as photosensitizers. *Australian journal of chemistry*, 2008, Vol. 61, Nº 10, pp. 741-754.
- MORGENTHALER, Justin B., *et al.* Carbaporphyrin ketals as potential agents for a new photodynamic therapy treatment of leishmaniasis. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 2008, vol. 16, Nº. 14, pp. 7033-7038.
- MURRAY, H. W. Leishmaniasis in the United States: treatment in 2012. *The American journal of tropical medicine and hygiene*. 2012, vol. 86, Nº. 3, pp. 434–440.
- OLIVEIRA, Kleber., Sousa Juliana., Roberto Nicholas., Fávoro Francisco., Timothy Jhon. Conceitos Fundamentais e Aplicações de Fotossensibilizadores do Tipo Porfirinas, Clorinas e Ftalocianinas em Terapias Fotônicas. *Revista Virtual de Química*. 2015, Vol. 7, Nº.1, p.310-335.
- OMS. Control de las leishmaniasis: Informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis. 2010, Ginebra, 22 a 26 de marzo.
- ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, Martinez M., Somoza Rubio, Mendez S., Alunda M. *Leishmania infantum*: antiproliferative effect of recombinant plant cystatins on promastigotes and intracellular amastigotes estimated by direct counting and real-time PCR. *Experimental parasitology*, 2009, vol. 123, Nº 4, pp. 341-346.
- ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD: Leishmaniasis: Informe Epidemiológico en las Américas: Washington: Organización Panamericana de la Salud; 2018. Disponible en: www.paho.org/leishmaniasis.
- PELOI, Lilian Somenci, Guerino Eduardo., Kimura Elza., Valdrinez Maria., Mara Sandra., Coeli Regina. Photodynamic therapy for American cutaneous leishmaniasis: The efficacy of methylene blue in hamsters experimentally infected with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Experimental parasitology*, 2011, Vol. 128, Nº 4, pp. 353-356.
- PINTO JG, *et al.* Assessment of *Leishmania major* and *Leishmania braziliensis* promastigote viability after photodynamic treatment with aluminum phthalocyanine tetrasulfonate (AIPcS4). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 2011, Vol. 17, Nº 3, pp. 300-307.
- PIZINGER, Karel, Cetkpvska Petra., Kacerovska Denisa., Kumpova Magda. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy and cryotherapy. *European Journal of Dermatology*, 2009, Vol. 19, Nº 2, pp. 172-173.
- PLAETZER Kristjan, Kiesslich T., Kramme B., Peter H. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AIPcS4-PDT. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2002, Nº 1, pp.172–177. Disponible en: DOI: 10.1039/b108816e.
- RAAB O. VON TAPPEINER, H. Ueber die Wirkung Fluoreszierender Stoffe auf Infusoria. *Z Biol. Med. Wochenschr.* 1900, Vol. 47. Nº 39, p.524–46.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Proven and putative vectors of American cutaneous leishmaniasis in Brazil: aspects of their biology and vectorial competence. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 2009, vol. 104, Nº. 7, pp 937–954.
- REY, L. *Parasitologia médica* 3. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2008, Vol. 10, Nº.7. pp.326-336.

- READY. Epidemiology of visceral leishmaniasis. *Clinical Epidemiology*. 2014; vol.6 pp.147–154. Disponible en: DOI: 10.2147/CLEP.S44267.
- ROBERTSON, C. A.; EVANS, D. Hawkins; ABRAHAM SE, H. Photodynamic therapy (PDT): a short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 2009, vol. 96, N° 1, pp. 1-8.
- ROSS, Saf'janova VM. Classification of the genus *Leishmania*. In: The Leishmaniasis, Protozoology. Leningrad: Academy of Sciences; *All Union Society of Protozoologists*; 1982. p. 95-101.
- SAMANAMÚ, Christian; NINÁN, Oscar; SANTIAGO, Julio. TERAPIA FOTODINÁMICA: UNA LUZ DE ESPERANZA EN LA LUCHA CONTRA EL CÁNCER. *Revista Peruana de Química e Ingeniería Química*, 2003, vol. 6, N° 1, p. 69-78.
- SÁNCHEZ- SALDAÑA L; SAÉNZ, Eliana; PANCORBO, Julia, et al., LEISHMANIASIS. *Dermatología Peruana*. 2004, Vol.14, N° 2.
- SEEBERGER Josef, Daoud Saleh, Pammer Johannes. Transient effect of topical treatment of cutaneous leishmaniasis with imiquimod. *Internation Journail Dermatology*. 2003. DOI: 10.1046/j.1365-4362.2003.01955.
- SIMIONI c, Neri I., Tabellini G., Ricci F., Bressanin D. et al., Cytotoxic activity of the novel Akt inhibitor, MK-2206, in T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Leukemia*. 2012. Vol 26, pp. 2336–2342.
- SOHL, Sirius, Kauer Friederike., Paash Uwe., Simon Jan. Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. *JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft*, 2007, Vol. 5, N° 2, pp. 128-130.
- SUDARSHAN Medhavi, Jason L., Weirather Mary E. Wilson Shyam Sundar. Study of parasite kinetics with antileishmanial drugs using real-time quantitative PCR in Indian visceral leishmaniasis. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 2011. Vol. 66, nro 8, pp.1751–1755,
- TAMIETTI, Perrin, Machado A., Maftoum M., Da Silva N., Tedesco A.C. Pacheco C. Analysis of mitochondrial activity related to cell death after PDT with AIPCS4. *Photomedicine and laser surgery*, 2007, Vol. 25, N° 3, pp. 175-179.
- TAYLOR, Viviana M.; CEDEÑO, David L.; ROBLEDO, Sara M. Phototherapy in treatment of cutaneous leishmaniasis. *Infectiology*, 2011, Vol. 15, N° 4, p. 277-288.
- THIES SF, Ribeiro AL, Michalsky É, Miyazaki RD, Fortes-Dias CL, Fontes CJ, Dias ES. Phlebotomine sandfly fauna and natural *Leishmania* infection rates in a rural area of Cerrado (tropical savannah) in Nova Mutum, State of Mato Grosso in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2013, Vol 46, nro 3, pp. 293-298.
- TOMAZINI, M. V.; SOUZA, S.; TEDESCO, A. C. Terapia fotodinâmica com ftalocianina de zinc tópica: avaliação da intensidade de fluorescência, absorção cutânea, alterações histológicas e imuno-histoquímicas na pele do modelo animal * *Topical photodynamic therapy with zinc phthalocyanine*, 2007. Vol. 82, N° 6, p. 535–541.
- VICTOIR K, Dujardin JC, de Doncker S, et al. Plasticity of *gp63* gene organization in *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana*. *Parasitology* 1995; vol. 111,pp. 265–73.
- WALTON Bryce. Leishmaniasis. *International Journail of dermatology*. 1989. Vol.28. pp 305 – 307. Disponible en: DOI: 10.1111/j.1365-4362.1989.tb01349.x.

FU Xiu-jun, Yong Fang, Min Yao. Antimicrobial Photodynamic Therapy for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infection. *BioMed Research International*.2013. Volume 2013, Article ID 159157, pp.1-9. Disponible en : DOI:<http://dx.doi.org/10.1155/2013/159157>.

ZAULI-NASCIMENTO, Danilo C. Miguel, Jenicer K. U Yokoyama-Yasunaka, Ledice I. A. Pereira, Milton A. Pelli de Oliveira, Fátima Ribeiro-Dias, Miriam L. Dorta, Silvia R. B. Uliana. *In vitro* sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. *Tropical Medical & International Health*. 2010. Vol. 15, Nro 1, pp. 68-76.

ZAKAI., M. L. CHANCE and P. A. BATES*. *In vitro* stimulation of metacyclogenesis in *Leishmania braziliensis*, *L. donovani*, *L. major* and *L. mexicana*. *Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place*.1997. pp. 305- 309.

10. ANEXO

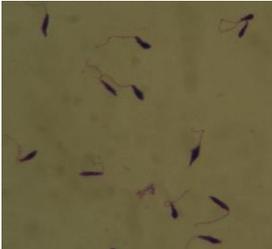
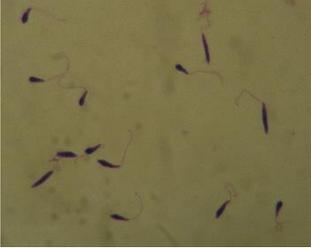
Estandarización en la obtención de promastigotes metacíclicos por purificación con *Lectina Peanut Hiporachis Hypogea* y demostración de su virulencia infectando *Mesocricetus auratus*

Metodología

- 1.- Se colectó cultivos de cepas de *Leishmania (V.) braziliensis, L.(L.)* después de 4 días a pH 5.5 y se llevó a una concentración de 1×10^8 parásitos/mL.
- 2.- Se preparó 100 $\mu\text{g/mL}$ de lectina *Peanut Hiporachis Hypogea* (Sigma) disuelto en PBS y se incorporó volumen/volumen, con la suspensión de parásitos preparado inicialmente.
- 3.- Se incubó por 45 minutos y se centrifugó a 1100 rpm por 5 minutos, finalmente se colectó el sobrenadante y se hizo el conteo de promastigotes metacíclicos, además de sacar una alícuota para ver la morfología por tinción Giemsa.
- 4.- Se infectaron las cepas en hámsteres dorados (*Mesocricetus auratus*) de 6 semanas de edad, que fueron previamente codificados y marcados.
- 5.- Los hamsters fueron infectados intradérmicamente en la almohadilla plantar y en las fosas nasales a una concentración de 1×10^6 promastigotes en 100 μL de PBS. La evolución de las lesiones fue monitoreada semanalmente para observar aparición de la induración y úlceras, previamente anestesiados vía intraperitoneal o intramuscular (40 mg de lidocaína por kg de peso del animal).

Resultados

Se obtuvo 85% de promastigotes metacíclicos por medio de separación con lectina, frente a un 65% de promastigotes metacíclicos por cultivo a medio Schneider pH 5.5.

Cultivo de Promastigote a pH 5.5.	Cultivo de Promastigote purificados con lectina
	

Infección en Hamsters *Mesocricetus auratus*



Observación de fotografías. Aparición de lesiones en almohadilla plantar superior e inferior a partir de 1 mes y tres semanas, confirmación de parásitos, por frotis de lesiones y cultivo de las mismas.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE PROMASTIGOTES

ANOVA UNIFACTORIAL

Coefficients:

	Estimate	Std. Error	t value	Pr(> t)
(Intercept)	116.75556	1.56200	74.748	< 2e-16 ***
bloque[T.100]	-25.14870	1.74637	-14.401	< 2e-16 ***
bloque[T.100c]	-30.55161	1.74637	-17.494	< 2e-16 ***
bloque[T.200]	-28.33907	1.74637	-16.227	< 2e-16 ***
bloque[T.20000c]	-95.63776	1.74637	-54.764	< 2e-16 ***
bloque[T.200c]	-37.13271	1.74637	-21.263	< 2e-16 ***
bloque[T.25]	-4.15916	1.74637	-2.382	0.017368 *
bloque[T.350]	-28.75053	1.74637	-16.463	< 2e-16 ***
bloque[T.50]	-10.72228	1.74637	-6.140	0.0000000107 ***
bloque[T.75]	-16.75953	1.74637	-9.597	< 2e-16 ***
parasito[T.L.(V.) brasiliensis]	-3.27060	0.95652	-3.419	0.000646 ***
parasito[T.L.(V.) peruviana]	-13.56587	0.95652	-14.182	< 2e-16 ***
horas[T.48]	-1.47877	1.10450	-1.339	0.180830
horas[T.72]	-1.19440	1.10450	-1.081	0.279705
horas[T.96]	-0.07349	1.10450	-0.067	0.946956
tipo[T.1=con luz]	-20.91347	0.78100	-26.778	< 2e-16 ***

Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Residual standard error: 14.82 on 1424 degrees of freedom

Multiple R-squared: 0.784,

Adjusted R-squared: 0.7817

F-statistic: 344.6 on 15 and 1424 DF, p-value: < 2.2e-16.

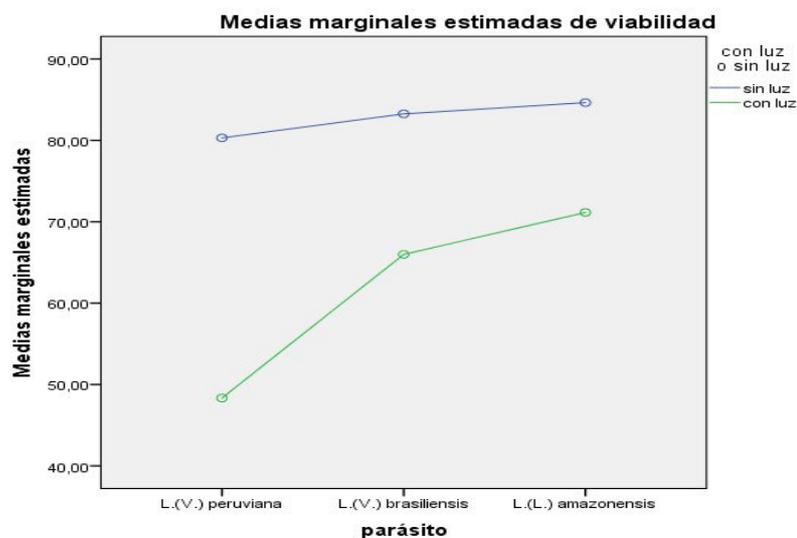
Conclusiones y recomendaciones en término del enunciado.

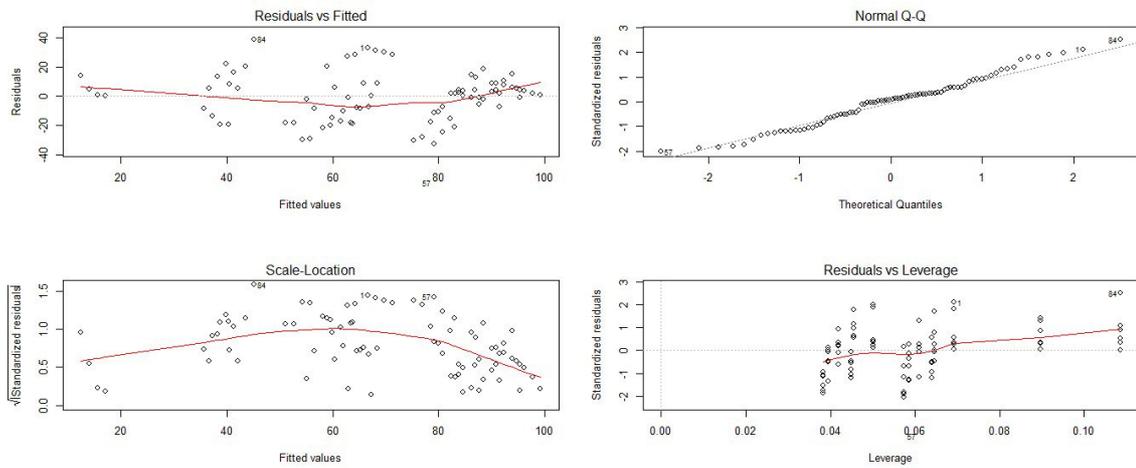
H_0 : $\mu_{ij} = 0$, No existe diferencia de interacción entre los parásitos irradiados (con luz o sin luz) y las concentraciones según las horas de lectura

H_1 : algún $\mu_{ij} \neq 0$ Existe diferencia de interacción entre los parásitos irradiados (con luz o sin luz) y las concentraciones según las horas de lectura

Se ha encontrado suficiente evidencia estadística para rechazar la hipótesis planteada por lo tanto existe diferencia de interacción entre los parásitos irradiados (con luz=1 o sin luz=0) y las concentraciones según las horas de lectura. Según el nivel de significancia, se analizará las especies cuando se encuentran irradiados con luz.

Figura 1: Viabilidad vs nivel de irradiación según las especies de parásitos





Shapiro-Wilk normality test
 $W = 0.9818$, $p\text{-value} = 0.2821$

Variance Score Test

Chisquare = 2.158124 Df = 1 $p = 0.1418178$

A un nivel de significancia del 1%, se acepta la hipótesis de normalidad y de variancia homogénea; es decir los errores tienden a una distribución normal y de variancia constante.

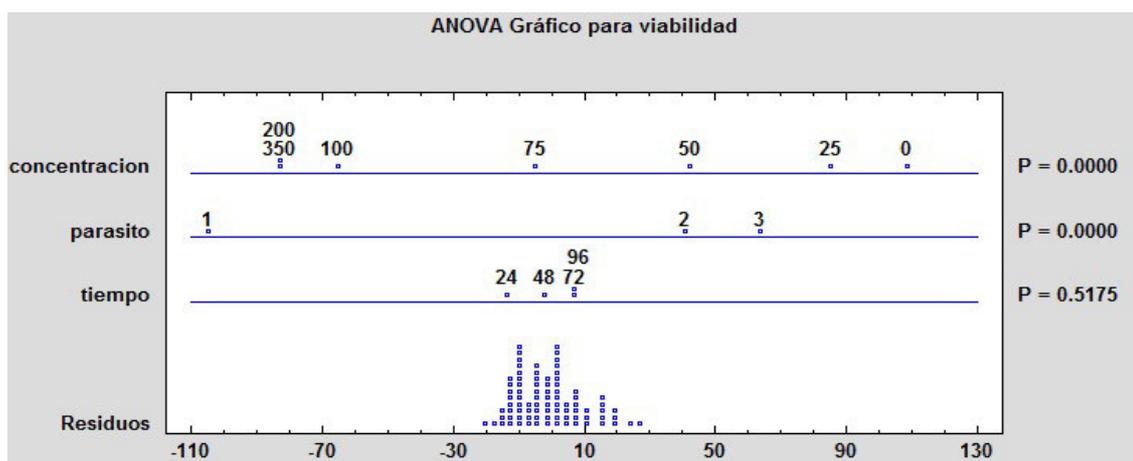
Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:tiempo	271.309	3	90.4363	0.76	0.5175
B:parasito	12953.1	2	6476.53	54.76	0.0000
C:concentración	38697.1	6	6449.52	54.54	0.0000
RESIDUOS	8514.9	72	118.263		
TOTAL (CORREGIDO)	60436.4	83			

Tabla 1: Análisis de Varianza para viabilidad - Suma de Cuadrados Tipo III

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de viabilidad en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 2 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre viabilidad con un 95.0% de nivel de confianza.

Figura 3: ANOVA gráfico para viabilidad



Análisis de Varianza para viabilidad - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:tiempo	271.309	3	90.4363	2.77	0.0557
B:parásito	12953.1	2	6476.53	198.20	0.0000
C:concentración	38697.1	6	6449.52	197.37	0.0000
INTERACCIONES					
AB	2508.58	6	418.097	12.79	0.0000
AC	1908.48	18	106.027	3.24	0.0013
BC	2921.47	12	243.456	7.45	0.0000
RESIDUOS	1176.37	36	32.6769		
TOTAL (CORREGIDO)	60436.4	83			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

La tabla ANOVA descompone la variabilidad de viabilidad en contribuciones debidas a varios factores. Puesto que se ha escogido la suma de cuadrados Tipo III (por omisión), la contribución de cada factor se mide eliminando los efectos de los demás factores. Los valores-P prueban la significancia estadística de cada uno de los factores. Puesto que 5 valores-P son menores que 0.05, estos factores tienen un efecto estadísticamente significativo sobre viabilidad con un 95.0% de nivel de confianza.

Pruebas de Múltiple Rangos para viabilidad por tiempo

Método: 95.0 porcentaje LSD

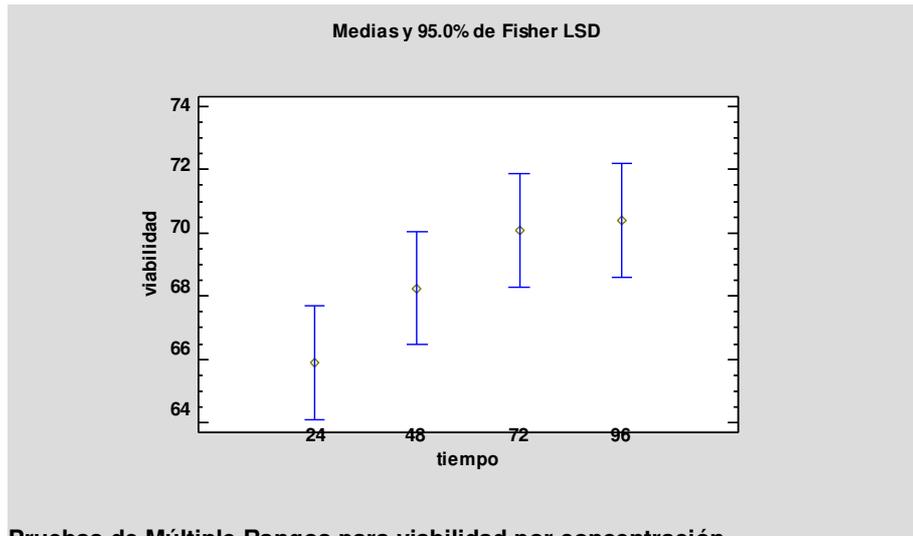
Tiempo	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
24	21	65.8836	1.24742	x
48	21	68.2541	1.24742	xx
72	21	70.082	1.24742	x
96	21	70.3991	1.24742	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
24 - 48		-2.3705	3.57779
24 - 72	*	-4.19841	3.57779
24 - 96	*	-4.51546	3.57779
48 - 72		-1.82791	3.57779
48 - 96		-2.14496	3.57779
72 - 96		-0.317048	3.57779

* indica una diferencia significativa.

Esta tabla aplica un procedimiento de comparación múltiple para determinar cuáles medias son significativamente diferentes de otras. La mitad inferior de la salida muestra las diferencias estimadas entre cada par de medias. El asterisco que se encuentra al lado de los 2 pares indica que estos pares muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel del 95.0% de confianza. En la parte superior de la página, se han identificado 2 grupos homogéneos según la alineación de las X's en columnas. No existen diferencias estadísticamente significativas entre aquellos niveles que compartan una misma columna de X's. El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia mínima significativa (LSD) de Fisher. Con este método hay un riesgo del 5.0% al decir que cada par de medias es significativamente diferente, cuando la diferencia real es igual a 0.

Figura 4: Gráfico de medias según el tiempo evaluado



Pruebas de Múltiple Rangos para viabilidad por concentración

El método empleado actualmente para discriminar entre las medias es el procedimiento de diferencia honestamente significativa (HSD) de Tukey.

Concentracion	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
350	12	44.7875	3.1393	X
200	12	44.8246	3.1393	X
100	12	49.8519	3.1393	X
75	12	67.1434	3.1393	X
50	12	80.7959	3.1393	X
25	12	93.1797	3.1393	XX
0	12	100.0	3.1393	X

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
0 - 25		6.82028	13.4663
0 - 50	*	19.2041	13.4663
0 - 75	*	32.8566	13.4663
0 - 100	*	50.1481	13.4663
0 - 200	*	55.1754	13.4663
0 - 350	*	55.2125	13.4663
25 - 50		12.3839	13.4663
25 - 75	*	26.0363	13.4663
25 - 100	*	43.3278	13.4663
25 - 200	*	48.3551	13.4663
25 - 350	*	48.3923	13.4663
50 - 75	*	13.6524	13.4663
50 - 100	*	30.9439	13.4663
50 - 200	*	35.9713	13.4663
50 - 350	*	36.0084	13.4663

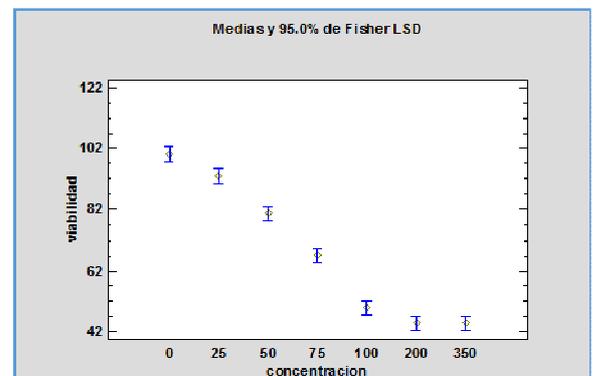


Gráfico de medias según la concentración

75 - 100	*	17.2915	13.4663
75 - 200	*	22.3189	13.4663
75 - 350	*	22.356	13.4663
100 - 200		5.02732	13.4663
100 - 350		5.06446	13.4663
200 - 350		0.0371361	13.4663

* indica una diferencia significativa.

Podemos determinar que las concentraciones 100, 200 y 350 presentan la misma efectividad, es decir entre ellas no hay diferencia significativa.

ANOVA MULTIFACTORIAL – VIABILIDAD CON PARÁSITOS IRRADIADOS

Variable dependiente: viabilidad

Factores:

Tiempo de lectura (72)

Parasito (3 especies)

Concentraciones preparadas de AIPcClS₄ (100 μM, 200 μM) vs las concentraciones comerciales Sb^v (100 μM, 200 μM)

Número de casos completos: 36

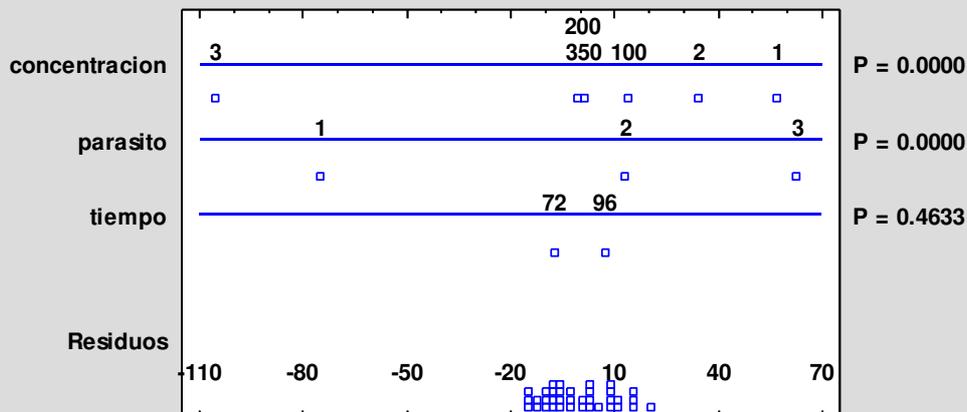
Análisis de Varianza para viabilidad - Suma de Cuadrados Tipo III

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:parasito	2158.62	2	1079.31	9.61	0.0135
B:concentración	1455.16	3	485.052	4.32	0.0605
RESIDUOS	673.602	6	112.267		
TOTAL (CORREGIDO)	4287.38	11			

Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Figura 2: Diagnóstico de supuestos

ANOVA Gráfico para viabilidad



Pruebas de Múltiple Rangos para viabilidad por concentración a tiempo 24 hrs.

Análisis de Varianza para viabilidad - Suma de Cuadrados Tipo III

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
EFECTOS PRINCIPALES					
A:parasito	327.638	2	163.819	10.75	0.0104
B:concentracion	3315.41	3	1105.14	72.49	0.0000
RESIDUOS	91.4709	6	15.2451		
TOTAL (CORREGIDO)	3734.52	11			

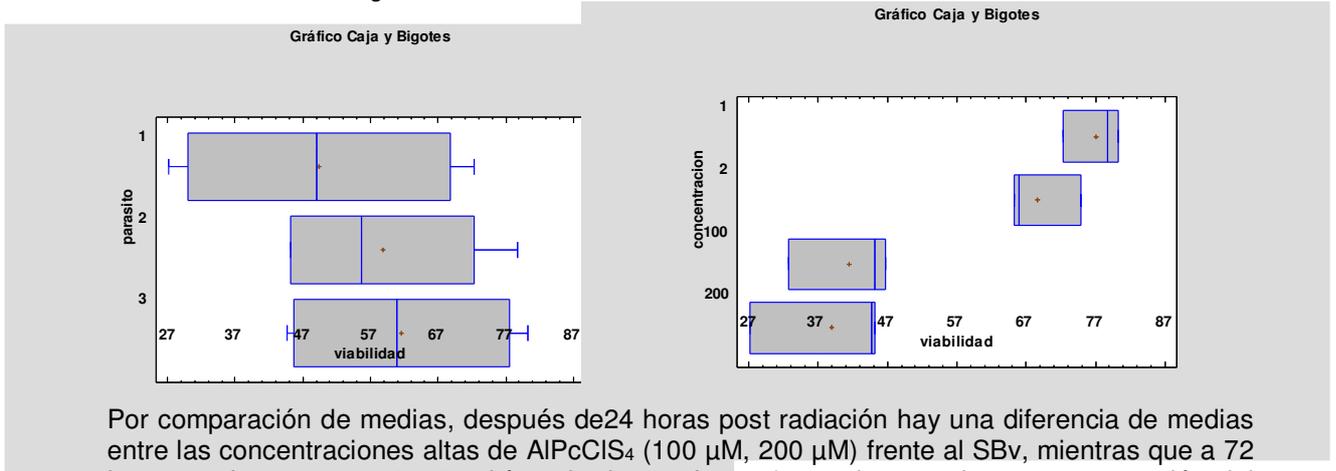
Todas las razones-F se basan en el cuadrado medio del error residual

Método: 95.0 porcentaje LSD

concentracion	Casos	Media LS	Sigma LS	Grupos Homogéneos
200	3	38.9795	2.25427	x
100	3	41.5542	2.25427	x
2	3	68.7179	2.25427	x
1	3	77.1289	2.25427	x

Contraste	Sig.	Diferencia	+/- Límites
1 - 2	*	8.41099	7.80081
1 - 100	*	35.5748	7.80081
1 - 200	*	38.1494	7.80081
2 - 100	*	27.1638	7.80081
2 - 200	*	29.7384	7.80081
100 - 200		2.57461	7.80081

* indica una diferencia significativa.



Por comparación de medias, después de 24 horas post radiación hay una diferencia de medias entre las concentraciones altas de AIPcClS₄ (100 µM, 200 µM) frente al SBv, mientras que a 72 horas, ambos compuestos tendrían el mismo efecto, (en ambos se da una recuperación del parásito).

ANALISIS DE AMASTIGOTE INTRACELULAR

Variable dependiente: Número de amastigotes intracelular o ADN parasitario

Factores:

Concentraciones preparadas

Parásitos (3 especies)

Tiempo de lectura (0 – 72 horas).

Prueba de Normalidad por Shapiro:

		B0	B72	P0	P72	A0	A72
C	w	0.8953368	0.9127600	0.9815164	0.9335181	0.8925808	0.9801866
	p-value	0.4082673	0.4548014	0.9108568	0.60753112	0.3951491	0.9524816
T50	w	0.891950	0.981889	0.7822217	0.9818894	0.9732353	0.9818894
	p-value	0.392186	0.9605550	0.0739726	0.96055496	0.8614037	0.9605550
T75	w	0.934011	0.944838	0.8181725	0.9739969	0.9050807	0.9130500
	p-value	0.618171	0.6983698	0.1390061	0.91812662	0.4567311	0.4567636
T10	w	0.945317	0.9199447	0.9925343	0.9818894	0.8969805	0.9575422
	p-value	0.686996	0.5049626	0.9700710	0.96055496	0.4162162	0.8006124
T20	w	0.924776	0.9979678	0.9872616	0.8095671	0.8909995	0.9385001
	p-value	0.564051	0.9997493	0.9430563	0.07153049	0.3877414	0.6471384

SBV	w	0.9145295	0.9523068	0.8179303	0.7466674	0.9489217	0.9771459
200	p-value	0.506726	0.758916	0.1384580	0.01847539	0.7093876	0.9365231

Prueba de homogeneidad de varianza por Bartlet (chi-squared (0.95,5))= 11.0705

	B0	B72	P0	P72	A0	A72
K-squared	3.065673	7.397509	2.254185	39.881264	2.447565	6.731975
P-value	6.896e-01	1.923e-01	8.1298e-01	1.5780e-07	7.8437e-01	2.4134e-01

Prueba de homogeneidad de varianza por levene (menor efecto de la normalidad), F-value (0.95,5,5) = 5.050329

	B0	B72	P0	P72	A0	A72
F	1.875630	2.089422	2.098429	2.599336	1.205660	1.588307
Pr	0.14884366	0.0943897	0.11276554	0.0455420	0.34609986	0.19358989

Dado que tiene una distribución no normal se aplicó Kruskal wallis comparaciones multiples.

(p> 0.05) Ho: Hipótesis nula: medianas son iguales, los grupos pertenecen a una misma población
 (P<0.05) H1: Hipótesis alternativa: medianas no son iguales y hay diferencias

Leishmania (V.) braziliensis

Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
 d2\$grupos 5 620.9 124.18 71.38 9.69e-16 ***
 Residuals 30 52.2 1.74
 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tratamiento	signif.level	dif.com.obs.dif	dif.com.critical.dif	dif.com.diffe	P value
C-S200	0.05	26.3333333	17.8541213	TRUE	0.00000
C-T100	0.05	14.5	17.8541213	FALSE	0.0000029
C-T200	0.05	19.1666667	17.8541213	TRUE	0.000000
C-T50	0.05	1.33333333	17.8541213	FALSE	0.6251573
C-T75	0.05	6.66666667	17.8541213	FALSE	0.0111643
S200-T100	0.05	11.8333333	17.8541213	FALSE	0.00000
S200-T200	0.05	7.16666667	17.8541213	FALSE	0.00250
S200-T50	0.05	25	17.8541213	TRUE	0.004623
S200-T75	0.05	19.6666667	17.8541213	TRUE	0.000000
T100-T200	0.05	4.66666667	17.8541213	FALSE	0.0004198
T100-T50	0.05	13.1666667	17.8541213	FALSE	0.0002172
T100-T75	0.05	7.83333333	17.8541213	FALSE	0.0509838
T200-T50	0.05	17.8333333	17.8541213	FALSE	0.000000
T200-T75	0.05	12.5	17.8541213	FALSE	0.000000
T50-T75	0.05	5.33333333	17.8541213	FALSE	0.3164461

Concentraciones de TFD- 100. TFD-200, SB^y 200 tienen un efecto sobre amastigote intracelular.
Leishmania (V.) peruviana

Df Sum Sq Mean Sq F value Pr(>F)
 d2\$grupos 5 347.0 69.40 74.97 **4.94e-16** ***
 Residuals 30 27.8 0.93
 Signif. codes: 0 '***' 0.001 '**' 0.01 '*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

row.names	signif.level	dif.com.obs.dif	dif.com.critical.dif	dif.com.diff	P value
C-S200	0.05	27.8333333	17.8541213	TRUE	0.00000
C-T100	0.05	15.6666667	17.8541213	FALSE	0.0001034
C-T200	0.05	21.8333333	17.8541213	TRUE	0.000000
C-T50	0.05	3.5	17.8541213	FALSE	0.9994858
C-T75	0.05	8.1666667	17.8541213	FALSE	0.0967746
S200-T100	0.05	12.1666667	17.8541213	FALSE	0.00000
S200-T200	0.05	6	17.8541213	FALSE	0.00000
S200-T50	0.05	24.3333333	17.8541213	TRUE	0.00000
S200-T75	0.05	19.6666667	17.8541213	TRUE	0.0000328
T100-T200	0.05	6.1666667	17.8541213	FALSE	0.0387922
T100-T50	0.05	12.1666667	17.8541213	FALSE	0.0000422
T100-T75	0.05	7.5	17.8541213	FALSE	0.1144557
T200-T50	0.05	18.3333333	17.8541213	TRUE	0.000000
T200-T75	0.05	13.6666667	17.8541213	FALSE	0.000000
T50-T75	0.05	4.6666667	17.8541213	FALSE	0.047817

P>0.05, no existe diferencia significativa entre las medianas. Concentraciones de TFD- 100. TFD-200, SB^y 200 tienen un efecto sobre amastigote intracelular

Leishmania (L.) amazonensis

Df Sum Mean Sq F value Pr(>F)
 D2\$grupos 5 921.7 184.35 109.2 **<2e-16** ***
 Residuals 30 50.7 1.69

row.names	signif.level	dif.com.obs.dif	dif.com.critical.dif	dif.com.diff	P value
C-S200	0.05	26.3333333	17.8541213	TRUE	0.0000
C-T100	0.05	13.8333333	17.8541213	FALSE	0.0001755
C-T200	0.05	19.6666667	17.8541213	TRUE	0.0000003
C-T50	0.05	0.1666667	17.8541213	FALSE	0.9574640
C-T75	0.05	8.3333333	17.8541213	FALSE	0.1464984
S200-T100	0.05	12.5	17.8541213	FALSE	0.0000000
S200-T200	0.05	6.6666667	17.8541213	FALSE	0.0000000
S200-T50	0.05	26.5	17.8541213	TRUE	0.0000000
S200-T75	0.05	18	17.8541213	TRUE	0.0000000
T100-T200	0.05	5.8333333	17.8541213	FALSE	0.1894201
T100-T50	0.05	14	17.8541213	FALSE	0.0017628
T100-T75	0.05	5.5	17.8541213	FALSE	0.1109987
T200-T50	0.05	19.8333333	17.8541213	TRUE	0.0000024
T200-T75	0.05	11.3333333	17.8541213	FALSE	0.002560

T50-T75	0.05	8.5	17.8541213	FALSE	0.5464827
---------	------	-----	------------	-------	-----------

$P > 0.05$, no existe diferencia significativa entre las medianas. Concentraciones de TFD- 100, TFD-200, SB^y 200 tienen un efecto sobre amastigote intracelular.

Dado que en los tres grupos aparece una diferencia significativa, procedemos a comparar por pareja entre los tratamientos para saber cuáles tienen mayor o menor toxicidad por el test de Dunns.

TEST DE DUNNS

($p > 0.05$) H_0 : Hipótesis nula: no hay diferencia significativa entre los grupos
 ($p < 0.05$) H_1 : Hipótesis alternativa: si hay diferencia significativa entre los grupos.

L.(V.) braziliensis

data: x and group

Kruskal-Wallis chi-squared = 29.5465, df = 5, p-value = 0

Col Mean- Row Mean	C	S200	T100	T200	T50
S200	q=4.329173				
	p= 0.0000*				
T100	q= 2.383785	q= -1.945388			
	p= 0.0086*	p= 0.0259			
T200	q= 3.150980	p=-1.178192	p=0.767195		
	p= 0.0008*	q= 0.1194	q= 0.2215		
T50	q=0.219198	q=-4.109974	q=-2.164586	q= -2.931781	
	p= 0.4132	p=0.0000*	p= 0.0152*	p= 0.0017*	
T75	q=1.095993	q= -3.233180	q=-1.287792	q=-2.054987	q=0.876794
	p=0.1365	p= 0.0006*	p= 0.0989	p= 0.0199*	p= 0.1903

TFD 100 – TFD 200, al tener un valor de q positivo, indica que T 100 tiene más ADN parasitario que T- 200, por ende T 200 es más tóxico.

S200 tiene un valor de q negativo, indicando que S 200 tiene menos ADN parasitario que TFD-100, TFD-200, por lo que tiene mayor toxicidad.

L.(V.) peruviana

data: x and group

Kruskal-Wallis chi-squared = 31.7669, df = 5, p-value = 0

Comparison of x by group

(No adjustment)

Col Mean- Row Mean	C	S200	T100	T200	T50
S200	q= 4.57606				
	p= 0.0000*				
T100	q= 2.575749	q= -2.000316			
	p= 0.0050*	p= 0.0227*			
T200	q=3.589608	q= -0.986457	q=1.013858		
	p= 0.0002*	p= 0.1620	p=0.1553		
T50	q=0.575433	q=-4.000632	q=-2.000316	q=-3.014175	
	p= 0.2825	p=0.0000*	p= 0.0227*	p= 0.0013*	
T75	q= 1.342678	q=-3.233388	q= -1.233071	q=-2.246930	q= 0.767244
	p= 0.0897	p=0.0006*	p=0.1088	p= 0.0123*	p= 0.2215

TFD 100 – TFD 200, al tener un valor de q positivo, indica que T 100 tiene más ADN parasitario que T- 200, por ende T 200 es más tóxico.

S200 tiene un valor de q negativo, indicando que S 200 tiene menos ADN parasitario que TFD-100, TFD-200, por lo que tiene mayor toxicidad.

L.(V.) amazonensis

data: x and group

Kruskal-Wallis chi-squared = 30.8318, df = 5, p-value = 0

Comparison of x by group

(No adjustment)

Col Mean-/ Row Mean	C	S200	T100	T200	T50
S200	q= 4.329173				
	p= 0.0000*				
T100	q=2.274185	q=-2.054987			
	p= 0.0115*	p= 0.0199*			
T200	q=3.233180	q=-1.095993	q=0.958994		
	p=0.0006*	p=0.1365	p=0.1688		
T50	q=-0.027399	q=-4.356573	q=-2.301585	q=-3.260579	
	p= 0.4891	p=0.0000*	p=0.0107*	p=0.0006*	
T75	q=1.369991	q=-2.959181	q= -0.904194	q=- 1.863188	q= 1.397391
	P=0.0853	p=0.0015*	p=0.1829	p= 0.0312	p=0.0811

TFD 100 – TFD 200, al tener un valor de q positivo, indica que T 100 tiene más ADN parasitario que T- 200, por ende T 200 es más tóxico.

S200 tiene un valor de q negativo, indicando que S 200 tiene menos ADN parasitario que TFD-100, TFD-200, por lo que tiene mayor toxicidad.