



Martinetti Montanari, Jorge Aníbal

Aplicación tópica de liposomas ultradeformables para terapia fotodinámica contra Leishmaniasis cutánea



Esta obra está bajo una Licencia Creative Commons Argentina.
Atribución - No Comercial - Sin Obra Derivada 2.5
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/2.5/ar/>

Documento descargado de RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes de la Universidad Nacional de Quilmes

Cita recomendada:

Martinetti Montanari, J. A. (2009). *Aplicación tópica de liposomas ultradeformables para terapia fotodinámica contra Leishmaniasis cutánea. (Tesis de doctorado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina. Disponible en RIDAA-UNQ Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto de la Universidad Nacional de Quilmes <http://ridaa.unq.edu.ar/handle/20.500.11807/124>*

Puede encontrar éste y otros documentos en: <https://ridaa.unq.edu.ar>

Aplicación Tópica de Liposomas UltraDeformables para Terapia Fotodinámica contra Leishmaniasis Cutánea

TESIS DOCTORAL

Jorge A. Martinetti Montanari

jmontanari@unq.edu.ar

Resumen

La Leishmaniasis aun en el año 2009 sigue siendo un problema sin solución. Al presente existen 12 millones de personas infectadas en 88 países, con una incidencia de 2.000.000 personas infectadas/año, de las cuales 500.000 sufren leishmaniasis visceral, y el restante millón y medio leishmaniasis cutánea (LC). A diferencia de lo que ocurre en Europa y en África, la LC del Nuevo Mundo (América) no cura espontáneamente, y luego de tratamientos prolongados y dolorosos, donde se inyecta intra-lesionalmente la medicación, es posible que la enfermedad evolucione hacia la forma desfigurante e inhabilitante mucocutánea. Convencionalmente, la LC se trata con soluciones de antimoniales pentavalentes (Glucantime, Pentostam), que son muy tóxicos y que además de generar resistencia, son poco efectivos para llegar hasta los nidos de amastigotes que se ubican en los fagosomas de los macrófagos de la epidermis profunda.

Esta tesis presenta un nuevo concepto aplicable al tratamiento de la LC, que sería de máxima competencia como agente preventivo (antes de la aparición de las lesiones del estrato corneo (SC)): el empleo de terapia fotodinámica (TFD) usando luz del sol como fuente de energía, para eliminar los parásitos que se hallan a una profundidad máxima de unos 150 micrones de la superficie de la piel. Esta TFD, a diferencia de las convencionales, no se administraría parenteralmente sino **tópicamente**, es decir podría ser aplicada por el mismo paciente, en cualquier momento. También a diferencia de la TFD convencional, no sería activada por *lasers*, sino que solo requeriría de la luz solar para hacerlo. Esto es posible debido al enorme valor de la constante solar S de 80-100 mW/cm². Una constante solar tan elevada permite, luego de una irradiación de tan solo 1 minuto, obtener una tasa de fluencia sobre la superficie de la piel de = 4,8-6 J/cm². (En esta elaboración experimental, hemos tenido en cuenta que una tasa de fluencia de 2-3 J/cm² es suficiente para que ftalocianinas de Aluminio dañen promastigotes y amastigotes axénicos de *Leishmania spp.*). Asimismo, las ftalocianinas tienen un máximo de absorción en la zona de los 680 nm, una longitud de onda cercana al NIR (near infrared). La irradiación en zona NIR es la que tiene máxima penetración en tejidos, por lo que estimativamente las capas celulares de la piel no interferirían en la absorción de ftalocianinas. Para conseguir que las ftalocianinas contacten los amastigotes de la epidermis profunda en la infección asintomática temprana, se las incorporará en nano-sistemas de entrega de drogas, (nanoSED), del tipo liposomas ultradeformables (LUD).

El presente trabajo consistió en desarrollar liposomas ultradeformables (LUD) a los que se incorporaron ftalocianinas de Zn tanto hidrofílicas como hidrofóbicas (ZnPc y ZnPcMet, respectivamente). Ambas ftalocianinas mantuvieron (–e incluso la ZnPc incrementó) su rendimiento cuántico de generación de oxígeno *singlete* una vez incorporadas en liposomas ultradeformables (LUD) (0,61 en LUD para ZnPcMet vs 0,8 en etanol) en tanto su rendimiento cuántico de fluorescencia se mantuvo bajo (0,20 tanto en LUD como en etanol para ZnPcMet) . Se concluyó en particular que la incorporación a LUD permitió incrementar la concentración de ZnPcMet en medio acuoso, manteniendo su estado monomérico. Asimismo, la ultradeformabilidad de los liposomas (medida como área bajo la curva de un gráfico de flujo de fosfolípidos vs tiempo, al extruir una suspensión liposomal a través de membranas de policarbonato de 50 nm poro bajo una presión de 0,8 MPa) quedaba intacta luego de la incorporación de ZnPcMet, siendo unas 30 veces más deformable que liposomas convencionales. A continuación, se determinaron tanto citotoxicidad sobre diferentes líneas celulares de mamífero, empleando métodos de MTT, LDH, así como inducción de stress oxidativo, tanto luego de iluminación (artificial a una densidad de energía de 15J/cm²) como en oscuridad. Estos resultados, que fueron publicados casi en su totalidad en *International Journal of Pharmaceutics* 330 (2007) 183–194, J. Montanari , A.P. Perez , F. Di Salvo , V. Diz , R. Barnadas, L. Dixelio, F. Doctorovich , M.J. Morilla, E.L. Romero, *Photodynamic ultradeformable liposomes: Design and characterization* nos permitieron avanzar sobre los aspectos relativos a la conservación de los LUD luego de su deshidratación. Remarcablemente, la deshidratación de LUD había sido un problema insoluble hasta el momento, ya que la clásica deshidratación en presencia de azúcares efectiva para liposomas

convencionales, no es aplicable a las matrices LUD. El hallazgo de las condiciones adecuadas de deshidratación y una sencilla explicación de los resultados se publicó en *International Journal of Pharmaceutics* 372 (2009) 184–190. Montanari, D.I. Roncaglia, L.A. Lado, M.J. Morilla, E.L. Romero *Avoiding failed reconstitution of ultradeformable liposomes upon dehydration*

Se desarrolló un modelo matemático que permitió calcular rápidamente el número de vesículas que componen una población liposomal, únicamente contando con datos de concentración lipídica y de tamaño de vesícula. La importancia de esta información, radica en que gran parte de la actividad citotóxica en general y leishmanicida en particular (excluyendo la toxicidad por acción superficial), puede adjudicarse al número de eventos endocíticos/tiempo que llevan a cabo las células, y al número de vesículas disponible/volumen. Por lo tanto contar con un estimativo del número LUD que se incuban en un experimento, permite ajustar con precisión las condiciones de trabajo de modo de hacerlas lo más exactas posibles.

Este modelo matemático ha sido enviado a publicar a *Journal of Liposome Research* (2009).

Para determinar la profundidad de penetración de LUD vs liposomas convencionales, se adaptó el modelo de penetración de Saarbrücken al modo no oclusivo, y se llevaron a cabo incubaciones de 1 y 5 horas de LUD y liposomas convencionales marcados fluorescentemente tanto en su matriz lipídica como en su contenido acuoso interno, sobre piel humana de origen quirúrgico. Esto se completó con la determinación de penetración sobre estrato corneo (SC) por *tape stripping*, del contenido acuoso interno tanto de LUD como de liposomas convencionales. Se halló que los LUD penetraban a través del SC, en tanto que los liposomas convencionales quedaban retenidos en la superficie del SC.

Finalmente, y como prueba conceptual se determinó la actividad leishmanicida de LUD-FT sobre promastigotes y sobre amastigotes de *Leishmania braziliensis*, luego de 15 minutos de irradiación solar. Por primera vez pudimos demostrar una importante actividad leishmanicida para los promastigotes aplicando únicamente luz de sol. Restan ajustar las condiciones de irradiación sobre amastigotes en células de mamíferos, sobre los que se halló una importante actividad citotóxica *no fotoquímica* de los LUDZnPCMET, que resultó entre dos y tres veces superior a la generada por la ZnPCMET cuando irradiada. Sin embargo, la prueba de concepto ha resultado más que exitosa si consideramos que estos resultados son los primeros que muestran como es posible cambiar rotundamente un tráfico intracelular de FT de modo de inducir toxicidad sobre un parásito intracelular como las leishmanias. Nunca hasta el momento se había empleado exitosamente la luz del sol como fuente de energía para eliminar parásitos de leishmania y estos resultados, además de originales, podrían generar un profundo avance en términos de terapéutica antiparasitaria eficaz y de fácil aplicación para una epidemia que afecta tanto a América como a África y Europa mediterránea. Estos resultados, junto con los de penetración en piel se han enviado a publicar a *Journal of Controlled Release*, 2009.

ÍNDICE

Prefacio

1. Introducción

1.1. Leishmaniasis: etiología y ciclo de vida de Leishmania

1.2. Tratamiento convencional y alternativas de segunda línea, y nano-sistemas de entrega de drogas

1.2.1. Tratamiento convencional de leishmaniasis: antimoniales pentavalentes (Sb (v))

1.2.2. Tratamientos alternativos: segunda línea

1.2.3. Nanomedicina: Sistemas de Entrega de Drogas (nano-SED) y leishmaniasis

1.3. Estrato córneo (SC): Barrera impermeable de la piel

1.4. Liposomas ultradeformables (LUD)

1.5. Terapia fotodinámica (TFD)

1.5.1. Fotosensibilizadores y especies reactivas del oxígeno (ERO)

1.5.2. Fotosensibilizadores de segunda generación - Ftalocianinas

1.5.3. Activación de fotosensibilizadores

1.5.4. TFD y nano-SED. Fotosensibilizadores de tercera generación

1.5.5. Aplicaciones de TFD

1.5.6. TFD y Leishmaniasis cutánea (LC)

1.6. Objetivos

2. Liposomas ultradeformables fotodinámicos: Diseño y caracterización

2.1 Introducción

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Materiales

2.2.2. Preparación de las ftalocianinas

2.2.2.1 [Tetrakis (2,4-dimetil-3-pentiloxi)-ftalocianinato] de zinc (II)

2.2.2.2 [Tetrakis (N, N, N-trimetilamonioetoxi)-ftalocianinato] de zinc (II) tetraioduro

2.2.3. Preparación de liposomas ultradeformables

2.2.4. Caracterización fisicoquímica de las ftalocianinas liposomales

2.2.5. Calorimetría diferencial de barrido

2.2.6. Test de deformabilidad

2.2.7. Caracterización fotoquímica de las ftalocianinas libres y liposomales

2.2.7.1. Espectroscopia de absorción y emisión de fluorescencia

2.2.7.2 Rendimiento cuántico de fluorescencia

2.2.7.3. Rendimiento cuántico de oxígeno singlete

2.3. Resultados

2.3.1 Caracterización fisicoquímica de las ftalocianinas liposomales

2.3.2. Mediciones calorimétricas

2.3.3. Ensayo de deformabilidad

2.3.3.1. Deformabilidad liposomal

2.3.3.2. Grado de retención de contenido acuoso (RD)

2.3.4. Caracterización espectroscópica

2.4. Discusión

3. Un modelo sencillo para la predicción del número de vesículas de una suspensión liposomal unilamelar

3.1. Introducción

3.2. Materiales y métodos

3.2.1 Materiales

3.2.2 Preparación liposomal

3.2.3 Desarrollo teórico del cálculo

3.2.4 Conteo directo de liposomas

3.3. Resultados

3.3.1 Medidas de tamaño

3.3.2 Resultados teóricos

3.3.3 Recuento de liposomas

3.4 Discusión

4. Una solución a la reconstitución fallida de liposomas ultradeformables tras su deshidratación

4.1. Introducción

4.2. Materiales y métodos

4.2.1 Materiales

4.2.2 Preparación liposomal

4.2.3 Condiciones de secado

4.2.3.1. Liofilización

4.2.3.2. Secado al vacío

4.2.3.3. Secado por "Speed vac"

4.2.4. Caracterización liposomal

4.2.4.1. Turbidez

4.2.4.2. Tamaño

4.2.4.3. Pérdida de contenido

4.2.4.4. Ensayo de deformabilidad

4.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía electrónica de barrido

4.2.6. Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

4.3. Resultados

4.3.1. Secado, rehidratación y caracterización

4.3.2. Pérdida de contenido

4.3.3. Ensayo de deformabilidad

4.3.4. Microscopía electrónica de barrido y mediciones calorimétricas

4.3.5 Estudio por Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

4.4. Discusión

5. Penetración cutánea de liposomas ultradeformables

5.1. Introducción

5.2. Materiales y métodos

5.2.1 Materiales

5.2.2. Preparación liposomal

5.2.3. Caracterización de LUD-QD y QD

5.2.3.1 Tamaño

5.2.3.2. Microscopias de transmisión electrónica

5.2.3.3. Test de ultradeformabilidad

5.2.4. Preparación de la piel

5.2.5. Ensayo de penetración

5.2.5.1. Dispositivo de penetración y montaje de la piel

5.2.5.2. Aplicación e incubación de la muestra

5.2.6. Remoción de capas de piel por cinta adhesiva (Tape stripping)

5.2.7. Extracción y cuantificación de HPTS

5.2.8. Preparación y obtención de imágenes por microscopía confocal láser de fluorescencia

5.2.8.1. Obtención de cortes transversales de los explantos

5.2.8.2. Observación de cortes transversales con doble marca por microscopía confocal

5.2.8.3. Seccionamiento óptico por microscopía confocal

5.3. Resultados

5.3.1. Penetración in vitro

5.3.2. Penetración en función del tiempo de incubación: 1 vs 5 hs

5.3.3. Caracterización de LUD-QD y QD

5.3.4. Penetración de LUD-QD y QD

5.4. Discusión

6. Actividad anti-leishmánica in vitro fotodinámicos de liposomas ultradeformables

6.1. Introducción

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Materiales

6.2.2. Preparación liposomal

6.2.3 Ensayos de citotoxicidad y captura celular

6.2.3.1. Determinación de citotoxicidad por medición de actividad deshidrogenasa mitocondrial

6.2.3.2. Determinación de citotoxicidad por medición de lactato deshidrogenasa

6.2.3.3. Determinación de estrés oxidativo por medición de glutatión reducido

6.2.3.4. Captura celular de liposomas y destino del HPTS liposomal tras irradiación

6.2.4. Determinación de actividad anti-promastigote

6.2.5. Ensayos de captura liposomal por promastigotes

6.2.5.1. Ensayos de captura de LUD-ZnPc

6.2.5.2. Ensayos de captura de LUD con doble marca fluorescente

6.2.6. Determinación de actividad anti-amastigote intracelular

6.3. Resultados

6.3.1 Citotoxicidad

6.3.2. Captura liposomal celular y destino del HPTS liposomal tras irradiación

6.3.3 Actividad anti-promastigote

6.3.4. Captura de LUD por promastigotes

6.3.5. Actividad anti-amastigote intracelular

6.4. Discusión

7. Conclusiones finales

Referencias

Prefacio

En esta tesis se resumen los frutos principales de cinco años de mi trabajo como científico. Cinco años es un período de tiempo que puede parecer muy largo, pero que a veces en la vida se escapa casi sin tomar nota de ello. En mi caso, he tomado nota y notas, y aquí las presento al resto de la Comunidad.

A toda la gente que me acompañó en este tiempo, en mayor o en menor medida, al principio, en el medio o al final, de muchas maneras diferentes, va toda mi gratitud. Este agradecimiento trasciende las personas físicas e incluye por ende a la institución de la educación pública y gratuita, y tratará de ser retribuido por mi parte con la contribución a la parte biyectiva de esta relación Universidad-Sociedad.

Cuando esperaba el comienzo del 2000, en las postrimerías del '99 me cansaba de escuchar que la fecha que se avecinaba no tenía nada de especial, que sería un día más como cualquier otro y ya... ¿Cómo que iba a ser un día más? ¡Era un día que desde hacía unos 20 años venía esperando e imaginando, construyendo y deconstruyendo en mi mente! Un día que sabía que iba a llegar y que yo iba a mirar y a respirar y a sentir y a percibir en toda su esencia. Nunca había pensado antes en qué haría por ejemplo el 2 de junio de 1999 o el 3 de marzo de 2001, pero sí estaba seguro de que un día habría de esperar, sentir y vivir la llegada del 2000. Del mismo modo, desde que mis maestros de la divulgación científica –los mediáticos y los de mi casa- me inculcaron el placer de esa persecución de lo que está más allá de lo visible a través del ejercicio de la ciencia y del pensamiento crítico, sabía aún siendo muy chico que iba a llegar este día, en el cual yo experimentase este sentimiento pleno y maduro, esta identidad plena de hombre de Ciencia. El llegar aquí es la consecución de todo un camino que hubo en medio, y que como en las funciones de estado, puedo dejar de considerar por un instante sus vericuetos para simplemente sentir la dicha de haber alcanzado este punto final, que por cierto no es más que el punto inicial de algo más grande... como en Casablanca, que también termina con un comienzo.

JM

El presente trabajo fue desarrollado por el doctorando desde abril de 2005 hasta mayo de 2009 bajo la dirección de la Dra. Eder Lilia Romero y la co-dirección de la Dra. María José Morilla dentro del marco del Programa de Nanomedicinas de la Universidad Nacional de Quilmes (UNQ), siendo el Laboratorio de Diseño de estrategias de Targeting de Drogas (LDTD) de la UNQ el centro principal de investigación. Asimismo, se realizaron actividades de investigación en colaboración con el Departamento de Química Inorgánica, Analítica y Química Física/INQUIMAE-CONICET, (Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires), el Centre de Estudis Biofísics (Universitat Autònoma de Barcelona, Catalunya, España), el Departament de Físicaquímica, Facultat de Farmàcia (Universitat de Barcelona, Catalunya, España), el Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chabén, y el Departamento de Parasitología de la Facultad de Ciencias Médicas de la Universidad Nacional de Cuyo. El doctorando ha sido beneficiado con una beca del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET), organismo del cual forman parte también la directora y co-directora de esta tesis como miembros de la Carrera del Investigador Científico.

Como fruto de las investigaciones llevadas a cabo en el marco de esta tesis, se han publicado los siguientes artículos en revistas internacionales con referato:

J. Montanari, D.I. Roncaglia, L.A. Lado, M.J. Morilla, E.L. Romero "Avoiding failed reconstitution of ultradeformable liposomes upon dehydration "(International Journal of Pharmaceutics, Volume 372, Issues 1-2, 8 May 2009, Pages 184-190). Impact Factor 2008: 3,0

J. Montanari; A.P. Perez; F. Di Salvo; V. Diz; R. Barnadas; L. Dicelio; F. Doctorovich; M. J. Morilla; E. L. Romero. "Photodynamic ultradeformable liposomes: design and characterization". (International Journal of Pharmaceutics, Elsevier Ltd., 2007 Feb 7; 330(1-2):183-94). Impact Factor 2008: 3,0

El artículo "Photodynamic ultradeformable liposomes: design and characterization" fue a su vez citado hasta la fecha en 3 oportunidades, en las publicaciones Journal of Controlled Release (Impact Factor 2007: 4,756); International Journal of Pharmaceutics (Impact Factor 2008: 3,0) y Photochemistry and Photobiology (Impact Factor 2007: 2,172)

Asimismo al momento de la publicación de esta tesis, han sido enviados para su evaluación los siguientes artículos:

Montanari, J., Salomón, C., Esteva, M., Maidana, C., Lado, L., Rivadeneyra, L., Morilla M.J., Romero, E.L. "*in vitro* leishmanicidal activity triggered by sunlight exposition of photodynamic ultradeformable liposomes", *Journal of Controlled Release*, 2009

Montanari, J., Morilla M.J., Romero, E.L. "A model based in the ratio of liposomal surface can predict the number of unilamellar liposomes", *Journal of Liposome Research*, 2009

Las comunicaciones en reuniones científicas efectuadas por el doctorando durante el progreso de su trabajo han sido las siguientes:

Jorge A. M. Montanari, Leandro A. Lado, Leonardo Rivadeneyra, María J. Morilla, Eder L. Romero; "PENETRATION OF STRATUM CORNEUM BY DOUBLE-LABELLED ULTRADEFORMABLE LIPOSOMES EMPLOYING A NON-OCCLUSIVE TECHNIQUE"; "Skin and Formulation, 3rd Symposium – Skin Forum, 10 th Annual Meeting", March 2009, Versailles, Francia

MONTANARI, Jorge A.M.; MORILLA, M.J.; ROMERO, E.L.. "Ultradeformable liposomes à la carte: the Last Supper for Leishmania braziliensis promastigotes", "7th Conference and Workshop on Biological Barriers and Nanomedicine – Advanced Drug Delivery and Predictive non vivo Testing Technologies", Saarland University, Saarbrücken, Alemania. Febrero 2008.

Jorge A. M. MONTANARI, Cristina MAIDANA, Mónica ESTEVA, María J. MORILLA, Eder L. ROMERO. "Nanomedicinas antiparasitarias: acción antileishmánica inmediata promovida por liposomas ultradeformables", Reunión anual SAFyBI, 2007

"Design of ultradeformable liposomes as nanovehicles for phthalocyanines". Montanari, Jorge₁; Perez, Ana P₁; Di Salvo, Florencia₂; Doctorovich, Fabio₂; Morilla, María J₁; Romero, Eder₁ (₁=Laboratorio de Diseño de estrategias de Targeting de Drogas (LDTD), Universidad Nacional de Quilmes, R.Sáenz Peña 180, Bernal (1876), Buenos Aires; ₂=INQUIMAE). Pinamar, Noviembre 2005, XLI Reunión Anual de SAIB, revista Biocell, vol 29, suplemento I, 2005.

"UltraDeformable archaeosomes (UDa): a new concept on multifunctional nano-platforms against cutaneous leishmaniasis". Higa LH, Montanari JA, Morilla MJ, Romero EL; "2nd European Conference for Clinical Nanomedicine", April 2009, Basel, Suiza.

"Photoactivity of ultradeformable liposome of Aluminium phthalocyanine chloride on promastigotes of Leishmania chagasi and THP-1 macrophages" Indira Hernandez, Eder Romero, Wilfredo Valdivieso, Jorge Montanari, Maria Jose Morilla, Fernando Martinez, Edgar Páez y Patricia Escobar. "WorldLeish 4, 4th World Congress on Leishmaniasis", Febrero 2009, Lucknow, India.

En el marco de esta instancia académica, el doctorando ha participado de las siguientes jornadas y cursos de posgrado:

Skin and Formulation, 3rd Symposium – Skin Forum, 10 th Annual Meeting", March 2009, Versailles, Francia

Curso internacional de posgrado: "I Escola de Nanotubos de Carbono: ciência e aplicações", Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Brasil, duración 20 hs, octubre 2008. Calificación: 10

Curso teórico-práctico de doctorado: "1er curso Iberoamericano de biocatálisis aplicado a la Química Verde", Universidad Nacional de Quilmes, duración 55 horas, setiembre 2008. Calificación: 9

"7th Conference and Workshop on Biological Barriers and Nanomedicine – Advanced Drug Delivery and Predictive non vivo Testing Technologies", Saarland University, Saarbrücken, Alemania, duración 55 horas, febrero 2008

Curso teórico-práctico internacional de posgrado: "Segunda Escola Brasileira de Nanobiotecnología", Universidade do Vale do Itajaí (UNIVALI), Brasil, duración 40 horas, noviembre 2007

Curso teórico-práctico: "Entrenamiento en Secado por aspersion y sus aplicaciones en la industria farmacéutica", Coordinador: Ing. Orestes Darío López Hernández (Cuba). Laboratorios Gador S.A., duración 40 hs. setiembre 2007

Curso de posgrado con puntaje para doctorado: “Transiciones de Fase y Estado en Biomateriales”, Depto de Industrias, Universidad de Buenos Aires, duración 65 hs. noviembre-diciembre 2006.

Curso de posgrado con puntaje para doctorado: “1er Workshop en Microscopía de Fluorescencia 3D”, Facultad de Ingeniería – Bioingeniería, Universidad Nacional de Entre Ríos (UNER), julio 2005. Calificación: Distinguido (8)

“Caracterización y estabilidad de sistemas dispersos”, Jornadas Científico-Técnicas celebradas en la Facultat de Farmacia de la Universitat de Barcelona, 2005.

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN: LEISHMANIASIS, LIPOSOMAS ULTRADEFORMABLES Y TERAPIA FOTODINÁMICA

1.1. Leishmaniasis: etiología y ciclo de vida de *Leishmania*

La leishmaniasis engloba a un conjunto de enfermedades causadas por el protozoo *Leishmania* (un género de la familia *Trypanosomatidae*, perteneciente a su vez al orden de los kinetoplastidos (Lainson y Shaw, 1987)), intracelular obligado del humano y otros mamíferos. Las diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad son la leishmaniasis cutánea (LC) que produce lesiones ulcerativas de la piel, la leishmaniasis mucocutánea (LMC) que produce una inflamación destructiva de mucosas, y la leishmaniasis visceral (LV) o “kala-azar”, que produce una infección diseminada en las vísceras (Herwaldt, 1999). La LV lleva a la muerte si no es tratada (aunque incluso siguiendo el tratamiento, en algunas áreas endémicas de Sudán o Brasil produce hasta un 10% de casos mortales (Evans et al., 1985; Jeronimo et al., 1994)). La LMC además de desfigurante puede producir enfermedades inflamatorias con riesgo de vida. La LC si bien puede curarse con el tiempo por sí misma al recuperarse el epitelio, deja cicatrices visibles y puede ser desfigurante.

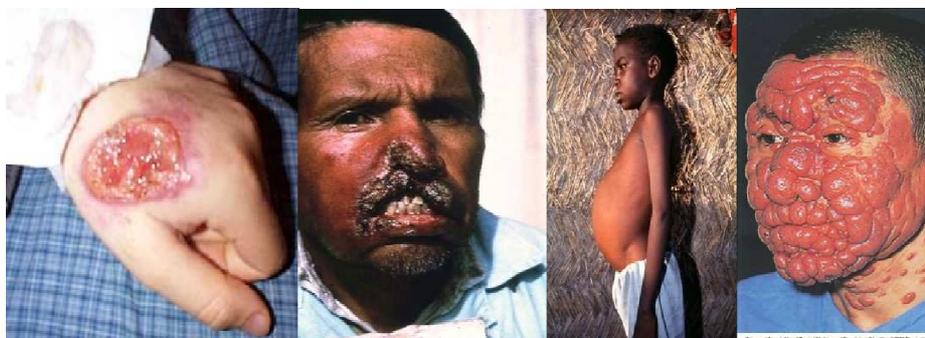


Figura 1.1. imágenes de pacientes afectados por distintas formas de leishmaniasis. De izquierda a derecha se presenta un cuadro de LC, LMC, LV, y una LC difusa.

Extendida por más de 100 países (24 de ellos en América incluyendo a la Argentina, donde la forma cutánea de la dolencia es endémica en el norte del país) (Grimaldi Jr et al., 1989), principalmente en los trópicos, subtropicos y regiones templadas, constituye un riesgo de infección para 350 millones de personas. Su prevalencia se estima en 12 millones de casos, con 2 millones de casos nuevos por año, de los cuales 1,5 millones corresponden a la forma cutánea (World Health Organization – Organización Mundial de la Salud- WHO/LEISH/2000).



Figura 1.2. Distribución mundial de la LC (W.H.O., 2005)

Se la considera por tanto una de las 6 enfermedades tropicales de mayor importancia, cuya investigación constante se alienta a través del programa de entrenamiento en enfermedades tropicales -TDR- de la WHO (Vlassoff, C., 1993).

El vector es un insecto flebótomo del orden de los dípteros, familia *Psychodidae*, de la cual dos de sus cinco géneros están involucrados en la transmisión de la leishmaniasis: *Lutzomyia spp.* en el hemisferio occidental, y *Phlebotomus spp.* en el oriental (Lewis y Ward, 1987). En general, se conoce a todas sus especies como “moscas de la arena”, insectos de 2 a 3 mm de tamaño, con alas en forma de “v”, cuyo vuelo es corto, bajo, y ocurre principalmente al atardecer.

En el ciclo de vida del parásito, están implicadas una forma libre flagelada (promastigote) y una intracelular sin motilidad (amastigote) que coloniza poblaciones celulares macrofágicas. Los promastigotes se replican por fisión binaria longitudinal en el aparato digestivo del vector para luego migrar a su boca, donde se vuelven metacíclicos cesando su replicación. Este proceso lleva de 4 a 25 días. Dependiendo de la zona del intestino del vector en que se desarrollan los promastigotes, se ha dividido la clasificación de *Leishmania* en dos subgéneros: *Vianna* (que comienza su desarrollo en el intestino posterior antes de migrar al medio y al anterior) y *Leishmania* (cuyo desarrollo ocurre completamente en el intestino medio y anterior) (Lainson y Shawn, 1987).

Los promastigotes metacíclicos -que constituyen la forma infectiva del parásito- son transferidos al ser humano (o a otros reservorios, siempre vertebrados, como p.ej. el perro) a través de la picadura del insecto, en una primera fase de la misma cuando la hembra

picadora inyecta una sustancia anticoagulante que le permitirá seguidamente alimentarse de sangre de los vasos interceptados. A su vez, en la saliva del vector existen factores que modularán las funciones de los macrófagos inhibiendo la rápida destrucción del parásito transferido (Hall y Titus, 1995). De 10 a 100 promastigotes son inyectados en la dermis en una picadura (De Gopugui y Ruiz, 2003). Los promastigotes permanecen en el espacio intercelular y activan el complemento por una vía alternativa, que deriva en una captura por parte de los macrófagos a través de fagocitosis gatillada a partir del reconocimiento de receptores como gp64, lipofosfoglicano, y receptores para los factores del complemento C1 y C3 que el parásito presenta sobre su superficie (Tremblay et al., 1996). Si bien una mayoría de promastigotes es destruida por leucocitos polimorfonucleares (Sánchez-Saldana et al., 2004), algunos se transforman en amastigotes en las células del sistema reticuloendotelial dentro de las 3 a 4 horas posteriores a la captura, y aproximadamente 36 horas después en promedio comienzan a reproducirse (Hall y Titus, 1995) pudiendo formar nidos parasitarios. De esta manera, el parásito se establece en las vacuolas parasitóforas resistiendo y modificando su condición degradativa e impidiendo su avance hacia el lisosoma. En el caso de la LC, los promastigotes infectivos son capturados principalmente por los macrófagos cutáneos y células de Langerhans.

El ciclo se completa cuando el insecto pica a un reservorio infectado, incorporando través de su aparato de succión a los macrófagos conteniendo amastigotes, que una vez en el tubo digestivo del flebótomo vuelven al estado de promastigotes (Handman 2000; Sánchez-Saldana et al., 2004).

La tabla 1.1 compila las principales especies de *Leishmania* indicando su subgénero, su localización geográfica y la forma de la enfermedad que causa cada una de ellas. Ocasionalmente, algunas especies son causa de otras formas de leishmaniasis, como por ejemplo *L. tropica* que causa la forma cutánea en una muy baja proporción, o la existencia de casos de leishmaniasis mucocutánea causada por algunas otras especies del subgénero *Vianna* además de *L. braziliensis* (Pearson et al., 2001).

Especie	Subgénero	Ubicación	Forma habitual de leishmaniasis causada
<i>L. amazonensis</i>	<i>Leishmania</i>	América	Cutánea
<i>L. mexicana</i>	<i>Leishmania</i>	América	Cutánea
<i>L. braziliensis</i>	<i>Vianna</i>	América	cutánea /mucocutánea
<i>L. guyanensis</i>	<i>Vianna</i>	América	Cutánea
<i>L. panamensis</i>	<i>Vianna</i>	América	Cutánea
<i>L. peruviana</i>	<i>Vianna</i>	América	Cutánea
<i>L. venezuelensis</i>	<i>Vianna</i>	América	Cutánea
<i>L. pifanoi</i>	<i>Vianna</i>	América	Cutánea
<i>L. chagasi</i>	<i>Vianna</i>	América	Visceral
<i>L. major</i>	<i>Leishmania</i>	Viejo Mundo	Cutánea
<i>L. tropica</i>	<i>Leishmania</i>	Viejo Mundo	Cutánea

<i>L. aethiopica</i>	<i>Leishmania</i>	Viejo Mundo	Cutánea
<i>L. donovani</i>	<i>Leishmania</i>	Viejo Mundo	Visceral
<i>L. infantum</i>	<i>Leishmania</i>	Viejo Mundo	Visceral

Tabla 1.1: principales especies de *Leishmania*.

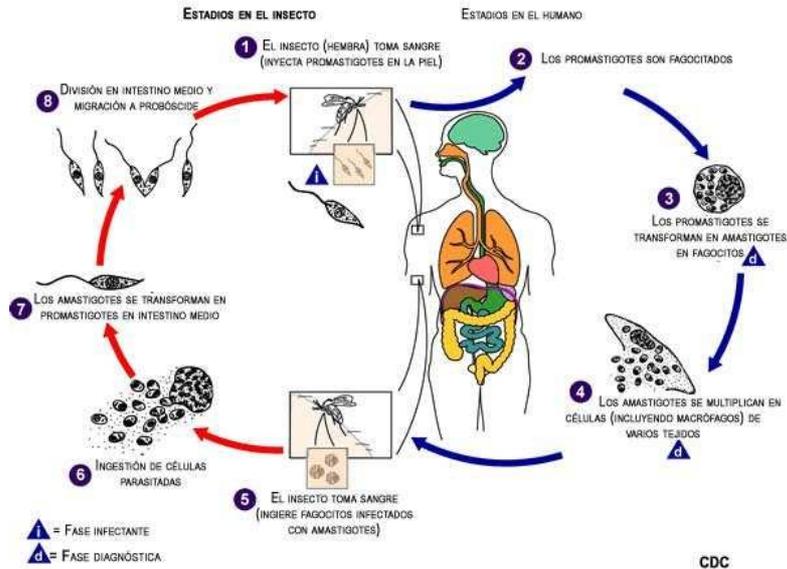


Figura 1.3: Ciclo de vida de *Leishmania*, reproducido de archivo CDC

[\(http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/\)](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx/)

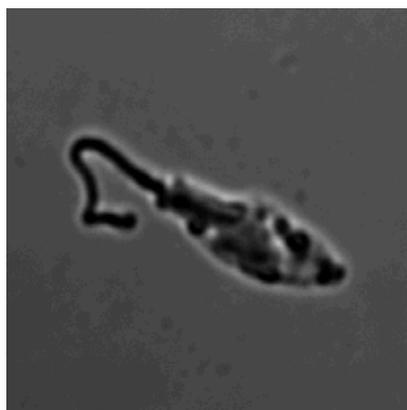


Figura 1.4: Promastigote de *Leishmania braziliensis*, LDTD-UNQ

Existen indicios de la difusión de la leishmaniasis en América en las culturas Mochica (330 a.C.-500 d.C.) y Chimú (1000-1400 d.C.) través de la representación en esculturas de figuras humanas con síntomas inequívocos de la dolencia.

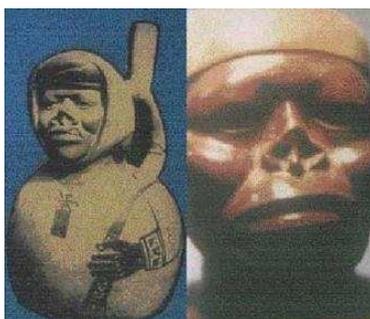


Figura 1.5: vasijas precolombinas del Perú donde se observan figuras antropomórficas con signos de LMC

Posteriormente los conquistadores españoles hicieron numerosas referencias de ella en el período de los siglos XVI y XVII. Pero es en los años 1900 y 1903 cuando Leishman y Donovan descubren un parásito ovalado en macrófagos de pacientes con síntomas de leishmaniasis visceral (Leishman, 1903; Donovan, 1903), y luego en 1904 Rogers logra cultivar la forma libre (promastigote) del parásito a partir del bazo de un enfermo (Rogers, 1904). En 1905 Presat señala al insecto flebótomo como vector de esta enfermedad (Ampuero, 2000), luego en 1913 Pedroso reporta la infección en perros (Pedroso, 1913).

En 1912, Vianna sugiere la terapia con antimoniales pentavalentes (Vianna, 1912), que hacia 1940 con el desarrollo de las drogas Glucantime y Pentostam, se constituyen en el que aún hoy día -pése a ser costoso, doloroso y a veces no suficiente- es el tratamiento de primera línea contra la leishmaniasis (Ouellette et al., 2004; Sánchez- Delgado et al., 2004). Este siglo entero en el que no se ha desarrollado una nueva terapia efectiva y sin

efectos colaterales que pueda reemplazar a la basada en antimoniales, es un ejemplo típico de la problemática de las “enfermedades huérfanas”, emergentes o re-emergentes, en los países del Tercer Mundo o en grupos de población de bajos recursos y cuya voz colectiva logra poco eco, no solamente en los actores a cuyo cargo está el diseño de políticas sanitarias, sino en la población en general. Claro ejemplo de ello es que en nuestro país existieron recientemente manifestaciones espontáneas en grandes centros urbanos en solidaridad con sectores agropecuarios que se señalaban afectados por un gravamen sobre sus exportaciones, mientras que no suelen alzarse voces ante políticas de salud sostenidas a través de décadas de gobiernos de todo tipo que no han logrado disminuir la exposición masiva de sectores mucho más numerosos e indefensos de la población, no sólo ante la leishmaniasis sino ante el mal de Chagas, dengue, y otras dolencias.

1.2. Tratamiento convencional, alternativas de segunda línea, y nano-sistemas de entrega de drogas

1.2.1. Tratamiento convencional de leishmaniasis: antimoniales pentavalentes (Sb(v))

El tratamiento convencional consiste en la administración de antimonio de meglumina (Glucantime) o de estibogluconato de sodio (Pentostam) por vía inyectable, en dosis altas y repetidas, por vías intravenosa (IV) o intramuscular (IM). El Glucantime se presenta en ampollas de 5 ml al 30%, conteniendo 85 mg de Sb(v)/ml, y es utilizado en América Latina y Francia. El Pentostam es el más utilizado en los países de habla inglesa y contiene 100 mg de Sb(v)/ml (Ampuero, 2000; Sánchez-Saldana et al., 2004). Aún no se conoce con precisión el mecanismo de acción antileishmánica de los antimoniales pentavalentes, ni se tiene certeza de si la forma activa es el Sb(v) o si éste funciona como una pro-droga que debe primero ser convertida a Sb(III) -más tóxico- como principio activo (Frezard et al., 2009)

Para la LC la dosis indicada es de 20 mg Sb(v)/ kg de peso/ día, vía IV o IM (y a veces intralesional), aplicada diariamente durante 3 ciclos de 10 días, con 10 días de descanso entre cada ciclo. Para la LMC la dosis puede subir de 20 hasta 50 mg Sb(v)/kg de peso/ día, diariamente durante 30 días. Para la LV, la dosis es también de 20 mg/ Kg/ día, diariamente por 30 días seguidos (Pearson et al., 2001).

En particular, para la LC la respuesta al tratamiento es lenta (sobre todo ante *L. braziliensis* y *L. tropica*) y la curación a veces es incompleta, con nuevas manifestaciones dentro de los primeros 6 meses. El tratamiento tiene alta ineficacia para *L. aethiopica*, y en manifestaciones difusas de la enfermedad (Pearson et al., 2001).

La aplicación de las inyecciones de Sb(v) es tan dolorosa y traumática que, para las formas en que están indicadas dosis IM en los glúteos, a menudo las últimas dosis deben comenzar a inyectarse en las piernas del paciente. A esta contrariedad causante

per se de un alto grado de disuasión, hay que sumarle los demás efectos colaterales (alteración de la función hepática, pancreatitis bioquímica, aplanamiento de ondas T en el ECG, mialgias, artralgias, trombocitopenia, supresión transitoria de médula ósea, nefrotoxicidad, etc) (Ampuero, 2000). A su vez, la inestabilidad de la droga -que puede fácilmente cambiar su estado de oxidación a Sb (III) de alta toxicidad-, el costo elevado de las mismas, su baja producción, la falta de efectividad, la aparición de resistencias, y la no eliminación del riesgo de recidivas y/o metástasis son otras contras del tratamiento convencional, sobre el que se registra un alto grado de abandono. A veces este abandono – o directamente su *no comienzo*- se debe a la sencilla razón de que al no ser autoaplicable, el tratamiento requiere de la presencia de personal entrenado; parte de la población rural afectada por leishmaniasis no tiene la disposición (o la posibilidad) de ir durante muchos días seguidos hasta un centro sanitario. Las salas de atención a veces distan decenas de kilómetros del domicilio de los infectados. La automedicación frecuentemente provoca el agravamiento de lesiones por uso de agentes tóxicos y corrosivos de uso doméstico como polvo del interior de pilas o líquido de baterías, que pueden provocar infecciones sobre agregada (Ampuero, 2000). Todos estos motivos ponen en vista la necesidad del desarrollo de tratamientos alternativos de aplicación por la vía tópica o la vía oral.

Por otra parte, la eficacia del tratamiento convencional también se ve amenazada por el aumento de la resistencia a los antimoniales pentavalentes que ha ido ejerciendo selección sobre ciertas cepas de *Leishmania* a lo largo de las últimas 7 décadas. Se ha probado *in vitro* la generación de resistencia al Sb(v) luego de incubaciones con antimoniales sobre cultivos de parásitos (Ephros et al., 1997; Ashutosh, 2007). Este es otro de los motivos que fortalece la necesidad de búsqueda de tratamientos alternativos eficaces.

Sin embargo, a pesar de la ineficacia, la resistencia y demás dificultades enumeradas de los tratamientos convencionales, pero sobre todo a pesar de los graves efectos colaterales antes descriptos -también presentes en los tratamientos convencionales de otras tripanosomiasis-, el desarrollo de nuevos tratamientos es lento. Ello se debe a que el mismo presenta perspectivas de mercado pobres para el sector privado. Esta necesidad de desarrollar tratamientos que reemplacen al convencional proveyendo un efecto terapéutico superior, con una disminución de efectos colaterales, y a un costo asequible, recae en un mayor grado en las agencias gubernamentales, instituciones académicas y emprendimientos conjuntos público-privados (Hammarton et al., 2003; Ridley, 2003).

1.2.2. Tratamientos alternativos: segunda línea

Las drogas de segunda línea en el tratamiento de la leishmaniasis son la Anfotericina B (AmB) y la Pentamidina. Ambas requieren administración parenteral y más allá de su efectividad, su alta toxicidad conlleva efectos colaterales severos (Berman, 1997; Thakur et al., 1994). Más allá de esta segunda línea, se han desarrollado tratamientos alternativos para las distintas formas clínicas de la enfermedad. Cuando no hay respuesta a Sb(v) o se debe interrumpir el tratamiento por los efectos colaterales, en la LC puede prescribirse rifampicina (600 mg/día, vía oral, por 3 a 4 semanas), Dapsona (3 mg/kg de peso/día, vía oral, por 3 a 4 semanas), Ketoconazol, (600 mg/día, vía oral, por 4 semanas) aunque la efectividad de estos tratamientos es relativa (Sánchez-Saldana et al., 2004). Para la LMC la AmB tiene buenos resultados, con una dosis que se aumenta progresivamente desde 0,5 mg/ kg/ día por vía IV hasta alcanzar una dosis acumulada de 2,5 a 3 g. Para el tratamiento de la LV se han aprobado para su uso y han aparecido en el mercado la AmB liposomal (Ambisome) y la miltefosina, esta última como tratamiento oral. Sus porcentajes de curación son superiores al 90%, pero el Ambisome posee como contra su alto costo, y la miltefosina un nivel importante de toxicidad (Sundar et al., 2002).

Además de ser costosos, estos tratamientos alternativos -salvo el AmBisome- presentan niveles de toxicidad importantes, y según señalan numerosos estudios, aún se requiere un diseño experimental concluyente para evaluar la efectividad de muchos de ellos (Khatami et al., 2007), ya que por lo general hay fallas en el relevamiento de sus resultados que llevan a no tener aun hoy día evidencias concluyentes de sus beneficios potenciales (González et al., 2008), o que se presentan resultados que no tienen en cuenta la variabilidad de los efectos tóxicos sobre las distintas especies del género capaces de provocar la enfermedad (Minodier et al., 2007). Otro factor fundamental en la falla de tratamientos de segunda línea como la aplicación tópica de paramomicina, encuentran su principal contra en la alta hidrofiliidad del principio activo que no puede ser compensada por excipientes de uso habitual.

En particular respecto de la LC, podrían resumirse las principales alternativas que han surgido como líneas de investigación para su tratamiento agrupándolas según su vía de administración. Por un lado, por la vía sistémica se han ensayado tanto AmB como Pentamidina, ambas con riesgo de toxicidad a la dosis requerida (Pearson et al., 2001). El IFN- en conjunto con Sb(v) (Badaro y Johnson Jr., 1993), imidazol (con éxito sobre *L. mexicana* pero sin efectividad sobre *L. braziliensis*) (Berman, 1996), y otras como el Allopurinol del cual se concluyó que no tenía efectividad (Herwaldt et al., 1992). Por el otro lado, los tratamientos alternativos ensayados para su aplicación local comprenden al estibogluconato de sodio inyectado intralesionalmente (que fue efectivo en 3 de cada 4 casos de infección con *L. tropica*) (Pearson et al., 2001), y varias aproximaciones por la vía tópica: paromomicina al 15% con cloruro de metilbenzetonio al 12% (aplicado 2 veces por día durante 10 días fue efectivo contra *L. major*, pero provocó a la vez quemaduras y

ampollas) (el-On et al., 1992), aplicación de calor local (que tiene requerimientos técnicos dificultosos y precisa de sesiones prolongadas) (Navin et al., 1990), e inmunoterapia (que aparece como un tratamiento muy lento) (Convit et al., 1987)

Otra razón por la cual muchos de los tratamientos descritos, y otros tratamientos antiparasitarios fallan, reside en la incapacidad del principio activo (PA) para alcanzar un tipo de tejido en particular y más aún, en la ausencia de selectividad para con un determinado tipo celular. En la LC debe tenerse especialmente en cuenta la localización de las células parasitadas, que en la fase inicial de la infección son las células de Langerhans y macrófagos cutáneos, en la parte profunda de la epidermis, a nivel del estrato espinoso, por debajo del estrato córneo (SC) y por encima de la dermis. En una fase tardía, los parásitos persisten vivos en el interior de los fibroblastos de la dermis, aun luego de la cura clínica, que involucra una respuesta de células CD4+T y -IFN, además de la activación de mecanismos efectores anti-leishmanicos en macrófagos (el-Shoura et al., 1995; Moll et al., 1995). Esta particular localización de las células infectadas dificulta la llegada de PAs tanto desde la zona superior (vía tópica) como desde la inferior (vías endovenosa e intramuscular); en el primer caso, porque el SC es una barrera de muy baja permeabilidad especializada en impedir la entrada de xenobióticos, pérdida de agua y prevención de fotodaño (Wandelow, 1995); en el segundo, porque desde la circulación sistémica, los fármacos deben extravasarse hacia el espacio extracelular, atravesar la dermis y finalmente llegar hasta el estrato espinoso donde están los macrófagos cutáneos y células de Langerhans. La localización intracelular agrega un grado extra de dificultad, ya que los PAs deben introducirse primero en las células infectadas antes de acceder a los amastigotes. La persistencia intracelular es responsable de que la enfermedad pueda recrudescer toda vez que haya una inmunodeficiencia, inhibición de iNOS o depleción de CD4+T (Farah et al., 1999).

1.2.3. Nanomedicina: Sistemas de Entrega de Drogas (nano-SED) y leishmaniasis

La Nanotecnología, entendida como el diseño, control y manipulación de la materia en la escala nanométrica (Taniguchi, 1974), constituye un campo multidisciplinario en el que un conjunto de ciencias y tecnologías construyen un nuevo enfoque de sus métodos y objetivos a partir de la posibilidad de tener un acceso nunca antes logrado a unidades estructurales mínimas materiales, como los átomos o moléculas. Ello supone una verdadera revolución en términos del establecimiento de un nuevo paradigma cuyos efectos tendrán implicancia en todos los ámbitos suponiendo conforme avanza su consolidación. En particular, la Nanomedicina comprende la aplicación de la nanotecnología a la medicina (Freitas Jr., 1999), brindando la posibilidad de avanzar hacia diagnósticos y tratamientos mucho más precisos y específicos a través del trabajo a nivel subcelular y molecular. De esta manera, el enfoque nanomedicinal de un problema preexistente puede brindar una

solución novedosa y asequible de modo relativamente sencillo. Uno de los principales roles de la Nanomedicina, es el transporte direccionado de drogas (Koo et al., 2005), en el desarrollo de lo que se conoce como nano Sistemas de Entrega de Drogas (nano-SED).

Utilizando nano-SED, se puede lograr el control espacio-temporal de la llegada del PA a las células blanco, dado que la farmacocinética y biodistribución del mismo cuando esté incorporado al sistema, ya no dependerá de su propia estructura –y por ende tampoco de sus propias características fisicoquímicas- sino de la del nano-SED. Así, en cada caso la estructura de los nano-SED puede diseñarse para conseguir que los PA alcancen un determinado blanco celular o intracelular, siguiendo una determinada cinética de liberación. De este modo, al lograrse un direccionamiento selectivo, se pueden maximizar los efectos de un PA administrando cantidades drásticamente menores del mismo, así como se pueden minimizar los efectos colaterales debidos a la presencia del PA en otros tejidos adonde hubiese llegado de haber sido administrado en forma libre o con excipientes convencionales, y donde podría ser tóxico.

Con respecto al empleo de PAs vehiculizados en nano-SED contra la leishmaniasis, el AmBisome es el único nano-SED disponible en el mercado contra LV, aprobado en el año 1999 por la *Food & Drug Administration* de EEUU (FDA) (Meyerhoff, 1999). La mayoría de los desarrollos experimentales que incluyen AmBisome son estrategias de administración parenteral. Pése a su baja toxicidad y su respuesta a dosis única, el AmBisome no ha tenido un alto impacto hasta ahora en el tratamiento de la leishmaniasis debido a su costo elevado (Romero y Morilla, 2008).

Los primeros desarrollos de nano-SED aplicados a la leishmaniasis datan de hace 30 años, consistiendo en la encapsulación de Sb(v) en liposomas (New et al., 1978; Alving et al., 1978). Si bien los resultados en modelos animales fueron exitosos contra LV, la dificultad de encapsulación y retención de los PA en los liposomas frenó el avance de esa línea (Frézard, 2009), aunque recientemente se lograron resultados promisorios en perros infectados con *L. chagasi* a partir de Sb(v) incorporado a liposomas (Schettini, 2006). Por su parte, el Pentostam incorporado a liposomas administrado por vía IV fue exitoso contra LC (New Chance, 1980). Otra estrategia antileishmánica basada en antimoniales incorporados a nano-SED es la inclusión de Sb en ciclodextrinas que pueden ser administradas oralmente (Demicheli et al., 2004).

Respecto de la LC, la AmB liposomal no fue efectiva administrada intraperitonealmente (Panosian et al., 1984). Tampoco tuvo éxito su administración subcutánea ni la IV, en este caso debido a la dificultad del material particulado para extravasar desde el torrente sanguíneo. Se han reportado muy pocas aplicaciones clínicas de AmB liposomal contra LC (Romero y Morilla, 2008).

Existen numerosos desarrollos en modelos animales basados en nano-SED de muy diversos tipos conteniendo distintos PA para la LV, por ejemplo, liposomas cargados con

atovaquona o miltefosina, y liposomas catiónicos con Sb (v). No ha habido pruebas clínicas hasta el momento. Otros desarrollos con distintos tipos de nano-SED de aplicación parenteral comprenden niosomas cargados con estibogluconato de sodio, nanodiscos con AmB, emulsiones, y polímeros conjugados. Por la vía oral se han probado nanosuspensiones mucoadhesivas con quitosán para *L. donovani* (Romero y Morilla, 2008).

Para el tratamiento de LC por la vía tópica con nano-SED se han hecho muy pocos ensayos hasta el momento, incluyendo el uso conjunto de etanol como mejorador de permeación para los PA, el uso de AmB liposomal (solamente pruebas *in vitro*), y paromomicina liposomal. Por la vía oral, se ha ensayado Glucantime complejado con ciclodextrinas, y se ha solubilizado AmB en miltefosina. (Romero y Morilla, 2008).

En general, podría decirse que la problemática del tratamiento de la leishmaniasis necesita de nano-SED tópicos u orales, pero los SED que han sido propuestos hasta el momento, o no pueden superar la barrera del estrato córneo, o bien son destruidos. Al presente, no existen reportes que prueben captura por macrófagos cutáneos de nano-SED aplicados por vía parenteral, IV o IP. Tampoco los nano-SED ensayados consiguieron penetrar el estrato córneo. En los ensayos de AmB en liposomas multilamelares tópicos, estos han hecho las veces de reservorio desde donde se libera el PA, perdiéndose la selectividad que aportan los liposomas para la captura por macrófagos (Romero y Morilla, 2008).

1.3. Estrato córneo (SC): Barrera impermeable de la piel

El empleo de la vía tópica para la administración de un PA incorporado a un nano- SED para el tratamiento local de la LC supone numerosas ventajas respecto de otras vías (menor trayecto hasta los blancos de acción, posibilidad de autoaplicación por el paciente, etc.). Sin embargo, la piel actúa como una barrera impermeable que protege al cuerpo de la entrada de material desde el exterior.

En la piel pueden distinguirse tres capas histológicas principales, nombradas de la más interna a la más externa: hipodermis, dermis y epidermis. La hipodermis se compone principalmente de tejido adiposo y tiene por función principal la aislación térmica del cuerpo y el acopio de reservas energéticas en forma de grasa. La dermis es un tejido fibroso que desempeña una función protectora e inmunológica. Es a su vez la estructura de sostén de la piel, y contiene el sistema vascular cutáneo, cumpliendo funciones claves en la termorregulación y drenaje linfático, siendo también depósito de sangre, agua y electrolitos. La epidermis es un epitelio versátil cuyas células se multiplican, diferencian y renuevan en un lapso que va de 1 a 2 meses, y tiene por funciones fundamentales la impermeabilidad relativa y la pigmentación. Al carecer de vasos, su nutrición ocurre por ósmosis a partir de la circulación de la dermis (Wandelow, 1995).

A su vez, la epidermis está estratificada en cuatro capas de células diferenciadas, que de la más interior a la más exterior se las conoce como estrato basal, estrato espinoso, estrato granuloso, y estrato córneo (SC). El estrato basal está compuesto por una hilera única de queratinocitos, células cilíndricas dispuestas paralelamente entre sí y perpendiculares el límite con la dermis. Están unidos entre sí por desmosomas, y a la membrana basal que representa la frontera con la dermis por hemidesmosomas. A partir de los queratinocitos de este estrato basal se generan por diferenciación las células de los demás estratos epidérmicos. Por encima del estrato basal se ubica el estrato espinoso, formado por células poliédricas dispuestas en mosaico por división de las anteriores, en un arreglo de aproximadamente 10 filas de células, las cuales se van aplanando conforme se ubican más cerca de la superficie de la piel. El estrato granuloso, por encima del espinoso, está formado por 2 a 3 hileras de células superpuestas que presentan gránulos de queratohialina en su citoplasma. La capa más externa de la epidermis (a veces separada del resto de ella por un delgado y resistente estrato lúcido) es el estrato córneo (SC) (Pastrana Fundora, 2005), compuesto por varias hileras (generalmente alrededor de 20) de células muertas y queratinizadas, anucleadas y sin orgánulos citoplasmáticos, embebidas en una matriz de lípidos no fosfolipídicos. Esta estructura es la responsable de la impermeabilidad cutánea.

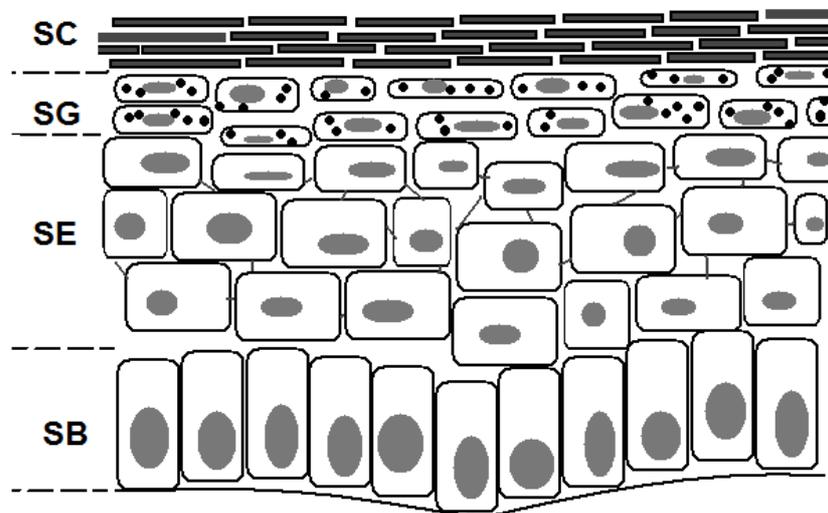


Fig. 1.6: Estructura simplificada de la epidermis. SC = estrato córneo; SG = estrato granuloso; SE = estrato espinoso; SB = estrato basal

Además, en la epidermis están presentes otros tipos celulares no provenientes de diferenciación a partir de queratinocitos germinales: los melanocitos (células dendríticas), células de Langerhans (presentadoras de antígenos, macrofágicas), y macrófagos cutáneos de origen monocítico, todos ellos formando parte del sistema inmunológico y

representando el comienzo de un segundo tipo de defensa, luego del obstáculo mecánico que proporciona el SC en primer término.

El tránsito exitoso a través del SC es la principal barrera a superar por cualquier material que deba ingresar a capas profundas de la epidermis. Muchos tratamientos tópicos fallan porque las moléculas que atraviesan el SC lo hacen sin selectividad por ningún estrato subyacente o tipo celular y pueden llegar a la circulación sistémica (tránsito indeseado que puede generar efectos colaterales) o contraria y principalmente, porque no pueden atravesar el SC. Los excipientes convencionales (cremas, ungüentos, lociones) sólo cumplen un rol de solubilización/estabilización del PA, proveyendo en el mejor de los casos una liberación sostenida en el tiempo sobre la piel, desde el exterior topológico de la misma. En cambio, los nano-SED podrían participar activamente en el direccionamiento del PA transportado a un determinado estrato o tipo celular de la piel (Weiner y Lieb, 1998).

1.4. Liposomas ultradeformables (LUD)

Los liposomas ultradeformables (LUD) (Cevc y Blume, 1992; Cevc et al, 1993; Cevc, 1995, 1996; Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2005) constituyen un nano-SED que se ha propuesto como efectivo para el acceso a las capas profundas de la epidermis viable, por debajo del SC. Los LUD están compuestos por una mezcla de fosfolípidos de simetría cilíndrica y surfactantes como sales biliares o co-solventes como el etanol. Como todo liposoma, los LUD se forman por procesos *bottom up*, es decir estructuras que se forman a partir de sus bloques constituyentes separados. Debido a la presencia de la sal biliar que cumple la función de surfactante de membrana, los LUD son vesículas capaces de experimentar gran deformación por unidad de área de la bicapa lipídica, a diferencia de los liposomas convencionales, cuyo módulo elástico es un orden de magnitud mayor que el de LUD. Al poseer una energía elástica en el orden de la energía térmica ambiente, los LUD presentan fluctuaciones de membrana espontáneas (Cevc, 2005), debidas a la alteración de su membrana fosfolipídica por la presencia del surfactante.

Los LUD, una vez en la superficie de la piel, pueden impulsarse espontáneamente hacia la profundidad de la misma en virtud de la existencia de un gradiente de hidratación entre el exterior del SC y el interior de la epidermis viable (Cevc and Blume 1992; Verma et al., 2003; Cevc, 1995). Este gradiente transepitelial genera sobre los LUD (cuyo diámetro está en el orden de los 100 nm), una fuerza resultante hacia el interior del orden de los 10^{11} a 10^{12} N. De este modo, su administración debe ocurrir en ausencia de oclusión, ya que la deshidratación superficial favorece su penetración. Este fenómeno ocurre conjuntamente con el ensanchamiento del espacio entre corneocitos, también promovido por estas fuerzas originadas por el gradiente transepitelial, que genera unos nanocanales de

entre 20 y 40 nm de diámetro (Aguiella et al., 1994; Cevc et al., 1996) a través de los cuales ocurre la penetración de los LUD.

Dado que los LUD pueden atravesar el SC sin sufrir su disrupción irreversible (Cevc et al., 2002) (a diferencia de los liposomas convencionales, que se agregan en la superficie de la piel y sufren fusión y coalescencia), aparecen como candidatos promisorios para el transporte de PA al interior de la piel, ya sea encapsulando moléculas hidrofílicas en su interior, o bien transportando moléculas hidrofóbicas cuya lipofilidad las asocia con la bicapa lipídica. De hecho, han comenzado a aparecer trabajos indicando que el uso de liposomas convencionales permite la liberación sostenida y aumentada de los niveles de principios activos antileishmánicos en la piel (Ferreira et al., 2004), e incluso se ha difundido alguna comunicación preliminar sobre el uso de LUD de aplicación tópica para leishmaniasis (Galvão de Lima, 2008).

Por otra parte, el empleo de un nano-SED cuyas estructuras miden alrededor de 100 nm, definirá el acceso preferencial a las células capaces de efectuar captura por fagocitosis, lo cual para el caso de la LC significa poder dirigir el SED hacia las células hospedadoras de los amastigotes de *Leishmania*. Otra de las ventajas de intentar desarrollar una terapia basada en una suspensión liposomal de aplicación directa sobre la piel, es la tendencia actual a la preferencia de las vías oral y tópica por sobre la intramuscular o la endovenosa (Plotkin, 2005), lo que hace que diversos SED continúen siendo estudiados con especial interés como vehículos propuestos para la entrega efectiva de PA a través de la vía tópica (Barbosa-Barros et al., 2009; Itoh y Takenawa, 2009).

1.5. Terapia fotodinámica

1.5.1. Fotosensibilizadores y especies reactivas del oxígeno (ERO)

Por otra parte, en los últimos años la Terapia Fotodinámica (TFD) ha aparecido como una forma efectiva de generar toxicidad sobre porciones de tejido muy localizadas, por medio de la producción de especies reactivas del oxígeno (ERO) tales como oxígeno radicalario o principalmente oxígeno singlete, todos ellos átomos inestables de vida media muy corta, que son generados por la iluminación de una molécula fotoactivable o fotosensibilizador (FS). A nivel molecular, cuando el FS es activado por la llegada de un fotón con la longitud de onda adecuada, la absorción energética lleva a la molécula a un estado electrónicamente excitado, cuyo retorno al estado basal puede darse a través de diferentes caminos: procesos no radiantes (asociados a relajación vibracional con liberación de calor), procesos radiantes (que liberan radiaciones electromagnéticas en forma de fluorescencia o fosforescencia), y otros procesos de desactivación, entre los que

se encuentra la fotosensibilización. Cuando el oxígeno molecular interviene en la fotosensibilización, ocurre la acción fotodinámica, que puede darse por dos mecanismos: uno que involucra la transferencia de un electrón (Tipo I) generando una cadena de formación de radicales libres, y otro que por medio de una transferencia de energía (Tipo II) al oxígeno molecular en su estado basal (triplete), lo convierte en oxígeno singlete, una especie muy reactiva capaz de oxidar biomoléculas ricas en electrones como aminoácidos, ácidos nucleicos y lípidos, produciendo muerte celular (Jimenez Banzo, 2008; Konan et al., 2002; Van Lier, 1991)

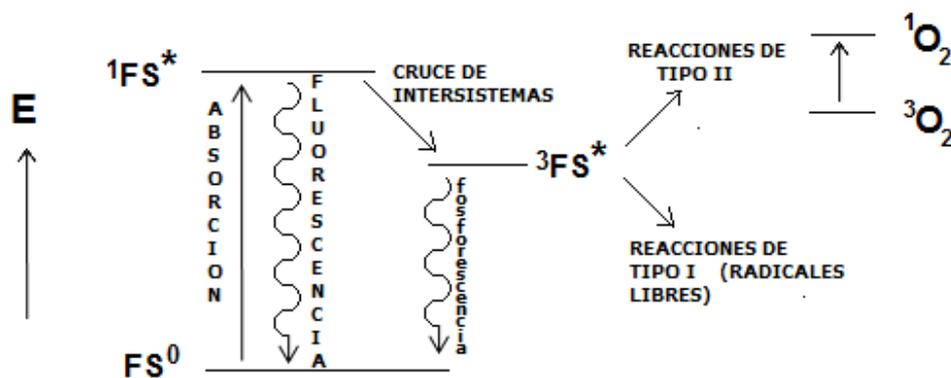


Figura 1.7: Diagrama de Jablonski simplificado esquematizando la producción de oxígeno singlete. FS es el fotosensibilizador en su estado basal (FS^0), singlete ($^1FS^*$) o triplete ($^3FS^*$). El oxígeno triplete (3O_2) recibe una transferencia energética del $^3FS^*$ y se convierte en oxígeno singlete (1O_2) muy reactivo.

El hecho de que la vida media de estos átomos reactivos sea tan corta, los convierte en fuentes de toxicidad intracelular muy localizada, ya que el radio en el que pueden difundir una vez generados no excede los 200 nm (Moan, 1990) antes de que retornen al estado basal por transferir su energía al medio acuoso.

Surgida de investigaciones en el campo de la oncología, la TFD ha extendido su ámbito de aplicación más allá de la destrucción dirigida de masas tumorales para convertirse en el principio terapéutico clave de nuevos tratamientos contra diversas dolencias y hasta incluso con fines cosméticos. Si bien existen antecedentes del uso de la exposición al sol tras la aplicación de ciertos ungüentos como tratamiento contra la psoriasis en la India del año 1400 a.C. (Spikes, 1997), las raíces de la TFD dentro de la ciencia occidental pueden remontarse a las primeras descripciones de la acción fotodinámica por Raab hacia fines del s.XIX (Raab, 1898; Raab, 1900). Poco después, artículos de revisión de los primeros años del s XX (Sellards, 1918) ya señalaban la posibilidad del uso terapéutico de la acción fotodinámica, referenciando trabajos que sobre los efectos de la exposición

a la luz solar sobre carcinomatosis, tuberculosis y afecciones sifilíticas de la piel (Tappeiner y Jesionek, 1903; Pick y Asahi, 1904). En 1911 se refiere la acción fotodinámica provocada por exposición a la luz de hematoporfirinas (Hausman, 1911). Más contemporáneamente, el gran impulso de la TFD se ha dado a partir de que en 1993 el gobierno de Canadá aprobase su uso como tratamiento contra el cáncer de vejiga, seguido luego por resoluciones de la FDA aprobando el Photofrin ®, producto estudiado para TFD desde los años 60 (Lipson et al., 1961) que contiene una mezcla altamente impura de varias hematoporfirinas (Byrne et al., 1990), para el tratamiento del cáncer de esófago en 1995 (Resolución de la FDA del 27-Dic-1995) y cáncer de pulmón en 1998 (Resoluciones de la FDA del 9-ene-1998 y 22-Dic-1998), y luego la indicación del fotosensibilizador ácido 5-aminolevulínico (ALA) como tratamiento para la queratosis actínica (bajo el nombre de Levulan ®).

1.5.2. Fotosensibilizadores de segunda generación - Ftalocianinas

La TFD ha evolucionado en la búsqueda de nuevos FS para reemplazar al Photofrin ® y otras moléculas de la primera generación, todas las cuales compartían las características de presentarse en mezclas complejas difíciles de separar, con bajos coeficientes de extinción, absorción a longitudes de onda bajas (de poca penetrancia), y acumulación en organismo por períodos muy largos (Razum et al., 1987). En ese camino, se ha puesto énfasis en apuntar a moléculas estables, con alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete, atóxicos en ausencia de luz, y con mayor absorción en zonas del espectro correspondientes a longitudes de onda de mayor penetrancia (esto es, una mayor absorción en las cercanías del rojo). Esta cuestión de la penetrancia lumínica es la que limita el uso de la TFD a la piel o a la superficie de órganos (Vrouenraets et al., 2003) ubicados en cavidades (a las que se puede acceder mediante un catéter de fibra óptica). De este modo, entre las moléculas propuestas como efectivos para la TFD aparecen numerosos FS de segunda generación de origen muy variado (Kolárová et al., 2003) -se ha señalado incluso la capacidad de *Quantum Dots* en la generación de radicales libres tras exposición a la luz (Juzenas et al., 2008)- entre los que pueden destacarse los derivados de ftalocianinas (Ben-Hur et al., 1985; Moan et al., 1994; Decreau et al., 1999; Stojiljkovic et al., 2001; Milla et al., 2009), que se distinguen por su alta fotoestabilidad (Reda, 2007) acompañada de una también alta quimioestabilidad, además de ser capaces de generar de modo particularmente rápido una cantidad importante de oxígeno singlete (Savolainen et al., 2008).

1.5.3. Activación de fotosensibilizadores

El rango de frecuencias capaz de activar a un FS dependerá lógicamente de su espectro de absorción, pudiendo dicho intervalo ser muy específico o relativamente amplio. Más

precisamente, el espectro de absorción suele presentar numerosas bandas y picos donde la absorción es alta. La elección de luz de un determinado color (generalmente roja) se debe sobre todo al uso de FS que presentan en su espectro de absorción un buen pico a esa longitud de onda, lo suficientemente larga como para –pése a tener menor energía que una de frecuencia mayor- lograr una penetrancia más profunda, en este caso del orden del centímetro con una luz que aproveche el pico de 630 nm de muchos FS (Chamberlain, 2003), es decir la zona “NIR” (cercana al espectro infrarrojo). Aunque la fuente de radiación lumínica generalmente empleada en estos tratamientos es luz proveniente de un láser, también se trabaja y se investiga en TFD con fuentes no coherentes de luz (Wang et al., 2008; Munavalli et al., 2008) que van desde los LEDs (Barolet, 2008) hasta fuentes multifrecuencia como la luz blanca (Schneider-Yin et al., 2009). El uso más extendido del láser no se debe a una ineficacia de las emisiones lumínicas convencionales para activar a los FS sino por el diseño sofisticado y pequeño que requiere un equipo que deba iluminar una zona de difícil acceso en el interior del cuerpo -tal como podría ser por ejemplo un tumor alojado dentro de un pulmón al cual se debe llegar por medio de una sonda- a la vez que, por haberse distribuido el FS de modo no específico en el tumor, de no contarse con un sistema de liberación controlada –de hecho la TFD convencional no los utiliza-, el haz no disperso del láser garantiza la selectividad de la toxicidad generada sobre un blanco que puede ser muy específico y pequeño, preservando al tejido circundante de la generación de especies reactivas. La capacidad de la luz natural de activar FS ha sido ampliamente descripta (Mahmoud et al., 2008). El espectro de la radiación solar contiene lógicamente todas las longitudes de onda que son empleadas para la activación de los distintos FS utilizados en TFD. La contraindicación de exposición al sol (tal como rezan las prescripciones de uso de Photofrin) durante cierto período de semanas para los pacientes de TFD convencional luego de someterse al tratamiento (sin una vehiculización controlada del FS), o los reportes sobre daños dermatológicos sufridos por pacientes que no siguieron prescripciones similares (Herr et al., 2007) son por sí mismos una prueba de la capacidad de la luz solar de disparar la generación de las especies reactivas involucradas en esta particular toxicidad. Muy recientemente, se han publicado trabajos que recogen pruebas clínicas de TFD activada directamente por exposición a la luz diurna para el tratamiento de la queratosis actínica, con resultados más que promisorios (Wiegell et al., 2008; Wiegell et al., 2009). Estos por un lado han confirmado la activación efectiva del FS metil aminolevulinato para TFD por la luz solar, obteniendo mejores resultados que para un tratamiento control activado por luz de un LED rojo, ya que se reportó menor dolor y mayor efectividad utilizando una concentración menor del fotosensibilizador.

A su vez, en coincidencia con otros aspectos de estas terapias en desarrollo ya señalados, hay una necesidad creciente de avanzar en la estandarización de la dosimetría

de las radiaciones necesarias para establecer TFD efectivas (Mang, 2008; Schneider et al., 2008) consolidando su indicación para el tratamiento de distintas afecciones.

1.5.4. TFD y nano-SED. Fotosensibilizadores de tercera generación

Con respecto a la mejora de su disponibilidad en el sitio blanco de acción, no sólo se ha trabajado en la obtención de FS con distintas solubilidades, sino también en su incorporación a nano-SED (Allison et al., 2008). De este modo, diversos nano-SED como nanopartículas (Chatterjee et al., 2008), nanotubos de carbono –que tendrían potencialidades moduladoras de la acción fotodinámica (Zhu et al., 2008)-, micelas poliméricas (Rijcken et al., 2007), o liposomas (Yu et al., 2001; Namiki et al., 2004; Takeuchi et al., 2004; Postigo et al., 2004; Sadzuka et al., 2005) han sido propuestos como transportadores de FS para TFD destacándose la capacidad de estas últimas vesículas lipídicas de extravasar en zonas de alta angiogénesis como las circundantes de tumores y su acumulación en dichos tejidos neoplásicos (Klayshchitsky et al., 1994). Estas combinaciones de FS de segunda generación con diversos nano-SED constituyen la tercera generación de FS (Moser, J.G., 1997).

Respecto de la vía tópica, la poca capacidad de penetración a través de la piel intacta de la mayoría de los FS (Escudero Villanueva et al., 2001) es una de sus principales desventajas, siendo entonces crucial el desarrollo de estrategias de transporte exitoso para FS que se pretendan introducir a través de la piel más allá del SC (Casas y Batlle, 2002). En esta tesitura, se ha ensayado la inclusión de FS en formulaciones lipídicas con propiedades elásticas especiales (Dragicevic-Curic et al., 2009) e incluso muy recientemente –aunque luego de las primeras publicaciones surgidas del presente trabajo- en liposomas ultradeformables (Galvão de Lima et al., 2008).

1.5.5. Aplicaciones de TFD

Por fuera de los tratamientos oncológicos, se han desarrollado numerosas líneas de investigación en los últimos años para proveer alternativas basadas en TFD en la curación de varias afecciones (Ochsner, 1997; Gilaberte et al., 2006; Karrer, 2007; Mac Cormack, 2008), eminente pero no exclusivamente cutáneas, destacándose su excelente resultado cosmético acompañado por una baja invasividad (Klein, 2008) como es el caso de los nuevos enfoques para el tratamiento del acné (Hongcharu et al., 2000; Gilbert, 2007), psoriasis (Cather et al., 2003), enfermedad de Bowen (Fernandez-Guarino et al., 2007), el trastorno de la visión conocido como “degeneración macular asociada a la edad” (Coleman et al., 2008), y otras como la rosácea o el combate estético del envejecimiento de la piel, así como también se ha estudiado la toxicidad sobre bacterias (O’Riordan et al., 2005) con finalidades de desarrollar tratamientos anti-infecciosos, y su

capacidad de inactivación de virus para su aplicación como descontaminante de sangre para transfusiones (Ben-Hur et al., 1995). En general, se ha señalado que se deben optimizar parámetros (dosis de FS, dosis de exposición lumínica, etc.) y profundizar estudios para consolidar la potencialidad de estas aplicaciones (Mitra y Stables, 2006).

1.5.6. TFD y LC

A fines de los años '80 (Docampo, 1989) ya se señala el daño de parásitos por ERO como una característica aprovechable para el desarrollo de nuevas terapias, dadas ciertas deficiencias enzimáticas particulares de los parasitarios. En particular, el tratamiento de la leishmaniasis cutánea (LC) con TFD ha sido propuesto y ensayado en numerosas oportunidades en los últimos años (Abok et al., 1988; Enk et al., 2003; Gardlo et al., 2003; Ghaffarifar et al., 2006), reportándose casos clínicos de curaciones en pacientes en los cuales la dolencia aparecía resistente a otros tratamientos (Sohl et al., 2007), estudios clínicos comparativos para los cuales la TFD arrojó resultados mucho mejores que con otros tratamientos alternativos como la paramomicina por vía tópica (Asilian y Davami, 2006), y reportes exitosos acerca de combinación de TFD con otros métodos como la crioterapia (Pizinger et al., 2009). En algunos de estos estudios se señala que un sistema que provea un acceso eficiente del FS al interior celular infectado debería incrementar su potencial terapéutico (Dutta et al., 2005). Por otra parte, algunas revisiones señalan que los datos relevados en los distintos estudios clínicos han sido limitados y ello ha influido en que aún no pueda indicarse la TFD como tratamiento recomendado para esta dolencia (Van der Snoek, 2008). Otros estudios promisorios empleando FS *in vitro* lograron reportar la inhibición del crecimiento de promastigotes de leishmania (Morgenthaler et al., 2008), y la sensibilización tanto de promastigotes como de amastigotes intracelulares con ALA (Akilov et al., 2007a) y con derivados de porfirinas (Bristow et al., 2006). No emana sin embargo una opinión unánime acerca de la susceptibilidad del parásito comparada con la de los macrófagos hospedadores. Algunos autores señalan una mayor sensibilidad del parásito que del hospedador (Bristow et al., 2006), mientras que otros no sólo indican que el macrófago se ve más afectado por la toxicidad generada por la TFD (Akilov et al., 2007a), sino que tras experimentos *in vivo* exitosos en la eliminación de parásitos, el descenso registrado en la población macrófágica implica que la muerte de los amastigotes intracelulares ha sido consecuencia de la muerte de los macrófagos hospedadores (Akilov et al., 2007b). Estas diferencias podrían deberse una vez más a la falta de una estandarización de los procedimientos o a efectos dependientes del FS ya que en estos trabajos se utilizó la misma especie (*Leishmania major*).

En particular se ha abordado también el estudio de la susceptibilidad de parásitos de leishmaniasis a la acción de derivados de ftalocianinas. Se ha reportado de este modo la inhibición *in vitro* del crecimiento de promastigotes de dos especies diferentes del género

leishmania (*L. chagasi* y *L. braziliensis*) tras irradiación con un láser de 670 nm (Escobar et al., 2006).

Más recientemente, el NIH (National Health Institute, EEUU) ha aprobado la realización de una prueba clínica de fase II que tendrá lugar con posterioridad a la publicación de esta tesis, en la que se intentará determinar la efectividad de la TFD utilizando metil-aminolevulinato activado por luz diurna para el tratamiento de LC causada por *L. major* y *L. tropical* ("Phase II study of the efficacy of daylight activated photodynamic therapy in the treatment of cutaneous leishmaniasis", Clinical Trials ID: NCT00840359).

1.6 Objetivos

El propósito inicial de este trabajo, pues, ha sido el de combinar herramientas nanotecnológicas para desarrollar un tratamiento nanomedicinal anti-leishmaniasis de aplicación tópica basado en un FS vehiculizado en LUD. De este modo, se podría alcanzar la población macrofágica infectada en fases agudas iniciales de la LC, produciendo toxicidad localizada disparada por exposición a la luz solar dentro de las vacuolas fagocíticas donde se alojan los parásitos intracelulares. En esta idea se contempla entonces la mejora de aspectos sustanciales que se pueden señalar como deficiencias del tratamiento actual desde una visión multidisciplinaria, que integre no solamente los aspectos médico-farmacológicos del problema sino también su contexto etiológico y socioeconómico.

En primer lugar se abordará la preparación y la caracterización físico- y fotoquímica y del FS en liposomas ultradeformables (LUD). Se hará luego un breve paso por un modelado que permita relacionar concentraciones de LUD con cantidades, enfoque necesario para apreciar el estado real de sistemas donde el material se halla discretamente distribuido de modo particulado. Posteriormente, se ahondará en cuestiones de estabilidad del sistema ante la deshidratación, de fundamental importancia a efectos de ponderar las posibilidades de conservación a largo plazo, almacenaje, y otros aspectos del escalado y la producción. En siguiente lugar, se estudiará la capacidad efectiva de estos LUD para penetrar a través del SC y proveer de tal modo una vía de ingreso tópica para el acceso del FS a su blanco macrofágico. Por último, se describirán ensayos de toxicidad sobre células de mamífero (macrófagos y fibroblastos) y actividad sobre promastigotes extracelulares y amastigotes intracelulares de *leishmania*, en busca de una dosis que siendo tolerada por el hospedador, provea una acción leishmanicida tras la irradiación.

CAPÍTULO 2

LIPOSOMAS ULTRADEFORMABLES FOTODINÁMICOS: DISEÑO Y CARACTERIZACIÓN

Parte de este capítulo ha sido publicada en International Journal of Pharmaceutics, sección Pharmaceutical Nanotechnology, 330 (2007)183-194. "Photodynamic ultradeformable liposomes: Design and characterization", J. Montanari, A.P. Perez, F. Di Salvo, V.Diz, R. Barnadas, L. Dicelio, F. Doctorovich, M.J. Morilla, E.L. Romero

2.1 Introducción

La capa más externa de la epidermis -conocida como estrato córneo- bloquea la permeación y penetración de PA a través de la piel intacta, a la vez que dificulta la absorción percutánea. Por ello, los tratamientos tópicos para enfermedades cutáneas representan un importante desafío (Blanc y Schleupin, 1969; Schleupin y Blank, 1971; Menon, 2002) toda vez que los PA no siempre pueden entregarse en dosis terapéuticas ni con la selectividad adecuada (Cevc, 2004). En términos generales, el flujo transdermal máximo calculado para un PA con un peso molecular por debajo de 1 kDa aplicado a razón de 1 mmol/cm² (la máxima concentración de PA en la superficie de la piel está regida por su solubilidad y toxicidad), resulta extremadamente bajo, en el orden pM/h por unidad de área (Cevc y Blume, 2004). Ésta podría ser la razón por la cual, en el caso de la leishmaniasis cutánea (LC), los tratamientos tópicos preexistentes deban ser aplicados en lesiones abiertas que han perdido su capa de estrato córneo, y son menos exitosos en lesiones en las que la absorción es dificultada por el engrosamiento del epitelio (Blum et al, 2004).

Otra limitación de los tratamientos tópicos surge del hecho de que la profundidad de penetración y la selectividad dependen de las propiedades fisicoquímicas del PA y no de los excipientes (cremas, geles, lociones) (Weiner y Lieb, 1998). A pesar de los intentos por mejorar el transporte a través del estrato córneo empleando sistemas de entrega de drogas (SED) particulados tales como niosomas, liposomas, micro y nanopartículas, los SED sólo consiguen penetrar el estrato córneo al atravesar los nanocanales hidrofílicos existentes entre -o dentro de- los grupos de queratinocitos (Schlatzein y Cevc, 1998; Cevc y Blume, 2004). Dado que dichos nanocanales poseen un diámetro efectivo varias veces menor que el de los SED en general, el tamaño y/o la falta de elasticidad de estos últimos afectan su penetración. Por ejemplo, en el entorno seco de la superficie del estrato córneo, los liposomas coalescen y se fusionan, funcionando de este modo solamente como reservorios para la liberación sostenida de droga (Abraham y Downing, 1990; Hofland et al. 1995)

Los liposomas ultradeformables (LUD) (Cevc y Blume, 1992; Cevc et al, 1993; Cevc, 1995, 1996; Honeywell-Nguyen y Bouwstra, 2005) son vesículas con propiedades diferenciales útiles y novedosas en comparación con los liposomas convencionales. Los LUD poseen una energía elástica () en el orden de la energía térmica ambiente (kT), la cual es cerca de 20 veces menor que la de los liposomas convencionales. Las matrices metaestables de los LUD –consistentes de mezclas de fosfolípidos convencionales y activadores de borde como surfactantes (sales biliares) o co-solventes (etanol)- son capaces de experimentar fluctuaciones espontáneas a temperatura ambiente (Cevc, 2005). Notablemente, los LUD utilizan el gradiente de agua transepitelial como fuerza motriz para penetrar a través de la piel. La fuerza resultante ($r^2 \times 10^5$ Pa, donde r_v es el radio de la vesícula) que resulta en el orden de 10^{11} a 10^{12} N, es suficiente para impulsar la locomoción de los LUD a través de los nanocanales del estrato córneo, sin colapsar ni coalescer (Barry, 2001; Cevc y Blume, 2003; Verma et al, 2003).

Por otro lado, la terapia fotodinámica (TFD), la cual es una nueva estrategia bimodal emergente que involucra la combinación de luz visible y un fotosensibilizador, es usada para tratar una gran variedad de patologías tales como cáncer, psoriasis, y enfermedades displásicas e infecciosas (Ochsner, 1997) incluyendo LC (Abok et al, 1998; Hongcharu et al, 2000; Lang et al, 2001; Stojilkovic et al, 2001; Enk et al, 2003; Gardlo et al, 2003; Dutta et al, 2005). La hidrofobicidad es uno de los factores más importantes que modulan la actividad fototerapéutica de un fotosensibilizador (Krieg et al, 2003). Sin embargo, tal como ocurre con cualquier otro PA, se espera que su actividad (particularmente si es dependiente del balance hidrofílico/hidrofóbico) pueda ser modificada con respecto a la forma libre cuando es incorporado en nano-SED; dichas modificaciones dependerán de la estructura del nano-SED, que pueden ser modulados para mejorar su *performance in vivo*.

En el presente capítulo, se describirá la preparación y caracterización de LUD conteniendo dos fotosensibilizadores derivados de ftalocianinas, uno hidrofóbico (ZnPc) y uno hidrofílico (ZnPcMet). En el caso de la LC, tratamientos tópicos tempranos -y por lo tanto más efectivos- no pueden ser aplicados debido al impedimento del estrato córneo intacto. Los LUD fotodinámicos podrían ser aplicados en una primera etapa de la enfermedad, cuando las propiedades de barrera de la epidermis aun se hallan intactas.

2.2. Materiales y Métodos

2.2.1. Materiales

3-Nitroftalonitrilo, *N,N*-dimetiletanolamina, 2,4-dimetil-3-pentanol (DBU), acetato de zinc(II) anhidro, yoduro de metilo, cloroformo anhidro, 1-pentanol, *N,N*-dietil-1-4- nitrosoanilina y 1,3-difenilisobenzofurano (DPBF) fueron comprados a Aldrich. El imidazol a Riedel de Hæn, NaH

y tetrahidrofurano (THF) a Merck y el azul de metileno a Química Bonaerense. El tetra-*t*-butilftalocianinato de zinc(II) fue sintetizado de acuerdo a Fernandez et al. (1995). El pentanol fue secado con CaH₂ y almacenado con un tamiz molecular de 3 Å bajo atmósfera de nitrógeno. El THF fue secado con Na/benzofenona y destilado antes de usar. La fosfatidilcolina de soja (SPC, de "soy phosphatidylcholine") (Phospholipon 90 G, pureza 92-98%) se obtuvo como donación de Phospholipid/Natterman, Alemania. Colato de sodio (ColNa), bromuro de dimetil-tiazolil-tetrazolio (MTT) y Sephadex G50 fueron comprados a Sigma. El fluoróforo 8-hidroxipireno-1,3,6-ácido trisulfónico (HPTS) y el apagador (*quencher*) bromuro de *p*-xileno-bis-piridinio (DPX) fueron comprados a Molecular Probes. El medio de cultivo RPMI 1640, los antibióticos y el suero fetal bovino (SFB) fueron comprados a PAA-GmbH. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico y se adquirieron en Anedra.

2.2.2. Preparación de las ftalocianinas

2.2.2.1 [Tetrakis(2,4-dimetil-3-pentiloxi)-ftalocianinato] de zinc(II)

La ftalocianina de zinc(II) hidrofóbica, ZnPC, PM = 1052, fue sintetizada de acuerdo a Liu et al. (2004) con un rendimiento del 87%.

2.2.2.2 [Tetrakis(N,N,N-trimetilamonoietoxi)-ftalocianinato] de zinc(II) tetraioduro

La ftalocianina de zinc (II) hidrofílica, ZnPcMet, PM = 1492,5, fue sintetizada en base a Liu et al (2004) y De Filippis et al. (2000). El precursor 3-(*N,N*-Dimetiletoxi)-ftalonitrilo fue sintetizado a través de una modificación de la patente JP9077731 (Shigeo et al, 1997). El [Tetrakis(*N,N*,-dimetilaminetoxi)-ftalocianinato] de zinc(II) (precursor neutro para la síntesis de ZnPcMet, PM = 924,5) fue obtenido a partir del ftalonitrilo antes mencionado (50,0 mg, 0,023 mmol) solubilizado en 3 ml de pentanol seco en presencia de DBU (35,0 mg, 0,23 mmol) y acetato de Zn(II) (10,2 mg, 0,06 mmol) tras 8 hs de reflujo. Este precursor fue aislado de la mezcla cruda a través de protonación de los grupos amino por tratamiento con ácido acético acuoso y varios lavados. Luego de basificar con K₂CO₃ y extraer el compuesto neutro con Et₂O y precipitación lenta del producto puro por evaporación del solvente, se obtuvo el sólido de color verde (49,9 mg, 0,054 mmol) con un rendimiento del 90%. Caracterización del precursor: (a) ¹H NMR (500MHz, CHCl₃-*d*1) (ppm) 8.1 (t, 1H), 7.7 (dd, 1H), 7.5 (dd 1H), 5.1 (t, 2H), 3.3 (t, 2H), 2.6 (s, 6H); (b) ¹³C NMR (125MHz, CHCl₃-*d*1) (ppm) 120–115, 68.4, 46.4, 32.6, 22.6; (c) ESI-MS CH₂Cl₂) [M+H]⁺: *m/z* = 925.49 y [M+Na]⁺: *m/z* = 947.49; (d) UV-vis (etOH) ε = 3.1×10⁴ M⁻¹ cm⁻¹ (λ_{max} = 694.5 nm).

Para la síntesis de la ZnPcMet, se disolvieron en cloroformo 50,0 mg (0,053 mmol) del precursor y se trataron con yoduro de metilo en exceso (151,8 mg, 1,07 mmol) en presencia de DBU (8,1 mg, 0,053 mmol) y dicha mezcla se sometió a reflujo por 5 hs. Luego de

enfriarse a temperatura ambiente, el precipitado verde fue aislado por centrifugación y lavado con cloroformo fresco y eter. El rendimiento fue del 82% (101,1 mg, 0,067 mmol). Caracterización de ZnPcMet: (a) ^1H NMR (500MHz, DMSO- d_6) (ppm) 8.1 (t, 1H), 7.96 (m, 2H), 5.3 and 5.5 (broad t, 2H), 4.1 and 4.3 (broad t, 2H), 2.4, 3.2 and 3.3 (s, 9H); (b) ^{13}C NMR (125 MHz, DMSO- d_6) (ppm) 114–120, 64.6, 54.8, 53.8, 48.1, 27.5, 25.6, 21.7, 19.4; (c) ESI-MS (MeOH/H $_2$ O) $[\text{M}-2\text{CH}_3+3\text{I}]^+$: $m/z = 1081.6$, $[\text{M}-\text{H}-\text{I}+\text{NaI}]^{2+}$ and $m/2z = 693.57$, $[\text{M}-\text{CH}_3]^{3+}$: $m/3z = 323.34$, $[\text{M}-4\text{I}]^{4+}$: $m/4z = 246.33$; (d)UV-vis (buffer Tris) $\epsilon = 2.2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ($\lambda_{\text{max}} = 702.5 \text{ nm}$).

En la figura 1 se muestran las estructuras de ambas ftalocianinas.

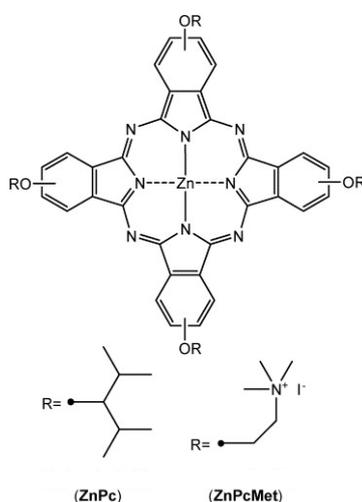


Figura 1: [Tetrakis(2,4-dimetil-3-pentiloxi)-ftalocianinato] de zinc(II) (ZnPc) y [Tetrakis(N,N,N-trimetilamonioetoxi)-ftalocianinato] de zinc(II) tetraioduro (ZnPcMet)

2.2.3. Preparación de liposomas ultradeformables (LUD)

LUD compuestos por SPC y ColNa en una proporción 6:1 p/p fueron preparados a partir de la mezcla de soluciones de los lípidos en CHCl_3 y $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1, v/v) respectivamente, la cual fue seguidamente evaporada en rotavapor a 40°C , 90 rpm en balón hasta eliminación del solvente orgánico. La fina película lipídica obtenida fue sometida a una corriente suave de N_2 para eliminar posibles trazas de solvente y luego fue hidratada con buffer Tris-HCl 10 mM con 0,9% (p/v) NaCl, pH 7,4 (buffer Tris), hasta una concentración final de alrededor de 43 mg de SPC/ml. La suspensión liposomal resultante fue sonicada (45 minutos en sonicador de baño de 80W, 40 KHz) y extruida 15 veces a través de tres filtros de policarbonato de 0,2, 0,1 y 0,1 m de diámetro de poro apilados utilizando un extrusor Thermobarrel extruder (Northern Lipids, Canada) de 100 ml de capacidad.

Básicamente, los mismos pasos descritos anteriormente fueron seguidos para incorporar ambas ftalocianinas en los LUD, co-solubilizando la ZnPc en la solución orgánica con los lípidos (2 mg ZnPc/g SPC) para preparar LUD-ZnPc y disolviendo la ZnPcMet en el buffer Tris (2,8 mg ZnPcMet/g SPC) para hidratar la película lipídica para obtener LUD-ZnPcMet.

La ZnPcMet no incorporada fue separada de los LUD-ZnPcMet por cromatografía de exclusión molecular en una columna de Sephadex G-50 utilizando el método de centrifugación en minicolumna (Fry et al, 1978). Debido a su baja solubilidad acuosa, no se debió separar ZnPc de la preparación de LUD-ZnPc.

Los liposomas convencionales -no ultradeformables, sin ColNa- utilizados como control fueron preparados por el mismo procedimiento.

2.2.4. Caracterización fisicoquímica de las ftalocianinas liposomales

La proporción ftalocianina/fosfolípido (mg/g) de cada preparación liposomal fue determinada por cuantificación de fosfolípidos y de ftalocianinas. Los fosfolípidos liposomales fueron cuantificados por un microensayo colorimétrico de fosfatos (Bötcher et al, 1961) mientras que las ftalocianinas liposomales fueron cuantificadas por absorbancia luego de la ruptura completa de un volumen de la suspensión liposomal en 10 volúmenes de etanol. La absorbancia fue medida a λ_{max} de la banda Q (707 y 702 nm para ZnPc y ZnPcMet, respectivamente) en un espectrofotómetro UV-vis Shimadzu UV-160 A. Las curvas de calibración preparadas en etanol para cuantificar cada ftalocianina presentaron linealidad en el rango de concentración de 0,6-4,7M para ZnPc y 1,2-7,5 M para ZnPcMet, con un coeficiente de correlación lineal superior a 0,998.

El tamaño promedio de los LUD fue determinado por dispersión de luz dinámica (*dynamic light scattering*) con un Autosizer 2C (Malvern) inmediatamente después de la preparación y seguido a través del tiempo para determinar su estabilidad coloidal con un Microtrac Ultrafine Particle Analyzer. El potencial zeta fue determinado con un Zetasizer 4 (Malvern). Las imágenes de LUD obtenidas por microscopía electrónica de transmisión luego de la tinción negativa con acetato de uranilo fueron obtenidas con un equipo TEM Jeon 1210, 120 kVm equipado con un EDS analyzer LINK QX 2000.

2.2.5. Calorimetría diferencial de barrido

La temperatura de transición de fase (T_m) y el la variación de entalpía asociada (H_{cal}) de LUD fueron determinados por calorimetría diferencial de barrido entre -50 y 30 °C a una velocidad de 10 °C/min, en un Mettler Toledo DSC 822.

2.2.6. Test de deformabilidad

El flujo de 3,5 ml de LUD, LUD-ZnPC, LUD-ZnPcMet y de liposomas convencionales impulsados por una fuerza externa de 0,8 MPa a través de dos membranas apiladas de poro de 50 nm de diámetro -barrera nanoporosa- (en Thermobarrel extruder) fue determinado para estudiar la deformabilidad según Cevc, 1995. El volumen extruido fue recolectado por minuto a lo largo de 15 minutos y se cuantificaron los fosfolípidos presentes en cada fracción. Ambas ftalocianinas fueron cuantificadas en el volumen total recuperado.

Adicionalmente, el grado de retención (GR) de la fase acuosa liposomal fue determinado luego del pasaje a través de la barrera nanoporosa. Con ese fin, se incorporó el par fluoróforo/apagador de contacto, HPTS/DPX, en liposomas convencionales y en LUD, que se prepararon básicamente como se describió en la sección 2.2.3, excepto que las películas lipídicas fueron hidratadas con una solución de HPTS 35 mM y DPX 50 mM en buffer Tris. Luego de la extrusión, el HPTS y DPX no incorporados fueron eliminados por cromatografía de exclusión molecular en Sephadex G50 como se describió anteriormente. La intensidad de emisión de fluorescencia del HPTS (λ_{exc} , 465 nm; λ_{em} , 516 nm) fue monitoreada en un fluorómetro de fase multifrecuencia ISS K2, antes y después del pasaje a través de la barrera de 50 nm, impulsados por una presión de 0,8 MPa para LUD y de 2,5 MPa para liposomas convencionales.

El GR fue calculado como: $100 - [(I_0 - I) / I] \times 100$, donde I_0 es la intensidad de fluorescencia luego del pasaje a través del filtro de 50 nm, I la intensidad de fluorescencia antes del pasaje, e I la intensidad total obtenida tras la adición del detergente no iónico Tritón X-100 al 0,1% (v/v) con el fin de lograr la disrupción de los liposomas y por tanto la liberación total del fluoróforo.

2.2.7. Caracterización fotoquímica de las ftalocianinas libres y liposomales

2.2.7.1. Espectroscopia de absorción y emisión de fluorescencia

Los espectros de absorción electrónica fueron obtenidos con un espectrofotómetro Shimadzu UV-3101 PC usando etanol, buffer Tris o LUD vacíos como referencia.

Los espectros de emisión de fluorescencia fueron monitoreados en un espectrofluorómetro QuantaMaster Model QM-1 PTI. Los espectros de emisión entre 630 y 800 nm fueron obtenidos a una longitud de onda de excitación de 610 nm (banda Q), utilizando un filtro de corte para evitar que el haz excitador llegase al detector (Schott RG 630). Asimismo se restó el espectro de los liposomas vacíos a los espectros de emisión y de absorción de las

ftalocianinas liposomales para corregir la dispersión de luz asociada.

2.2.7.2 Rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F)

Los rendimientos cuánticos de fluorescencia (Φ_F) para soluciones saturadas en aire de ftalocianinas libres y liposomales fueron determinados por comparación con el rendimiento cuántico de fluorescencia de tetra-*t*-butilftalocianinato de zinc(II) en tolueno ($\Phi_F = 0,33$) utilizado como referencia (Fernandez et al, 1996). Los rendimientos cuánticos fueron calculados de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Phi_F^S = \Phi_F^R \frac{I_S (1 - 10^{-A_R})}{I_R (1 - 10^{-A_S})} \left(\frac{n_S}{n_R} \right)^2$$

donde R y S aluden a la referencia y a la muestra respectivamente. I es el área integrada bajo el espectro de emisión, A es la absorbancia de la solución a la longitud de onda de excitación y $(n_S/n_R)^2$ es la corrección del índice de refracción. Se asumió el mismo índice de refracción del agua para la solución de buffer y para el medio liposomal diluido. Las densidades ópticas fueron fijadas por debajo de 0,1 unidades de absorbancia a la longitud de onda de excitación (610 nm).

2.2.7.3. Rendimiento cuántico de oxígeno singlete ($\Phi_{O_2^1g}$)

La foto-producción de oxígeno singlete (O_2^1g) fue cuantificada por irradiación del estado estacionario en presencia de DPBF para ZnPc en solución etanólica, y para ZnPcMet y ambas ftalocianinas liposomales, en presencia de imidazol (8 mM) y *N,N*-dietil-4-nitrosoanilina (40-50 μ M) en buffer Tris. Las suspensiones fueron saturadas con aire e irradiadas bajo agitación continua en celdas de 10 mm de longitud de recorrido óptico. La decoloración de la nitrosoanilina fue monitoreada espectrofotométricamente a 440 nm (en un espectrofotómetro Shimadzu UV-160) en función del tiempo y los rendimientos cuánticos fueron calculados utilizando azul de metileno como referencia ($\Phi_{O_2^1g} = 0,56$ en buffer y etanol) (Wilkinson et al, 1995).

Las velocidades de decoloración de la nitrosoanilina se utilizaron para calcular las velocidades de fotogeneración del oxígeno singlete (Kraljuc and El Moshni, 1978; Lagorio et al, 1993). La irradiación policromática fue realizada utilizando una lámpara proyectora (Philips 7748SEHJ, 24V-250W) y un filtro de corte de 630 nm (Schott, RG 630). La muestra y la referencia fueron irradiadas dentro del mismo intervalo de longitud de onda $\lambda_1 - \lambda_2$, y el ($\Phi_{O_2^1g}$) fue calculado de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$\Phi_{\Delta}^S = \Phi_{\Delta}^R \frac{r^S \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I_0(\lambda)(1 - 10^{-A^R(\lambda)}) d\lambda}{r^R \int_{\lambda_1}^{\lambda_2} I_0(\lambda)(1 - 10^{-A^S(\lambda)}) d\lambda}$$

donde r es la velocidad de generación de oxígeno singlete, los superíndices S y R indican a la muestra y a la referencia respectivamente, A es la absorbancia a la longitud de onda de irradiación e $I_0(\lambda)$ es el flujo fotónico del espectro incidente (mol/s/nm). Cuando el rango de longitud de onda de irradiación es estrecho, la intensidad incidente varía suavemente con la longitud de onda y la muestra y la referencia tienen espectros solapados, I_0 puede ser aproximado a un valor constante el cual puede colocarse fuera de las integrales y por ende cancelado.

El rendimiento cuántico de oxígeno singlete de la referencia fue medido en suspensiones liposomales y comparado con el mismo experimento en soluciones buffer obteniéndose el mismo resultado, por lo que se concluyó que el medio liposomal no afectaba esta determinación.

2.3. Resultados

2.3.1 Caracterización fisicoquímica de las ftalocianinas liposomales

Los resultados mostrados en la Tabla 1 muestran que la relación ftalocianina/fosfolípido para los LUD-ZnPc resultó ser casi el doble que la obtenida para LUD-ZnPcMet, mientras que la eficiencia de encapsulación fue del 85 y 53%, respectivamente.

El método de preparación generó LUD vacíos de 100 nm de diámetro con distribución unimodal y valor negativo de potencial Zeta. Como se observa en la tabla 1, la incorporación de ftalocianina no modificó los tamaños promedio en ninguno de los dos casos, permaneciendo el mismo en el orden de los 100 nm (con una distribución de tamaños estrecha a juzgar por su bajo índice de polidispersión), como así tampoco alteró el potencial Zeta. Adicionalmente, todas las suspensiones liposomales mostraron una buena estabilidad coloidal luego de su almacenamiento a 4°C por al menos 33 días, sin cambios significativos en su distribución de tamaños ni en su polidispersión.

Tabla 1. Caracterización físico-química de ftalocianinas liposomales.

	LUD-ZnPc	LUD-ZnPcMet
ftalocianina/SPC ^a	1,73 ± 0,53	0,95 ± 0,36
E.E. (%) ^b	85,5 ± 14,9	53,1 ± 4,8
Tamaño promedio (nm)	99,9 ± 1,2	112,7 ± 1,4
Índice de polidispersión	0,105	0,134
Potencial Zeta (mV)	-36,7 ± 3,8	-26,3 ± 3,1

^a Relación expresada como mg de ftalocianina por gramo de fosfolípidos Media ± D.S. (*n* = 3).

^b E.E.: eficiencia de encapsulación de ftalocianina (%). Media ± D.S. (*n* = 3).

La Figura 2 muestra una fotografía de una microscopía electrónica de transmisión de LUD-ZnPc, donde se observan vesículas unilamelares esféricas. En concordancia con las medidas por dispersión de luz, los liposomas presentaron un tamaño uniforme de 100 nm (ver inserto). No se observaron diferencias entre ambas ftalocianinas liposomales.

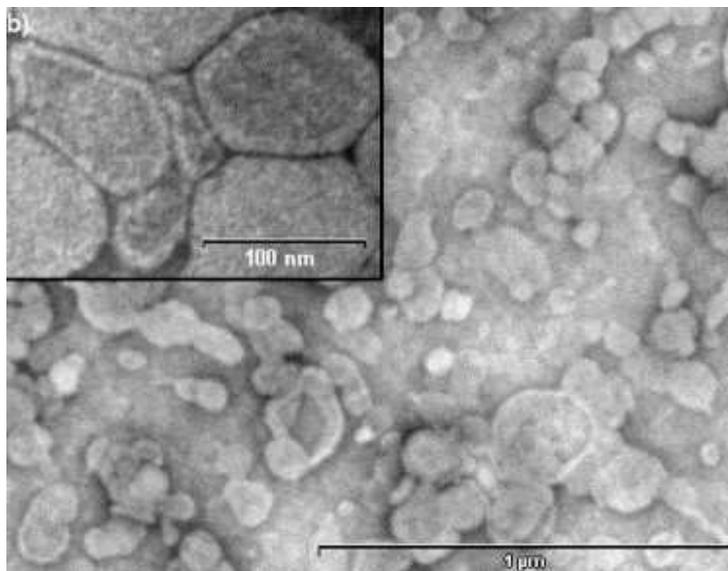


Figura 2: LUD al microscopio electrónico de transmisión

2.3.2. Mediciones calorimétricas

Se utilizó la calorimetría diferencial de barrido para determinar el efecto de la incorporación de ambas ftalocianinas en el comportamiento termotrópico de las bicapas liposomales. Como se observa en la figura 3, los perfiles termotrópicos de todos los liposomas mostraron dos picos endotérmicos, uno cercano a 0°C correspondiente a la fusión del medio acuoso y otro, por debajo de 0°C.

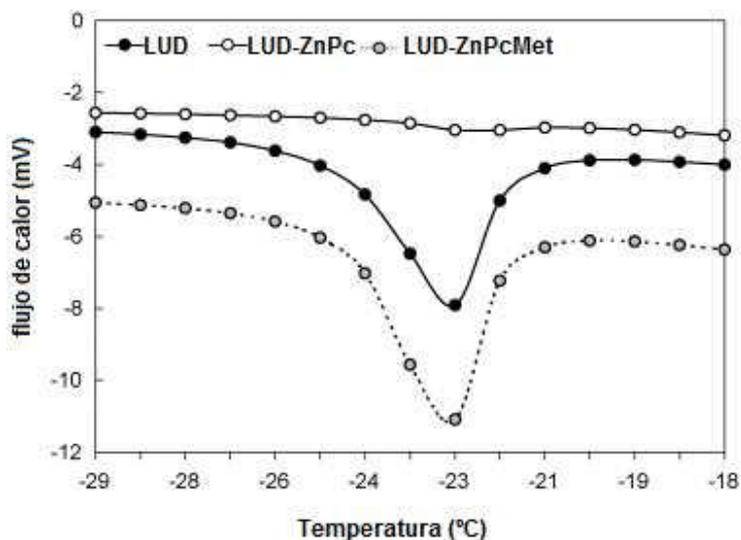


Figura 3

Los parámetros termodinámicos correspondientes a cada termograma se muestran en la Tabla 2:

Muestra	T_m^a (°C)	ΔH_{cal}^b (J/mmol fosfolípido)
LUD	-22,81	-210,47
LUD-ZnPcMet	-22,87	-158
LUD-ZnPc	-22,22	-5,33

^a Temperatura correspondiente al máximo del pico calorimétrico

^b Entalpía calorimétrica calculada como área bajo la curva.

La temperatura de transición obtenida no mostró diferencias significativas debidas a la incorporación de ambas ftalocianinas con respecto a los LUD vacíos. Sin embargo, la incorporación de ZnPc en los liposomas produjo un importante descenso de la entalpía de transición de fase, mientras que la incorporación de ZnPcMet también afectó dicho parámetro pero en menor proporción. Estos resultados indican que la ZnPc hidrofóbica, como se esperaba, se incorporó dentro de las bicapas, produciendo en consecuencia cambios significativos en la organización de la bicapa, disminuyendo la cooperatividad de la transición (Postigo et al, 2004). Por otro lado este efecto fue más débil para la ZnPcMet hidrofílica, probablemente a causa de su menor interacción con las membranas al quedar solubilizada en la fase acuosa interna de los liposomas.

2.3.3. Ensayo de deformabilidad

2.3.3.1. Deformabilidad liposomal

El pasaje de fosfolípidos liposomales a través de una membrana de poro de 50 nm de diámetro bajo una presión externa de 0,8 MPa se muestra en la figura 4.

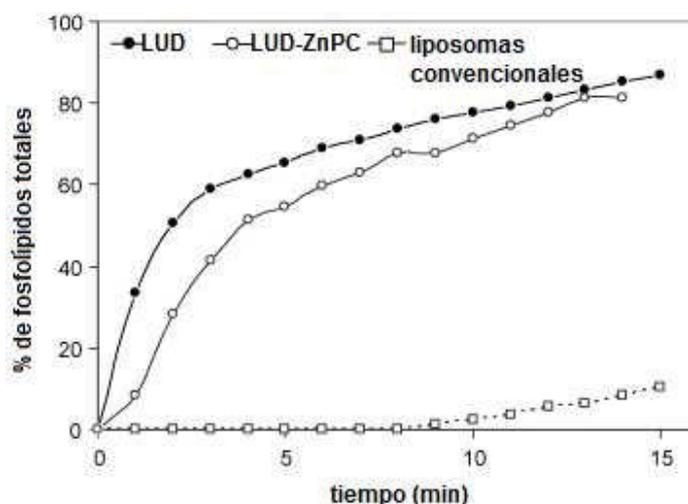


Figura 4: Flujo de LUD y liposomas convencionales a través de poro de 50 nm a 0,8 MPa

Los perfiles de fosfolípidos versus tiempo de todos los LUD (LUD vacíos y ambas ftalocianinas incorporadas a LUD) mostraron un modo bifásico, caracterizado por un pasaje de fosfolípidos rápido durante los primeros 5 minutos (60% de fosfolípidos recuperados) seguido por un pasaje más lento durante el resto de los 10 minutos, cuando prácticamente el 90% de los fosfolípidos fueron recuperados. Por el contrario, no se registró pasaje de fosfolípidos para liposomas convencionales durante los primeros 10 minutos, obteniéndose un máximo de 15% de fosfolípidos recuperados al cabo de los 15 minutos.

La elasticidad de las bicapas liposomales (D) se calculó de acuerdo a Van den Bergh et al. (2001), donde $D = J(rv/rp)^2$, donde el flujo (J) de liposomas a través de la barrera nanoporosa fue calculado como el área bajo la curva a partir del gráfico del pasaje de los fosfolípidos liposomales vs tiempo, rv corresponde al radio de los liposomas luego del pasaje y rp el radio del poro de la membrana. Los resultados indicaron que los LUD vacíos y ambas ftalocianinas liposomales presentaron la misma elasticidad ($D= 283$) y resultaron 28 veces más elásticos que los liposomas convencionales ($D= 10$).

2.3.3.2. Grado de retención de contenido acuoso (GR)

El par fluoróforo/apagador HPTS/DPX fue incorporado en LUD y en liposomas convencionales con el fin de cuantificar su GR. El HPTS es una molécula fluorescente soluble en agua e impermeable a membranas que se apaga cuando es co-encapsulada con DPX. El efecto de apagado se revierte si el HPTS es liberado al medio externo como consecuencia de la pérdida de contenido o ruptura liposomal. La intensidad de fluorescencia del HPTS liberado se utilizó para calcular el GR de los liposomas sometidos a un estrés mecánico, en este caso el pasaje a través de la barrera nanoporosa de 50 nm de diámetro. Se utilizó una presión de 2,5 MPa sobre liposomas convencionales para obtener el mismo flujo de fosfolípidos que para LUD a 0,8 MPa, y así comparar los GR obtenidos en condiciones de flujo similares.

Los resultados revelaron que el 76% del HPTS se mantuvo dentro de los LUD, mientras que solamente el 7,5% del HPTS quedó retenido dentro de los liposomas convencionales luego del pasaje a través de la barrera. La cuantificación de ZnPc luego del evento de estrés al que se sometieron los LUD-ZnPc no reveló pérdidas relevantes de la ftalocianina de los liposomas. Para la ZnPcMet sólo se observó la pérdida de una porción minoritaria (alrededor del 15%), en coincidencia con el valor de liberación del HPTS.

2.3.4. Caracterización espectroscópica

Los espectros de absorción de ambas ftalocianinas en medios homogéneos (etanol o

buffer) e incorporadas a liposomas se muestran en la figura 5.

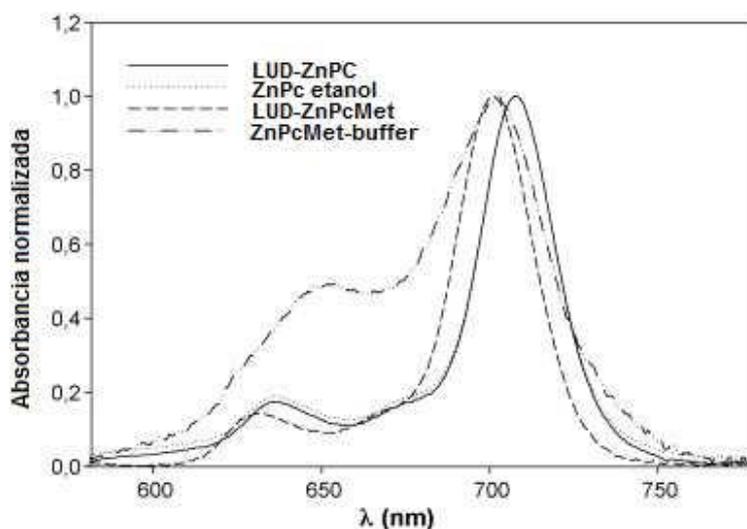


Figura 5

No se observaron desplazamientos significativos ni modificaciones relevantes de los espectros de ZnPc libre (en etanol) y para ambas ftalocianinas incorporadas en liposomas. Los máximos de absorción fueron encontrados a 707 nm para ambas ZnPc – tanto en etanol como incorporada a liposomas- y a 702 nm para ambas ZnPcMet -en buffer y en liposomas-. Dichos espectro fueron los característicos del estado monomérico reportados previamente para ftalocianinas (Wilkinson et al., 1995; Strassert et al., 2003). No se observaron efectos de la concentración en los espectros de absorción de ZnPc en el rango de concentraciones estudiado en etanol (1×10^{-8} a 1×10^{-6} M), ni en liposomas (1×10^{-6} a 2×10^{-6} M). ZnPcMet es altamente soluble en agua, pero se evidenció cierta agregación a partir de las desviaciones de la ley de Lambert-Beer en el rango de concentración estudiado (1×10^{-8} a 1×10^{-6} M). Su espectro de absorción en buffer reveló una banda importante correspondiente a un dímero a 650 nm. Esta situación fue revertida cuando la ftalocianina fue incorporada en liposomas, ya que la banda del monómero en 701 nm incrementó su tamaño y la banda de absorción a 650 nm del dímero se volvió imperceptible.

Los espectros de emisión de fluorescencia de las ftalocianinas incorporadas en liposomas se muestran en la figura 6.

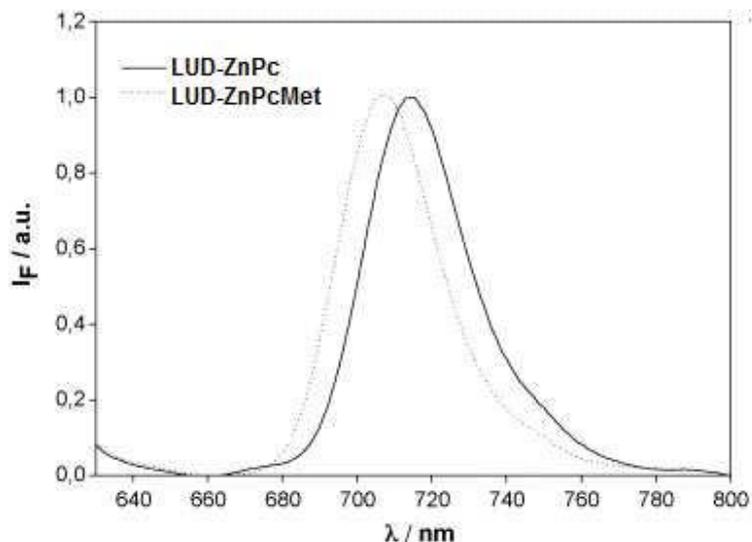


Figura 6

Para ambas ftalocianinas –en solución e incorporadas a liposomas-, no se observaron desplazamientos significativos en la longitud de onda del máximo ni modificaciones relevantes en la forma de los espectros de emisión, indicando que el monómero es la única especie fluorescente.

Como se muestra en la Tabla 3, el rendimiento cuántico de fluorescencia (Φ_F) y el rendimiento cuántico de oxígeno singlete (Φ_Δ) fueron los mismos para ZnPc en etanol y para ambas ftalocianinas incorporadas en liposomas. Para la ZnPcMet, ambos rendimientos fueron más bajos en solución buffer que en liposomas, indicando agregación en la solución homogénea.

Tabla 3. Propiedades del estado fundamental/excitado de la ZnPc libre y la ZnPcMet en etanol y buffer respectivamente, e incorporadas a LUD

	Concentración (M)	λ_{\max} (nm)	$\epsilon_{\lambda_{\max}}$ ($M^{-1} \text{ cm}^{-1}$)	Φ_F	Φ_Δ
ZnPc libre (etanol)	3.47×10^{-7}	707	1.00×10^6	0.20 ± 0.03	0.80 ± 0.16
ZnPcMet libre (buffer)	1.06×10^{-6}	702	2.21×10^4	0.11 ± 0.02	0.21 ± 0.04
LUD-ZnPc	9.52×10^{-8}	707	1.16×10^6	0.20 ± 0.04	0.61 ± 0.12
LUD-ZnPcMet	1.40×10^{-7}	701	5.32×10^5	0.20 ± 0.04	0.79 ± 0.16

Estos resultados sugieren que ambas ftalocianinas fueron incorporadas dentro de los liposomas ultradeformables en estado monomérico.

2.4. Discusión

Para ser utilizado en terapia fotodinámica (TFD), un derivado de ftalocianina debe presentar una alta absorción en la región del rojo del espectro visible para conseguir una penetración más profunda en tejidos biológicos (Yarmush et al., 1993), alto coeficiente de extinción molar (ϵ) y fotoestabilidad. Eloxígeno singlete generado por estos sensibilizadores tras la absorción de luz, es la especie reactiva responsable de la actividad antimicrobiana o antitumoral (Ben-Hur y Rosenthal, 1985). Las ftalocianinas de zinc y de aluminio han sido extensamente estudiadas con el objeto de ser utilizadas en TFD, no sólo debido a sus altos rendimientos cuánticos del estado triplete y larga vida media de esa especie reactiva que lleva a un alto $\Phi\Delta$, sino también por su bajo ΦF (Paquette and Van Lier, 1992). Desde un punto de vista fotoquímico, el diseño de fotosensibilizadores liposomales se delinea intentando incrementar la concentración del monómero y por ende el $\Phi\Delta$ en medios acuosos. Desde un punto de vista estructural, las propiedades elastomecánicas de los LUD utilizados en este estudio se deben a combinaciones precisas de sus tres componentes; un cuarto componente podría desplazar ese equilibrio, induciendo fases no lamelares o bicapas no ultradeformables (Almgren, 2000). Por ello, el impacto de los derivados de ftalocianinas hidrofóbicos e hidrofílicos en la estabilidad y deformabilidad de las fases lamelares y la determinación del estado monomérico dentro del liposoma conformaron la parte inicial de este trabajo.

La incorporación de fotosensibilizadores a liposomas fue encarada desde distintas ópticas en términos de desplazamiento del equilibrio dímero/monómero. En reportes previos ZnPc se incorporó en liposomas por el método de inyección en etanol obteniéndose hasta 5 M en la forma monomérica (Oliveira et al., 2005). Derivados de porfirinas hidrofóbicos (Postigo et al., 2004), hipocrelina B (Yu et al., 2001) y fotofrina (Sadzuka et al., 2005) fueron incorporados a liposomas por hidratación de la película de lípidos obteniéndose formas monoméricas cuya concentración no fue reportada, pero con un $\Phi\Delta$ más bajo que aquéllos obtenidos en solvente orgánico para derivados de porfirinas e hipocrelina B, aunque más altos que los obtenidos para fotofrina en medio acuoso. La adición simple de un derivado clorado de porfirina (Das et al., 2005) o una ZnPc octasustituída (Rodríguez et al., 2003) a liposomas preformados genera agregados a concentraciones de 6,7 y 2,7 M, respectivamente. Los resultados del presente trabajo muestran que empleando el método de hidratación de la película lipídica seguido de extrusión, es posible incorporar tanto el derivado hidrofóbico como hidrofílico de las ftalocianinas en vesículas unilamelares de 100 nm de baja polidispersión con alto potencial Zeta y estabilidad coloidal por al menos 30 días. La ZnPc liposomal no sólo proveyó una forma soluble en buffer acuoso de ZnPc, sino que también se obtuvo un $\Phi\Delta$ casi igual a aquél obtenido en solvente orgánico, indicando que la forma monomérica estaba presente. Por otro lado, a juzgar por su

espectro de absorción y su bajo valor de $\Phi\Delta$, la ZnPcMet libre se agregó a 0,01 M en buffer; sin embargo, la ZnPcMet liposomal a una concentración 0,1 M mostró un $\Phi\Delta$ cuatro veces más alto que el correspondiente a la forma libre. Una ventaja destacable es que los liposomas pueden someterse a diálisis o a procesos de deshidratación, permitiendo un mayor incremento de la concentración monomérica en la dispersión entera. Un rango amplio de moléculas (desde esteroides de bajo peso molecular hasta péptidos y proteínas) se han incorporado recientemente en LUD (Cevc et al., 1998; Hofer et al., 1999; El Maghraby et al., 2000; Cevc and Blume, 2001, 2003, 2004; Essa et al., 2002; Fesq et al., 2003; Simoes et al., 2004; Fang et al., 2006); por otro lado, los fotosensibilizadores han sido incorporados en liposomas convencionales (Decreau et al., 1999; Namiki et al., 2004; Takeuchi et al., 2004; Liu et al., 2005; Rancan et al., 2005; Magaraggia et al., 2006). Este es, sin embargo, el primer reporte en el que se incorporan fotosensibilizadores en LUD.

El ΔH_{cal} de las matrices ultradeformables determinado por calorimetría diferencial de barrido reveló que la ZnPc se insertó con una profundidad y una magnitud lo suficientemente fuerte como para casi eliminar la cooperatividad en la transición de fase de la bicapa. Sin embargo, ni la inserción de la ZnPc ni la interacción más débil de la ZnPcMet afectaron la deformabilidad de la membrana, que resultó en el orden de la encontrada por van den Bergh (van der Bergh et al., 2001). La pérdida de contenido acuoso cuando se sometieron los LUD a un estrés de extrusión –otro parámetro típico de caracterización en matrices ultradeformables- no fue afectada por la presencia de ZnPc ni de ZnPcMet, resultando tres veces menor que la de liposomas convencionales. La cuantificación post-estrés de la ZnPc no mostró pérdidas significativas de los liposomas; mientras que se perdió una cantidad minoritaria de ZnPcMet, comparable a la cantidad de HPTS perdida. En el ensayo de deformabilidad mostrado en este trabajo, solamente los liposomas ultradeformables pudieron atravesar dos membranas de policarbonato de 50 nm de poro ante la aplicación de una presión externa de 0,8 MPa; en esas condiciones, el flujo de fosfolípidos fue indicativo de la deformabilidad de los liposomas. *In vivo*, el gradiente de hidratación transdérmico que existe fisiológicamente (el cual va desde cerca de un 15% de humedad relativa en la superficie de la piel hasta un 70% en la capa basal), provee la fuerza motriz -aun en ausencia de una presión externa- para que las vesículas altamente hidratadas se muevan hacia capas más profundas, con mayor hidratación (Rama Krishna y Marsh, 1990; Seddon et al., 1990). También es sabido que ello contribuye al ensanchamiento de las uniones intercelulares más débiles en la barrera y crea canales transcutáneos de 20-30 nm de ancho (Heimburg et al., 1990). Es importante remarcar que cualquier vesícula hidratada colocada sobre la superficie de la piel experimentará tal fuerza, pero solamente los liposomas ultradeformables, debido a sus propiedades elastomecánicas, pueden hacer efectivamente uso de ella para moverse a través de los

nanocanales hidrofílicos sin fusionarse ni coalescer. Por esto, no es necesario el uso de ningún artefacto clínico para forzar la penetración de los liposomas ultradeformables; es más, su aplicación no precisa ser mediada por parches oclusivos, dado que en esas condiciones el gradiente de hidratación -y por lo tanto la fuerza motriz- es disipado (Cevc y Gebauer, 2003).

En suma, estos resultados han revelado que los LUD pudieron ser cargados con altas concentraciones de fotosensibilizadores hidrofóbicos e hidrofílicos en estado monomérico, lo cual no perturbó la ultradeformabilidad de la matriz.

CAPÍTULO 3

UN MODELO SENCILLO PARA LA PREDICCIÓN DEL NÚMERO DE VESÍCULAS DE UNA SUSPENSIÓN LIPOSOMAL UNILAMELAR

Parte de este capítulo ha sido enviada para su publicación al Journal of Liposome Research

3.1. Introducción

Así como en los estudios de infección *in vitro* se indica el número de parásitos por célula presente en el cultivo a infectar, la determinación de actividad *in vitro* de nanoSED (nano-objetos) como son los liposomas unilamelares pequeños, requiere de conocer el número de nano-objetos que se ponen a disposición de un número conocido de células, es decir conocer la relación “número de nano-SED por célula”. Esta relación describe más precisamente la actividad de sistemas particulados que la mera concentración en unidades de masa o moles de material, medida más lógicamente representativa de sistemas homogéneos como las soluciones. Esta referencia habitual a la concentración del activo en una suspensión, sin precisar su distribución en un número determinado de partículas, puede llevar a conclusiones erróneas en ensayos de toxicidad comparativa, dinámicas de respuesta celular, y otros ensayos *in vitro* (Teegarden et al, 2007).

Dado que el volumen es una magnitud que varía cúbicamente respecto del radio, y considerando que no hay pérdida sustancial de masa total del sistema, deviene importante conocer de que manera los cambios en el tamaño promedio de liposomas de una suspensión (causados por ejemplo por la extrusión) incrementarían el número de liposomas de la población inicial.

Efectivamente, dado que la superficie es una magnitud que depende cuadráticamente del radio, el área de una bicapa se reduce más rápidamente que su diámetro cuando los liposomas son extruidos, obligando a que los lípidos “sobrantes” formen nuevos liposomas. Por otra parte, este incremento es mucho mayor en los primeros pasos de extrusión, cuando la suspensión de la que se parte aún no es unilamelar, dado que los lípidos pasan de ordenamientos multicapa a arreglos de una sola bicapa por vesícula. De esta manera, la relación entre la concentración de un principio activo incorporado a liposomas y el número de liposomas, varía con el cambio del tamaño de éstos.

Cuanto más pequeños son los liposomas, menor es su radio de curvatura y ello conlleva un aumento de la asimetría en el empaquetamiento de lípidos respecto de las membranas interna y externa (Yeagle et al., 1976, Israelachvili, 1977), existiendo más lípidos en la membrana exterior que en la interior, además de que el área superficial ocupada por cada cabeza polar es mayor en la membrana exterior que en la interior (Huang y Mason, 1978). El área superficial que ocupa una molécula fosfolipídica en fase líquida cristalina ha sido calculado en distintas condiciones de hidratación y compactamiento,

encontrándose que puede variar en un pequeño rango (Small, 1967) y rondando por ejemplo para fosfatidilcolina los 0,60 nm² (Klauda et al., 2006). Asimismo, no existe una contribución importante al área de la sección horizontal del lípido atribuible a las colas apolares, en tanto éstas no superen una longitud crítica que les permita dentro del estado fluido extender su proyección vertical más allá de los límites de la cabeza polar (Israelachvili, 1977).

La propuesta de este capítulo es desarrollar un modelo teórico para el cálculo del número de liposomas a partir del diámetro y la masa de fosfolípidos. El modelo se contrastó con conteos directos de liposomas cargados con fluoróforo (HPTS) en cámara de Neubauer luego de diluciones seriadas. La ventaja respecto de otros métodos de cálculo (Pidgeon y Hunt, 1981, Epstein et al., 2006) es la sencillez de la aproximación utilizada y las expresiones obtenidas.

3.2. Materiales y métodos

3.2.1 Materiales

La fosfatidilcolina de soja (SPC) (phospholipon 90 G, pureza 92-98 %) se obtuvo como donación de Phospholipid/Natterman, Alemania. El Sephadex G-50 fue comprado a Sigma. El ácido 8-hydroxypyrene-1,3,6-trisulfónico (HPTS) fue comprado a Molecular Probes (Eugene, OR, USA). Los demás reactivos fueron de grado analítico, de Anedra, Argentina.

3.2.2 Preparación liposomal

Los LUD marcados con el fluoróforo HPTS se prepararon como se describió en el capítulo 2, sección 2.2.6., sin el agregado del apagador de fluorescencia DPX. El HPTS en una concentración 35 mM fue incorporado al buffer de resuspensión, separándose al final de la preparación el HPTS no incorporado en una CEM de Sephadex G-50. El tamaño promedio de los liposomas fue medido por dispersión de luz dinámica con un nano-Z sizer (ZEN 3600, Malvern, UK), y se cuantificaron los fosfolípidos (Fry et al., 1978).

3.2.3 Desarrollo teórico del cálculo

Asumiendo una población liposomal uniforme, monodispersa, unilamelar, de liposomas esféricos, con un espesor de la bicapa despreciable –alrededor de 4 nm (Janshoff and Steinem, 2001)-, y suponiendo despreciables las fluctuaciones espontáneas de la matriz como mosaico fluido,

Si r_L = radio del liposoma (*dato experimental obtenido por dispersión dinámica de luz*), entonces el área superficial del liposoma (SL) se puede calcular de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$S_L = 4 r_L^2$$

Si, por otro lado, **S_{PL}** es el área superficial de la cabeza de un fosfolípido (*dato bibliográfico, que puede establecerse en 0,74 nm² para SPC de monocapa externa, y 0,6 nm² para SPC de monocapa interna*), el aporte de esta superficie a la superficie total del liposoma puede considerarse a partir de lo siguiente:

Asumiendo una forma de cabeza esférica para el fosfolípido y dada la superficie de una esfera ($S = 4 r^2$), el radio de la cabeza polar (**r_{PL}**) se puede calcular de acuerdo a:

$$r_{PL} = (S_{PL}/4)^{1/2}$$

Suponiendo un empaquetamiento *compacto* de cabezas lipídicas, podría considerarse la superficie del liposoma como la suma de las *proyecciones del área expuesta de cada cabeza*. Asimismo, si el radio del liposoma es \gg que el radio de la cabeza de cada lípido, la *proyección del área expuesta* podría ser considerada un cuadrado cuyos lados son igual al diámetro de la cabeza, como se esquematiza en la Figura 3.1

$$(2 \cdot r_{PL})^2 = S_{APL}$$

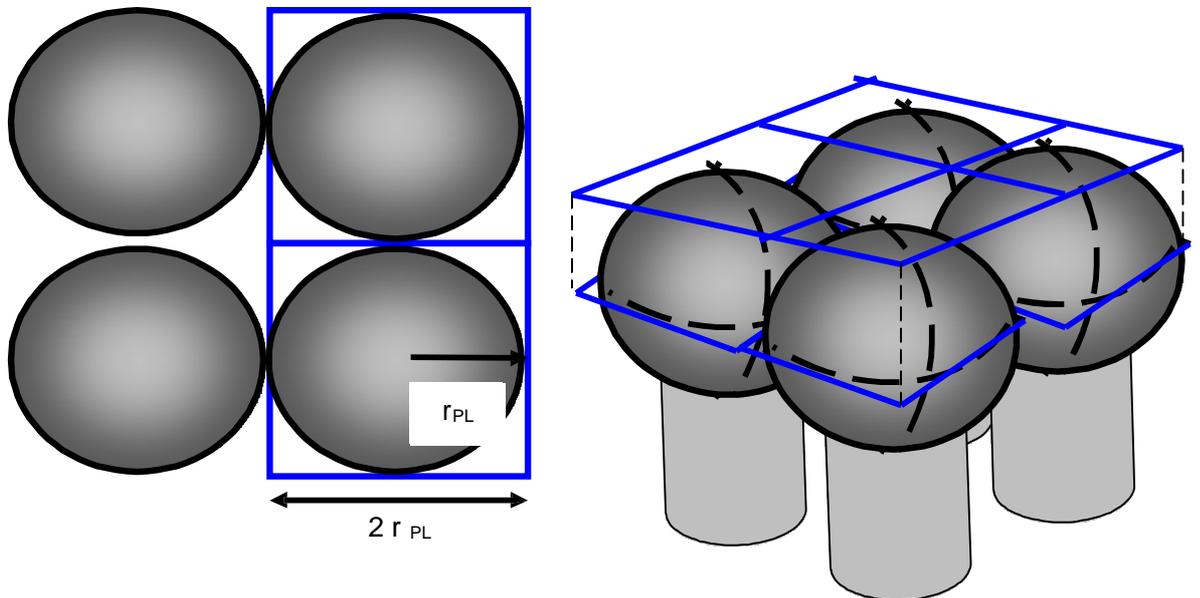


Figura 3.1: esquema de una pequeña porción de membrana liposomal. Las esferas representan las cabezas fosfolípídicas, cuya proyección plana puede inscribirse en un cuadrado (en azul) cuyos lados son iguales al diámetro de la cabeza

En esas condiciones, siendo **S_{APL}** la superficie aportada al liposoma por 1 fosfolípido. Ahora, suponiendo un empaquetamiento sin discontinuidades, se tiene que:

$$S_L/S_{APL} = N_{PL}/C$$

donde $N_{PL/C}$ es el número de lípidos en la monocapa interna de 1 liposoma (la capa interna es la que se encuentra más empaquetada, es decir con las cabezas polares ubicadas más cerca unas de otras), y entonces, como en la capa externa hay aproximadamente 2 veces más fosfolípidos que en la capa interna (Huang and Mason, 1978), se tiene que:

$$N_{PL/C} + 2 \cdot N_{PL/C} = 3 \cdot N_{PL/C} = N_{PL/L}$$

siendo $N_{PL/L}$ el número de lípidos por liposoma (es decir, en toda la bicapa)

Por otra parte, del peso molar del fosfolípido PM_{PL} (dato bibliográfico) y de la masa de fosfolípidos m_{PL} (dato experimental de pesada), se obtiene que:

$$(m_{PL} \cdot N_{Avogadro}) / PM_{PL} = N_{PL}$$

siendo N_{PL} el número total de moléculas de fosfolípido. (el N_{PL} también podría ser calculado directamente a partir de una determinación de fosfatos en la suspensión final).

Teniendo entonces el número total de fosfolípidos y el número de fosfolípidos por liposoma, el cociente:

$$N_{PL} / N_{PL/L} = N_L$$

donde N_L es el número de liposomas presentes en la suspensión que se deseaba calcular.

Adaptación del modelo para sistemas de bicapas con más de un lípido:

Para el caso de sistemas con más de un lípido componente, de cabezas polares con tamaños diferentes, ya no se tendría una sola S_{PL} que da un único r_{PL} y que permite calcular una S_{APL} , sino que habría que calcular las diferentes S_{APLi} a partir de los respectivos S_{PLi} y r_{PLi} , e integrarlos finalmente en la sumatoria:

$$\sum_{i=1}^n (S_{APLi} \cdot X_i)$$

donde X_i es la fracción molar de dicho lípido respecto del total.

Ahora entonces el $N_{PL/C}$ se obtendrá del cociente:

$$N_{PL/C} = \frac{S_L}{\sum_{i=1}^n (S_{APLi} \cdot X_i)}$$

y por último, a menos que el N_{PL} se obtuviera de una valoración de fosfatos, se debe calcular sumando el número de lípidos que aporta cada especie:

$$N_{PL} = \sum_{i=1}^n N_{PLi}$$

La adaptación para sistemas de más de un lípido podría hacerse siempre que los lípidos componentes posean empaquetamiento compacto, y una cabeza esférica de modo que sea válida la suposición de la proyección en forma de cuadrado plano.

3.2.4 Conteo directo de liposomas

Se realizaron 4 diluciones seriadas 1:100 de la suspensión, se cargaron 100 μ l de la última dilución en una cámara de Neubauer y se contaron los liposomas en un microscopio de fluorescencia. El ensayo fue realizado por triplicado

3.3. Resultados

3.3.1 Medidas de tamaño

Los liposomas resultaron medir 100 nm en promedio y tener una concentración de 40 mg/ml de SPC

3.3.2 Resultados teóricos

Por el método teórico, se calculó que 1 ml de una suspensión de liposomas de 100 nm de diámetro conteniendo 40 mg de SPC tendría $6,4 \times 10^{13}$ liposomas.

A ello se llegó del siguiente modo:

$$r_L = 50 \text{ nm}$$

$$4 (50 \text{ nm})^2 = 3.1416 \times 10^4 \text{ nm}^2 = S_L,$$

por otro lado, siendo $S_{PL} = 0,6 \text{ nm}^2$, se tiene que:

$$\sqrt{(0,6 \text{ nm}^2/4)} \times 10^{-1} \text{ nm} = r_{PL},$$

$$(2 \times 10^{-1} \text{ nm})^2 = 1.908 \times 10^{-1} \text{ nm}^2 = S_{APL}$$

$$\text{Entonces, } 3.1416 \times 10^4 \text{ nm}^2 / 1.908 \times 10^{-1} \text{ nm}^2 = 1,6465 \times 10^5 = N_{PL/C}$$

$$3 \times 1,6465 \times 10^5 = 4.94 \times 10^5 = N_{PL/L}$$

$$\text{y como } (0,040 \text{ g} \times 6.02 \times 10^{23}) / 0,760 \text{ g} = 3.168 \times 10^{19} = N_{PL}$$

$$3.168 \times 10^{19} / 4.94 \times 10^5 = \mathbf{6.41 \times 10^{13}} = N_L$$

3.3.3 Recuento de liposomas

Se contó un promedio de 63 liposomas por cuadrante en la cámara de Neubauer, lo que teniendo en cuenta el volumen de la cámara y las diluciones efectuadas correspondió a $6,3 \times 10^{13}$ liposomas en 1 ml de la suspensión original

3.4 Discusión

Desde un punto de vista matemático, es esperable que toda reducción en el tamaño de una población liposomal, incremente el número de liposomas formados *de novo*. De hecho, un cambio moderado en el tamaño medio de una población liposomal debido a la extrusión o de tiempo de sonicación, generará grandes incrementos en la cantidad de liposomas presentes en la suspensión. De acuerdo al presente modelo, por ejemplo, para una concentración de fosfolípidos invariante, la reducción del tamaño promedio de una suspensión de 200 nm a la mitad cuadruplica el número de liposomas formados. Esto lleva a pensar que podría no ser solamente el factor tamaño *per se* el responsable de resultados experimentales (p.ej. una mayor o menor tasa de fagocitosis) que difieran de un experimento a otro donde se dispone de formulaciones de composición lipídica idéntica pero con tamaños promedios distintos, sino también del aumento o disminución del número de liposomas a disposición de las células para que ocurran eventos que se desean medir.

En cuanto al método desarrollado para calcular el número de liposomas en función de su diámetro y masa de fosfolípidos, la descripción intenta ser sencilla y aplicable a liposomas de distinto tamaño y composición, llegando a un resultado que pudo ser

contrastado experimentalmente sin introducir cálculos complejos como la solución de integrales, o funciones con varias variables, como los son otros métodos de cálculo (Pidgeon y Hunt, 1981, Epstein et al., 2006). No se busca hacer predicciones cuantitativas exactas sino tener una idea rápida del orden de cantidad de liposomas que se tendrá en una suspensión liposomal dada, como elemento que permita confirmar la similitud entre distintos experimentos en los que el número de liposomas en un volumen dado pudiese tener incidencia. El contraste experimental con el modelo teórico resultó ampliamente satisfactorio encontrándose menos de un 2% de diferencia entre el valor predicho y el real contabilizado.

De esta manera se podrá conocer la cantidad de liposomas que se ponen en contacto con cultivos de células de mamífero o con promastigotes de *Leishmania*, así como la proporción final de liposomas en cada ensayo, dadas las alícuotas de suspensiones utilizadas, su dilución, y el volumen final en el que interactúan con las células una vez adicionados al medio de cultivo en la multiplaca.

Respecto de la generalización para sistemas con más de un lípido, es importante marcar que se debe tener en cuenta el área que aporta el lípido en la mezcla y no el área superficial del mismo en una fase pura, ya que ello no tendría en cuenta el efecto de acomodamiento en la fase lamelar que pueden tener las distintas moléculas complementando sus formas, tal el caso por ejemplo del colesterol y la fosfatidilcolina (Israelachvili y Mitchell, 1975), y que si bien existe asimetría en la distribución de los componentes de la mezcla entre la membrana interna y la externa, el radio de equilibrio del liposoma es el mismo que si no hubiese tal asimetría (Israelachvili et al., 1977), y por ende también su volumen y finalmente también la cantidad de liposomas de una suspensión.

Por último, si bien el método solamente permite evaluar sistemas unilamelares, como en este capítulo se habla de poblaciones liposomales de tamaño uniforme y las mismas se obtienen con métodos que implican desensamblar las multicapas obtenidas por la formación espontánea de liposomas, el modelo mantiene su utilidad práctica.

CAPÍTULO 4

UNA SOLUCIÓN A LA RECONSTITUCIÓN FALLIDA DE LIPOSOMAS ULTRADEFORMABLES TRAS SU DESHIDRATACIÓN

Parte de este capítulo ha sido publicada en International Journal of Pharmaceutics, sección Pharmaceutical Nanotechnology, 372 (2009) 184–190, “Avoiding failed reconstitution of ultradeformable liposomes upon dehydration”, J. Montanari, D.I. Roncaglia, L.A. Lado, M.J. Morilla, E.L. Romero

4.1. Introducción

Los liposomas ultradeformables (LUD) son liposomas altamente hidrofílicos que contienen activadores de borde tales como sales biliares, detergentes no iónicos, o etanol dentro de la matriz fosfolipídica para reducir el valor de su módulo de elasticidad (Cevc, 1995b). Aplicados en la superficie de la piel, los LUD pueden deformarse para atravesar canales estrechos sin agregarse o coalescer, y pueden penetrar espontáneamente hacia los estratos más profundos de la epidermis (Cevc y Blume, 1992, Cevc y Gebauer, 2003). Cualquier liposoma con un diámetro menor de 100 nm ha sido incluido en la definición más reciente de nano-objeto (ISO/TS 27687:2008 nanotechnologies – terminology and definitions for nano-objects – nanoparticle, nanofibre and nanoplate). Una mirada más profunda en el uso de diferentes tipos de estructuras vesiculares dentro del campo de entrega específica de drogas se describe en la agenda estratégica de investigación de la European Technology Platform Nanomedicine (<http://cordis.europa.eu/nanotechnology/nanomedicine:htm>), y de allí que la entrada de este tipo especial de liposomas al área clínica esté probablemente cerca de realizarse. Sin embargo, en función de su futura industrialización, varias cuestiones tales como su almacenamiento y vida útil o su correcta manipulación necesitan ser resueltas satisfactoriamente.

El método convencional para la preservación de liposomas es la deshidratación por liofilización (Crowe y Crowe, 1988; Crowe et al., 1994; Van Winden y Crommelin, 1999; Glavas-Dodov et al., 2005; Mohammed et al., 2006). En presencia de un disacárido lioprotector adecuado tal como trealosa o sacarosa (en una proporción mínima de 1-2 g disacárido/g lípido) tanto dentro como fuera de las vesículas, (Crowe y Crowe, 1993), y tras un procedimiento estándar de liofilización (Fransen et al., 1986; Bedu-Addo, 2004), los liposomas pueden ser re-hidratados manteniendo su tamaño medio y sin pérdidas significativas del soluto incorporado. Sin embargo, dado que se sabe que liposomas que contienen ácidos grasos o lisoderivados en sus matrices fosfolipídicas son altamente

inestables tras la liofilización (Crowe y Crowe, 1993), en el presente trabajo se planteó la duda de si la presencia de activadores de borde tales como el tensioactivo colato de sodio en los LUD constituirían una limitación estructural, ausente en liposomas convencionales, que podría dificultar su reconstitución posterior luego del secado. Hasta el momento no existían reportes que mostrasen la posibilidad de liofilizar LUD. Por ello, se ensayó la deshidratación de LUD por liofilización, pero también por técnicas de secado más suaves como secado por “*speed-vac*” y el secado al vacío (*vacuum dry*). Los residuos sólidos resultantes fueron re-hidratados y se determinó una serie de propiedades para definir la reconstitución exitosa: 1) ausencia de agregación. 2) manutención de la distribución de tamaño promedio, 3) retención de contenido acuoso, 4) manutención de ultradeformabilidad. Se encontró que los LUD no resistieron la liofilización, y solamente pudieron ser reconstituídos luego de deshidratarse por secado al vacío, pero no por *speed-vac*, aun en presencia de grandes cantidades de azúcares.

4.2 Materiales y métodos

4.2.1. Materiales

La fosfatidilcolina de soja (SPC, de “soy phosphatidyl choline”) (Phospholipon 90 G, pureza 92-98%) se obtuvo como donación de Phospholipid/Natterman, Alemania. El colato de sodio (CoNa), la sacarosa y el Sephadex G-50 se compraron a la firma Sigma. La ftalocianina Tetrakis (*N,N,N*- trimethylammoniumetoxi)- phthalocyaninate] zinc(II) tetraiodide (ZnPcMet) se sintetizó como se describe en Montanari et al, 2007 y en el Capítulo 2, sección 2.2.3. Los demás reactivos utilizados tuvieron grado analítico, comprados a la firma Anedra (Argentina).

4.2.2 Preparación liposomal

LUD compuestos de SPC y CoNa en una proporción de 6:1 en masa (26,6 mol% CoNa) fueron preparados a partir de una mezcla de lípidos provenientes de soluciones de CHCl_3 y $\text{CHCl}_3:\text{CH}_3\text{OH}$ (1:1 v/v) respectivamente, los cuales fueron luego evaporados en rotavapor a 40°C en balones de vidrio hasta eliminación del solvente orgánico. La película lipídica fina obtenida fue enfrentada a una corriente de nitrógeno para eliminar trazas del solvente que pudieran persistir, y luego fue hidratada con una solución de sacarosa ya fuese 0, 10 o 20% (p/v) en buffer Tris-HCl 10 mM con 0,9% (p/v) de NaCl, pH 7,4 (Tris buffer) hasta una concentración de SPC de 43 mg/ml, para obtener suspensiones liposomales cuya proporción azúcar/lípido en masa fuese de 0, 2 o 4 respectivamente. Esas suspensiones fueron sonicadas por 45 min en un sonicador de baño de 80 W a 40 kHz, y extruidas 15 veces a través de dos filtros de policarbonato apilados de 0,2 y 0,1 μm

de diámetro de poro, utilizando un extrusor Thermobarrel (Northern Lipids, Canada).

Se prepararon asimismo liposomas convencionales no ultradeformables (sin colato de sodio) utilizando el mismo procedimiento con sacarosa 0, 10 y 20 % (p/v).

4.2.3 Condiciones de secado

4.2.3.1. Liofilización

Se tomaron alícuotas de 450 µl en tubos Eppendorf de liposomas recientemente preparados y se sometieron a liofilización. Los tubos fueron congelados ya fuese a -18°C para maximizar la formación de hielo (Fennema, 1996) o a -120°C por 24 hs. Luego de ello, las muestras fueron incubadas a -80°C por 2 hs y colocadas dentro de la cámara de secado de un liofilizador Labconco Freeze Dry System/Freezone 4.5 (Kansas City, MO, USA), con una temperatura de enfriamiento previo de -40°C. El secado fue realizado en un rango de presión que fue desde 37.10^{-3} hasta 62.10^{-3} mbar por 24 hs. La cámara fue removida y los tubos cerrados y almacenados a -4°C hasta su análisis posterior.

4.2.3.2. Secado al vacío

Se secaron al vacío alícuotas de 50 l de liposomas recientemente preparados, a 25°C en tubos Eppendorf o en microplacas de 96 pocillos. Los tubos o las placas fueron colocados dentro de un desecador con silica gel recientemente secada y conectado a una bomba de vacío de aceite por 72 hs, cuando el peso de la muestra permaneció sin cambios. La humedad relativa durante el secado fue mantenida en un 20%.

4.2.3.3. Secado por “speed vac”

Se secaron alícuotas de 50 l de liposomas recientemente preparados en tubos Eppendorf en un equipo Savant Speed Vac system AES 1010 (GMI, Inc. Ramsey, MN, USA) provisto de un rotor RH 40-11, a vacío total (bomba de vacío de diafragma sin aceite, vacío máximo de 10 Torr), con una velocidad de secado media a lo largo de 90 min, hasta que el peso de las muestras permaneciese sin cambios.

El contenido de agua residual en las muestras liposomales obtenidas por los 3 métodos fue estimado gravimétricamente luego de calentar las muestras secas a 70° por 72 hs. Se empleó en cada caso un mínimo de 20 tubos Eppendorf, para que la pérdida de masa total fuese lo suficientemente alta como para poder ser medida apropiadamente en una balanza analítica.

4.2.4. Caracterización liposomal

Los residuos liposomales secos fueron re-hidratados a su volumen inicial con agua destilada y sometidos a las siguientes caracterizaciones estructurales.

4.2.4.1. Turbidez

La turbidez de las suspensiones liposomales antes y después del secado/rehidratación fue medida como absorbancia a 400 nm tras dilución en buffer Tris como un indicador de la lamelaridad (Rowe et al., 1982)

4.2.4.2. Tamaño

El tamaño antes y después del secado/re-hidratación fue medido por dispersión de luz dinámica (*dynamic light scattering*) con un nanoZsizer (ZER 3600, Malvern, UK)

4.2.4.3. Pérdida de contenido

La pérdida de moléculas solubles del interior liposomal tras el secado/re- hidratación fue estimada cuantificando la encapsulación de la ftalocianina soluble en agua (ZnPcMet) antes y después del proceso de secado/re-hidratación.

Los liposomas convencionales y los LUD conteniendo ZnPcMet (LUD-ZnPcMet) fueron preparados como se describió anteriormente en el Capítulo 2 sección 2.2.3, excepto que la ZnPcMet se disolvió en el buffer Tris conteniendo 20% (p/v) de sacarosa (2,8 mg ZnPcMet/g SPC) con el que se hidrató la película lipídica. La ZnPcMet no incorporada fue separada de los LUD-ZnPcMet por cromatografía de permeación en gel en una columna de Sephadex G-50 usando el método de centrifugación en minicolumna (Fry et al., 1978). Sacarosa fue agregada a cada fracción eluida para reemplazar la fracción de protector perdida en la columna.

Liposomas convencionales-ZnPcMet y LUD-ZnPcMet fueron secados al vacío como se describe en la sección 2.3.2., y luego de la re-hidratación las muestras se sometieron a cromatografía de permeación en gel para remover la ZnPcMet libre perdida de los liposomas.

Los fosfolípidos liposomales y la ZnPcMet fueron cuantificados antes y después del proceso de secado/re-hidratación, por un microensayo colorimétrico de fosfatos (Bötcher et al., 1961) y absorbancia a 702 nm (Montanari et al., 2007), respectivamente.

4.2.4.4. Ensayo de deformabilidad

Se midió el flujo de 3,5 ml de liposomas convencionales y LUD con 20% (p/v) de

sacarosa secados al vacío y re-hidratados, y también de muestras no sometidos a secado, impulsados por una presión externa de 0,8 MPa a través de dos membranas apiladas de tamaño de poro de 50 nm (extrusor Termobarrel), con el fin de evaluar la deformabilidad (Cevc, 1995). El volumen extruído fue recogido cada minuto a lo largo de 15 min.

4.2.5. Calorimetría diferencial de barrido (DSC) y microscopía electrónica de barrido

Se tomaron porciones de residuos sólidos de LUD secados por los tres métodos en 20% (p/v) de sacarosa y se colocaron sobre cintas de carbón para su análisis en un microscopio Zeiss DSM 982 Gemini equipado con un tambor de emisión de campo. Otras porciones sólidas de LUD fueron analizadas desde -50 a 80 °C a una velocidad de 3 °C/min en un equipo DSC Q 100 (TA Instruments). La primera derivada fue determinada utilizando el programa Universal Analysis 2000, de Thermal Advantage.

4.2.6. Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

Se obtuvieron los espectros de FTIR con un espectrómetro Nicolet 8700. Los espectros de reflectancia total atenuada (ATR) (64 barridos, entre 4000 y 554 cm^{-1} , con una resolución de 4 cm^{-1}) fueron obtenidos con el accesorio ATR Smart Orbit a 25 °C. Los espectros de transmitancia (64 barridos, entre 2500 y 1800 cm^{-1} , con una resolución de 2 cm^{-1}) fueron obtenidos por dos métodos distintos dependiendo de la muestra: una porción de residuos sólidos obtenida por secado al vacío o por *speed vac* fue colocada directamente en ventanas de CaF_2 , mientras que las muestras liofilizadas fueron incluidas en una pastilla de KBr por prensa al vacío.

La deconvolución se llevó a cabo con el programa Omnic y su ajuste con el programa Origin (Origin Lab Corporation, Northampton, Mass., USA). La sub-banda de agua asociada al colato de sodio, desde 2000 hasta 2400 cm^{-1} y la vibración de estiramiento de OH, desde 3600 a 3000 cm^{-1} , y las componentes del estiramiento asimétrico de C=O en 1740 cm^{-1} y 1728 cm^{-1} fueron también analizadas.

4.3. Resultados

4.3.1. Secado, rehidratación y caracterización

El aspecto de las masas blancas porosas obtenidas luego del secado por liofilización de liposomas convencionales y de LUD fue el mismo para todas las muestras. Sin embargo, luego de ser re-hidratados, los liposomas convencionales en 10% (p/v) de sacarosa no tuvieron variaciones en su distribución de tamaño medio, mientras que los LUD en 10% (p/v) de sacarosa inmediatamente se agregaron tras la adición de agua, con un muy notorio aumento de la turbidez, tamaño y polidispersión.

Esto también sucedió con LUD liofilizados en 20% (p/v) de sacarosa. No se observaron diferencias asimismo en el comportamiento de muestras congeladas a -18 °C o a -120 °C.

Por otro lado, una cantidad de diferencias entre los dos métodos de secado alternativos merecen ser destacadas. El secado al vacío produjo un secado lento (72 hs) a temperatura ambiente, en una cámara sellada con vacío proveniente de una bomba de vacío, sobre alícuotas de 50 l en tubos Eppendorf ubicados verticalmente. El *speed vac*, por su parte, produjo un secado 40 veces más rápido; las muestras fueron sometidas a un vacío continuo a 25 °C y el proceso se desarrolló bajo centrifugación en un rotor de ángulo fijo. En el presente diseño experimental, para un mismo volumen dado distribuido en tubos Eppendorf, esto último contribuyó a proveer una mayor superficie expuesta a evaporación por tubo en el *speed vac*.

Los liposomas convencionales secados por *speed vac* en 10% o 20% (p/v) de sacarosa, rindieron dispersiones liposomales translúcidas tras su re-hidratación, del mismo tamaño y lamellaridad que liposomas no secados. Sin embargo, LUD secados en las mismas condiciones, incrementaron su turbidez, tamaño y polidispersión al ser re-hidratados. Finalmente, liposomas convencionales secados por secado al vacío en 10 o 20% (p/v) de sacarosa también fueron re-hidratados exitosamente, como se observó por las mediciones de tamaño y turbidez. Por otro lado, LUD secados por secado al vacío en 10% (p/v) de sacarosa incrementaron su turbidez, tamaño y polidispersión al ser re-hidratados, salvo los LUD en 20% (p/v) de sacarosa, cuyo perfil de secado por los 3 métodos se muestra en la figura 4.1. Todas las muestras secadas al vacío mostraron un aspecto duro y translúcido.

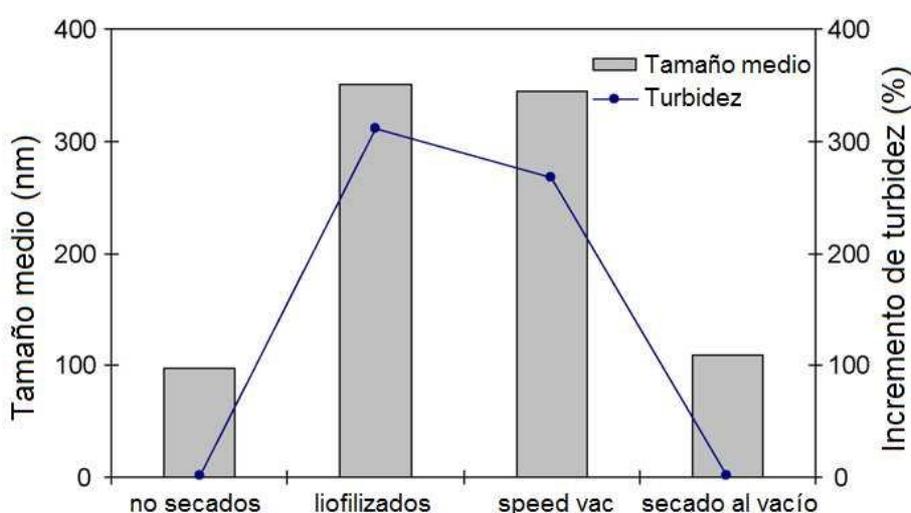


Figura 4.1: Tamaño promedio y turbidez luego de la rehidratación de LUD secados en 20 % (p/v) de sacarosa por los 3 métodos

Las mediciones de contenido residual de agua evidenciaron que el liofilizado fue el método más eficiente para la remoción de agua (99,39%), rindiendo muestras de 0,05 gagua/gpeso seco. El secado al vacío y por *speed vac* eliminaron hasta un 96,22 y un 94,27% de agua, rindiendo 0,14 y 0,22 gagua residual/gpeso seco, respectivamente. En todos los casos los resultados presentados corresponden a un promedio de diez lotes de preparaciones.

4.3.2. Pérdida de contenido

Aunque los LUD secados al vacío en 20% (p/v) de sacarosa pudieron ser re-hidratados conservando el tamaño de los LUD antes del secado, la pérdida de contenido acuoso liposomal ha sido reportada incluso en casos de ausencia de agregación de vesículas o de fusión en presencia de azúcares (Cacela e Hinch, 2006). Por ello, la pérdida de ZnPcMet fue determinada en este sistema. Los resultados mostraron que un 85% de la ZnPcMet fue retenida dentro de los LUD luego del secado al vacío y la re-hidratación. Por otro lado, tras la re-hidratación de liposomas convencionales secados en 10% (p/v) de sacarosa por los tres métodos, no se detectó pérdida significativa (<10%).

4.3.3. Ensayo de deformabilidad

LUD secados al vacío en 20% (p/v) de sacarosa y re-hidratados sin agregación ni pérdidas significativas de su contenido, y con conservación de tamaño, fueron sometidos al ensayo de deformabilidad. El pasaje liposomal a través de una membrana de 50 nm de poro bajo una presión externa de 0,8 MPa se muestra en la figura 4.2

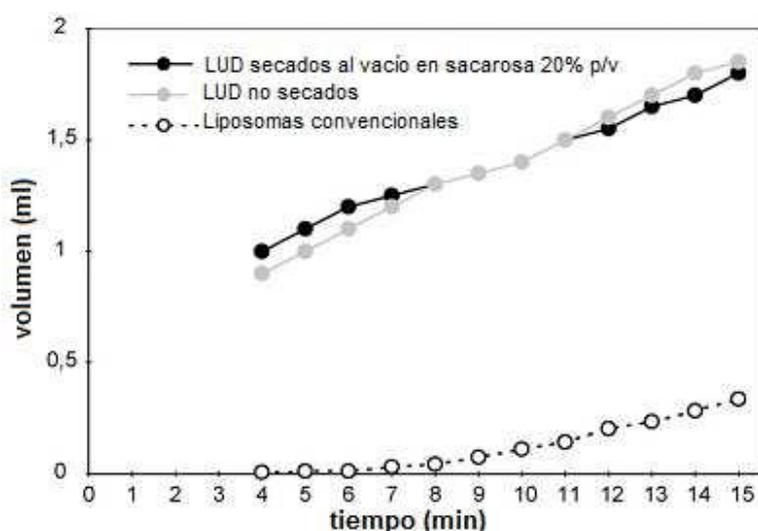


Figura 4.2: Perfil del pasaje de liposomas (volumen) a través de un filtro de 50 nm de poro vs. tiempo.

Los perfiles obtenidos para LUD secados al vacío y re-hidratados y LUD no secados fueron similares, con la mayoría del flujo de la muestra ocurriendo durante los primeros 15 min; mientras que no se registró flujo para los liposomas convencionales durante los primeros 10 min.

Estos resultados confirmaron que el colato de sodio y las moléculas de agua asociadas permanecieron en la membrana luego del secado al vacío en 20% (p/v) de sacarosa y su posterior rehidratación.

4.3.4. Microscopía electrónica de barrido y mediciones calorimétricas

Cómo se observa en la figura 4.3, la morfología de la matriz de sacarosa de LUD secados en 20% (p/v) de sacarosa fue diferente de acuerdo al método de secado empleado. Luego de liofilizar LUD, no fue posible detectar ninguna estructura vesicular intacta, y el campo mostró trozos de 1 m x 0,5 m de sacarosa amorfa (figura 4.3.a). Esas estructura no se observaron cuando los LUD fueron secados por *speed vac* en 20% (p/v) (figura 4.3.b), pero algunas estructuras vesiculares de cerca de 100 nm de diámetro (probablemente LUD) pudieron ser observadas (figura 4.3.bi). Finalmente, cuando los LUD fueron secados al vacío en 20% (p/v) de sacarosa, el campo se vio dominado por un número alto de estructuras vesiculares, similares a las observadas en las muestras de *speed vac*, ambas asomando o superponiéndose con la matriz de sacarosa circundante (figura 4.3.c)

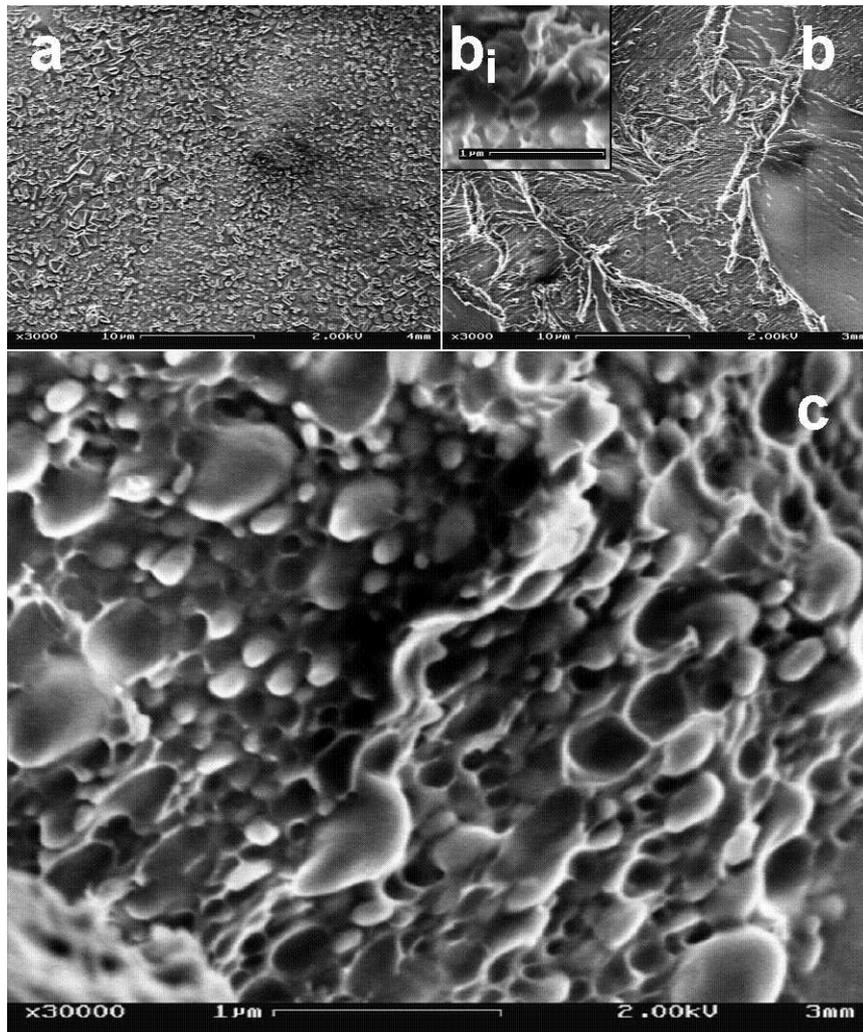


Figura 4.3: Microscopía electrónica de barrido de LUD en sacarosa 20% (p/v) (a) liofilizado, (b) secado por speed-vac, o (c) secado al vacío.

Los perfiles termotrópicos de LUD secados en 20% (p/v) de sacarosa y su primera derivada (capaz de mejorar la percepción de transiciones débilmente manifestadas en presencias de hidratación residual) (Sircar and Chartoff, 1994; Makar et al., 2007; Chartoff, 2008), fueron similares para los tres métodos de secado, como se muestra en la figura 4.4

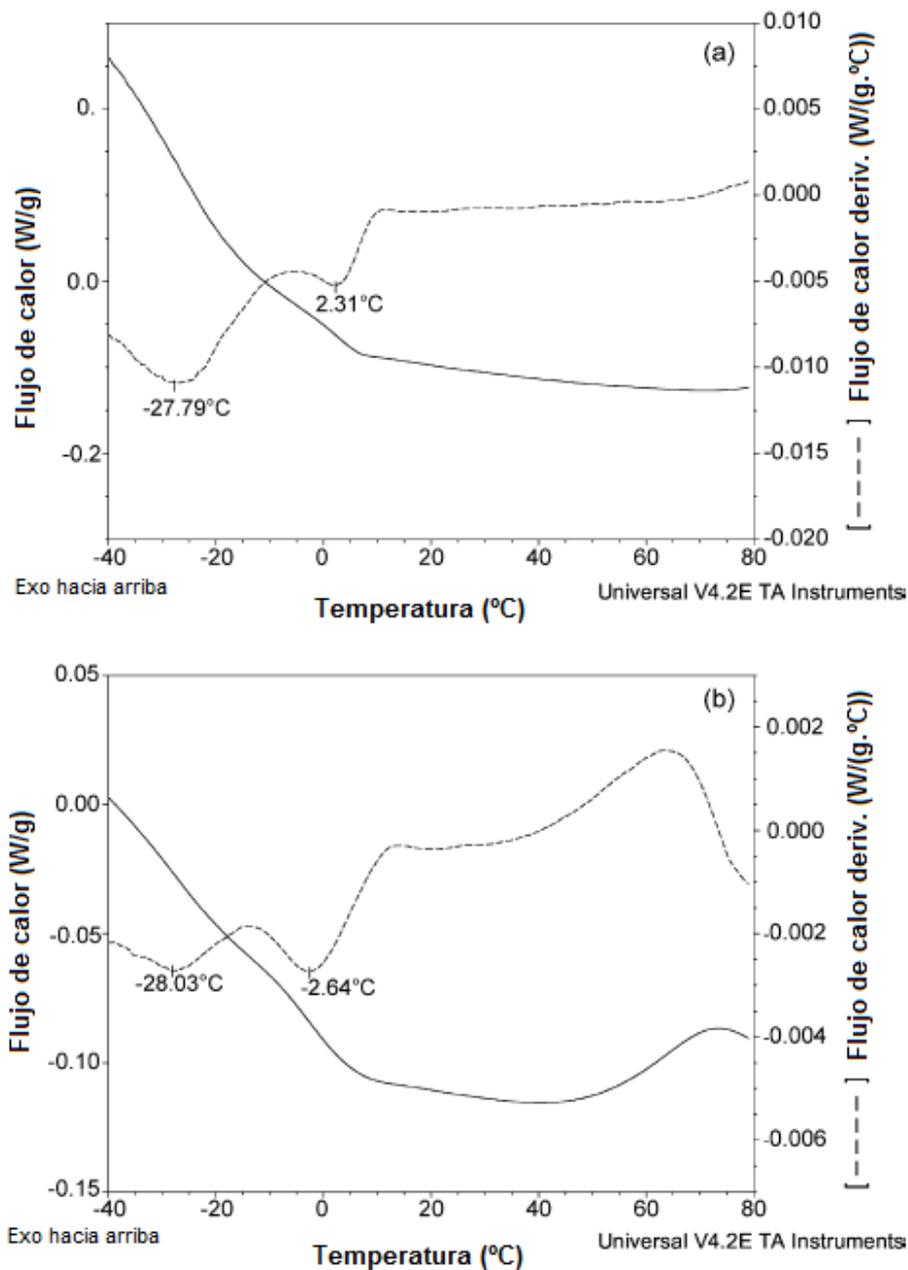


Figura 4.4 Calorimetría diferencial de barrido (línea continua) y primera derivada (línea punteada) de LUD: (a) liofilizados y (b) secados al vacío en 20% (p/v) de sacarosa.

Independientemente del método de secado, dos transiciones, una cerca de los -28 °C y la otra en $2,5\text{ °C}$, fueron detectadas tras la liofilización y el secado al vacío (figura 4.4 a y b, respectivamente). El mismo perfil registrado para secado al vacío se obtuvo para la muestra secada por *speed vac*. La primera transición podría probablemente asociarse con la temperatura de transición de fase (T_m) de los LUD, previamente reportada a $-22,81\text{ °C}$ en medio completamente hidratado en ausencia de azúcares (Montanari et al., 2007), y la

segunda transición con la fusión de agua residual. Estos hallazgos revelan que las matrices de azúcares podrían interactuar eficientemente con los grupos en las cabezas de los fosfolípidos para evitar la transición al estado de gel a lo largo del proceso de secado, pero también que el secado fue incompleto en todos los casos. Finalmente, los LUD secados al vacío y por *speed vac* mostraron un pico exotérmico alrededor de 60-80 °C, el cual podría resultar de la sacarosa recristalizada.

4.3.5 Estudio por Espectroscopía infrarroja con Transformada de Fourier (FTIR)

En primer lugar los espectros de FTIR permitieron escrutar la presencia de agua asociada al colato de sodio (CoINa) luego de cada proceso de secado. La banda de asociación de agua que aparece en la región de 2000-2400 cm^{-1} es asignada a una combinación de los modos de torsión de las moléculas de agua y sus modos vibracionales intermoleculares (Eisenberg, 1969), que bajo condiciones de muy bajo contenido de agua (Giuffrida et al., 2006) puede también involucrar grupos formadores de puentes de hidrógeno como los que se encuentran en la matriz agua-sacárido circundante. Los liposomas que contenían CoINa, pero no los preparados sin él, presentaron una pequeña sub-banda en 2025 cm^{-1} . Esta banda es debida a la presencia de moléculas de agua, dado que al igual que ocurre con la banda principal de asociación del agua, está ausente en muestras secas de fosfatidilcolina y/o ácido cólico (Chiantia et al., 2005). La evolución térmica de la sub-banda de agua está estrechamente acoplada a aquella en la frecuencia del CH₂ revelando una fuerte asociación entre el CoINa hidratado y las bicapas lipídicas. Esta sub-banda está ausente cuando el CoINa no está insertado dentro de la matriz lipídica, tal como ocurre cuando el CoINa es adicionado desde el exterior a bicapas puras de fosfatidilcolina de soja (Chiantia et al., 2005). Como puede apreciarse en las figura 4.5, los espectros de transmisión de FTIR de los LUD secados al vacío en 0, 10 y 20% (p/v) de sacarosa y ajustados a componentes gaussianos, revelaron la sub-banda de agua en 2025 cm^{-1} . Estos componentes también estuvieron presentes tanto en LUD secados por *speed vac* en 20% (p/v) de sacarosa como en los liofilizados (datos no presentados).

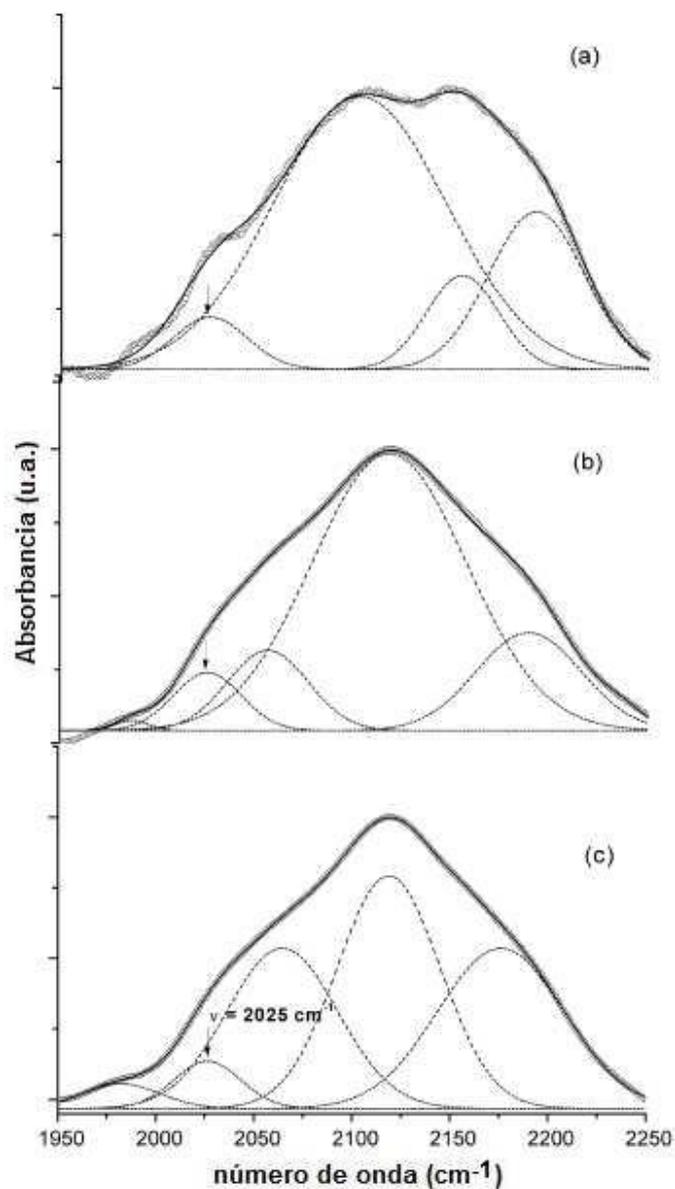


Figura 4.5: Espectro de FTIR de LUD secados al vacío (a) sin sacarosa, (b) en 10% (p/v) de sacarosa y (c) en 20% (p/v) de sacarosa (luego de sustracción y normalizado), donde la sub-banda de asociación de agua en 2025 cm^{-1} está indicada con las flechas. Los círculos abiertos representan los datos experimentales, la línea continua el ajuste general y las líneas punteadas representan el ajuste en términos de las componentes gaussianas de la banda de asociación de agua. Todos los ajustes fueron realizados con un $r^2 > 0.99$.

Tanto en liposomas convencionales como en liposomas convencionales con ColNa agregado externamente y secados al vacío en 20% (p/v) de sacarosa, la sub-banda de agua estuvo ausente (figura 4.6)

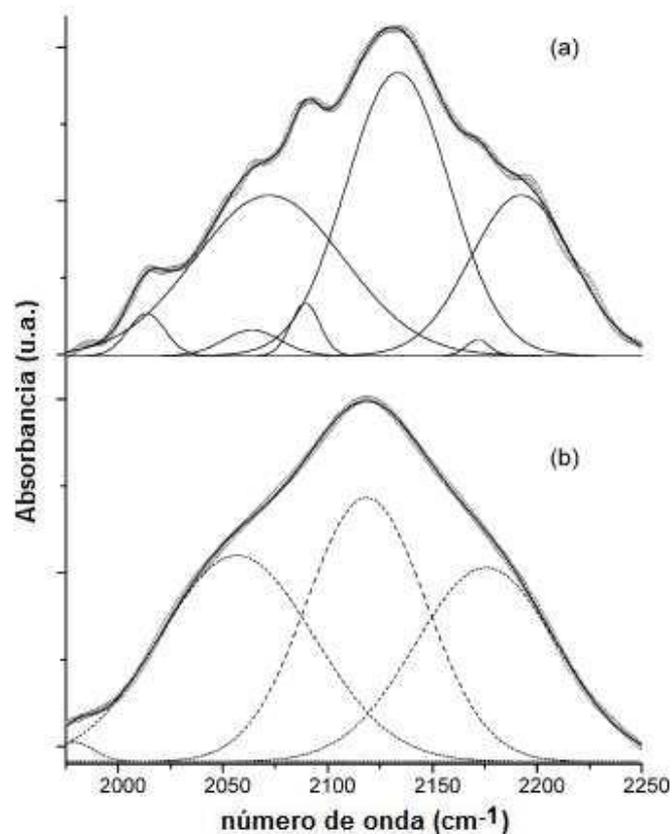


Figura 4.6: Espectros de FTIR de liposomas convencionales en 20% (p/v) de sacarosa (a) secada por speed-vac y (b) secada al vacío con ColNa agregado al medio de suspensión. La sub-banda de asociación de agua en 2025 cm⁻¹ está ausente. Los círculos abiertos representan los datos experimentales, la línea continua el ajuste general y las líneas punteadas representan el ajuste en términos de las componentes gaussianas de la banda de asociación de agua. Todos los ajustes fueron realizados con un $r^2 > 0.99$

La presencia de casi un 27% molar de ColNa dentro de la bicapa lipídica es la diferencia principal entre los liposomas convencionales y los LUD. Las moléculas de agua se asocian al ColNa que está inserto dentro de la estructura lipídica, en la zona localizada en la frontera entre las regiones hidrofílicas e hidrofóbicas de los fosfolípidos. Esas moléculas de agua actúan como lubricante en el contacto entre las cabezas polares lipídicas y pueden ser responsables por la flexibilidad, hidrofiliicidad (Schubert et al., 1986; Barry, 2001) y también por la locomoción espontánea de LUD a través de gradientes de agua bajo condiciones de poca presencia de agua (Cevc, 1995a; Chiantia et al., 2005). El hecho que los LUD secados al vacío en 20% (p/v) de sacarosa puedan ser reconstituidos sin pérdida de la ultradeformabilidad, indicó que el estrés del secado no incrementó la inestabilidad de la bicapa causada por el ColNa y al mismo tiempo que el ColNa hidratado permaneció asociado a la matriz lipídica tras la situación de estrés de la deshidratación. Esto último no fue inesperado, dado que los LUD reconstituidos exitosamente luego del secado al vacío mantuvieron su ultradeformabilidad (la cual depende exclusivamente de la presencia del

CoINa hidratado dentro de la matriz).

En segundo lugar, los espectros también permitieron estimar el grado de deshidratación de la matriz de azúcar (gomosa o vítrea) luego del secado al vacío. Los LUD y los liposomas convencionales secados al vacío en 20% (p/v) de sacarosa, presentaron el mismo pico correspondiente al estiramiento de OH de la matriz de azúcar en 3288 cm^{-1} (figura 4.7)

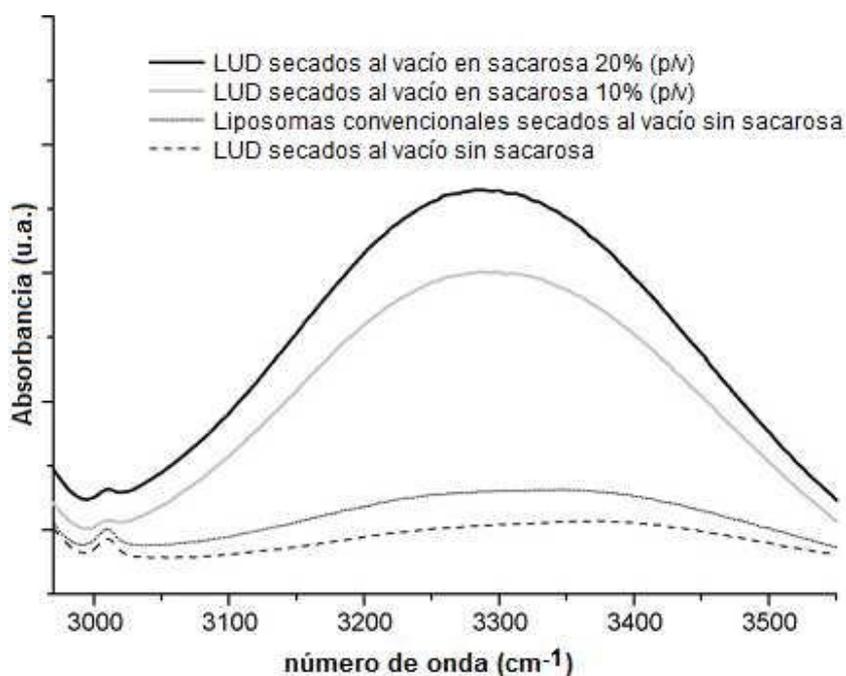


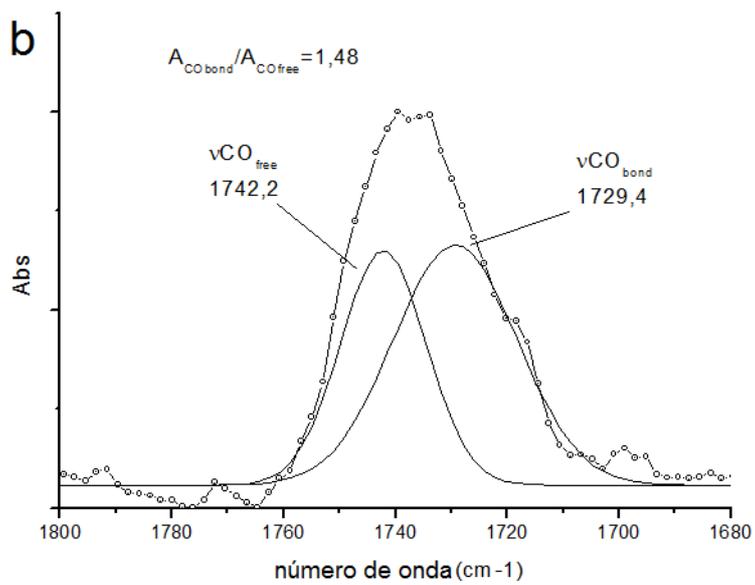
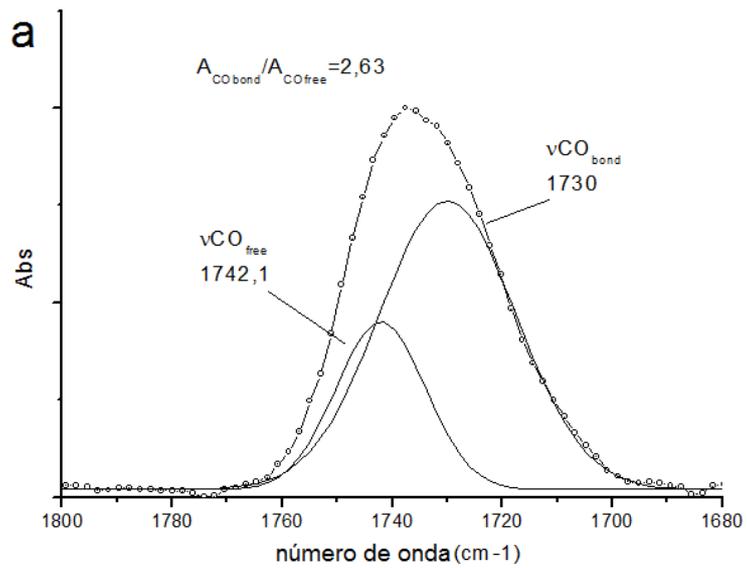
Figura 4.7: Espectros de FTIR de LUD secados al vacío sin sacarosa o con sacarosa al 10 y 20% (p/v); se muestra la región del estiramiento vibracional de OH

Debe notarse que la amplia banda de estiramiento de OH de las dos muestras de LUD secadas al vacío en proporciones altas de azúcar (proporciones en masa de 4/1 y 2/1 sacarosa/lípido, correspondientes a 20 y 10% p/v de sacarosa) podrían adjudicarse a puentes de hidrógeno entre los azúcares de la matriz, que enmascaran las interacciones azúcar-lípido (Buitink et al., 2000). Dado que el pico de la sacarosa amorfa está reportado en 3370 cm^{-1} (Sun et al., 1996), el desplazamiento a menores números de onda reveló la existencia de las interacciones de puente de hidrógeno entre azúcar y agua, y por ende una deshidratación incompleta y probablemente un estado gomoso de la matriz.

En tercer término, se analizó la señal del esqueleto interfacial de los fosfolípidos, medida como la banda vibracional de los carbonilos. Dada su exposición espacial en el esqueleto fosfolipídico, los CO pueden entablar fácilmente puentes de hidrógeno con moléculas de

agua; impedidas de acceder por su tamaño en cambio, la formación de puentes de hidrógeno con hidroxilos de azúcares se hace más dificultosa. Por ello la banda principal en 1739 cm^{-1} es muy sensible al agua, cuya presencia induce ensanchamiento y corrimiento a menores, en tanto la interacción con azúcares en lípidos secos, no la modifica (Popova e Hinch, 2003; Wong y Mantsch, 1988; Grdadolnik y Hadzi, 1998). Por medio de un ajuste a curvas gaussianas o lorentzianas según el caso, es posible descomponer esta banda en dos contribuciones: los CO unidos por puentes de hidrógeno (CO_{bond}) en 1728 cm^{-1} y CO libres de puentes de hidrógeno (CO_{free}) en $1740\text{-}1742\text{ cm}^{-1}$, cuya relación de áreas es proporcional a la cantidad de cada conformero (Blume et al., 1988; Arrondo y Goñi, 1998). En tanto que en vesículas de fosfatidilcolina secadas a 0% de humedad relativa (HR) en ausencia de azúcares, la relación $\text{CO}_{\text{bond}}/\text{CO}_{\text{free}}$ es de 0,9, en vesículas secadas a 0% HR en presencia de azúcares es posible detectar la interacción por puente de hidrógeno con OH de azúcares porque se incrementa el componente CO_{bond} , responsable de la subida de dicha relación hasta un máximo de 1,7. Este máximo corresponde a una relación de masas 1:1 azúcar: lípido; a partir de allí, se mantiene constante independientemente del aumento en la proporción de azúcar (Cacela e Hinch, 2006). Como los secados realizados en este ensayo fueron en presencia de gran cantidad de azúcar (4/1 masa/masa azúcar/lípido), todo incremento en la contribución CO_{bond} por encima de 1,7 puede adjudicarse al agua que no ha sido retirada en el proceso de secado. Por otro lado, el estado vítreo limita las interacciones e impide una penetración adecuada de los azúcares en las membranas, y su ausencia es responsable de la mayor contribución de puente de hidrógeno cuando se está a una temperatura por encima de la temperatura de transición vítrea (Wolfe y Bryant, 1999).

Los resultados obtenidos, mostraron que en todos los casos la relación de áreas $\text{CO}_{\text{bond}}/\text{CO}_{\text{free}}$ fue muy elevada (figura 4.8) (llegando a 2,63 en el caso a); nuevamente esto indicaría el límite de la eficiencia del proceso de secado: dada la elevada contribución del CO_{bond} , habría una cantidad apreciable de agua retenida en el sistema (de otro modo la relación debería haber sido más cercana a 0,9), dando otro indicio de un secado incompleto, así como una probable ausencia de estado vítreo. Resultados similares se obtuvieron para muestras secadas por *speed vac*.



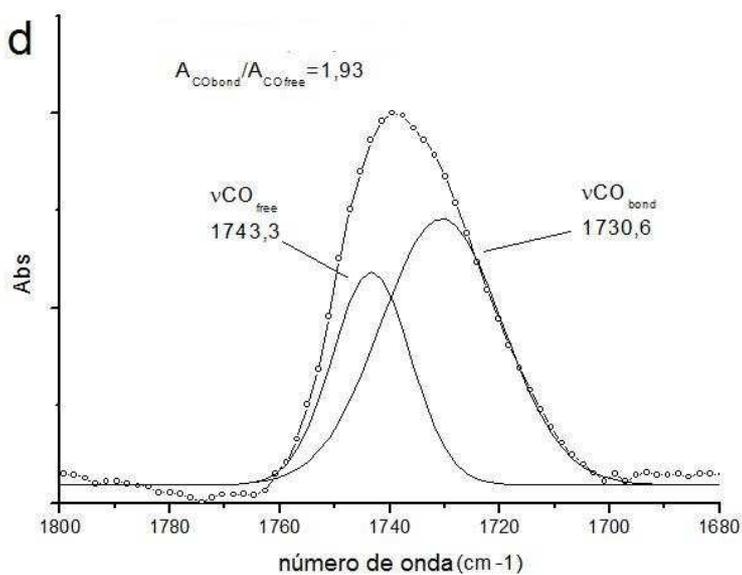
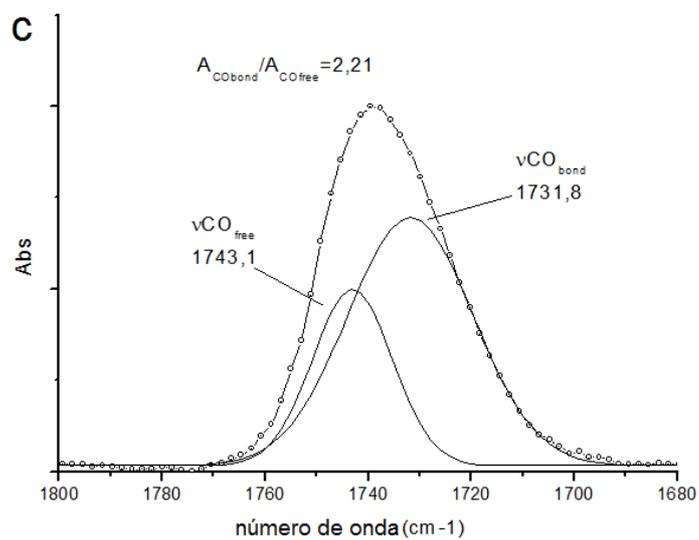


Figura 4.8. a) liposomas convencionales sin azúcar secados al vacío $R=2,63$; b) liposomas convencionales con 20 % (p/v) de sacarosa más agregado externo de Col Na secados al vacío: $R=1,48$; c) LUD sin azúcar secados al vacío: $R=2,2$; d) LUD con 20 % (p/v) de sacarosa secados al vacío: $R=1,93$.

Finalmente, los picos correspondientes al agua residual remanente tras la deshidratación tanto para LUD como para liposomas convencionales secados al vacío en ausencia de azúcar fueron observados en 3345 cm^{-1} .

4.4. Discusión

En este trabajo, la técnica convencional de liofilizado y dos técnicas alternativas desecado –*speed vac* y secado al vacío- donde se evita la formación de hielo, fueron utilizadas para secar suspensiones acuosas conteniendo azúcar de liposomas ultradeformables y convencionales. Se encontró que los liposomas convencionales liofilizados en 10% (p/v) de sacarosa pudieron ser re-hidratados exitosamente, pero las muestras de LUD liofilizadas no, incluso en condiciones de 20% (p/v) de sacarosa. Los liposomas convencionales pudieron también ser re-hidratados exitosamente luego de su secado en 10% (p/v) de sacarosa por ambas técnicas alternativas, mientras que no se logró lo mismo para LUD cuando el secado al 20% (p/v) de sacarosa se realizó por *speed vac* ni cuando se realizó por secado al vacío en 10% (p/v) de sacarosa. La reconstitución exitosa de LUD solamente pudo lograrse luego de secarlos al vacío en 20% (p/v) de sacarosa. Esos hechos mostraron que cuando son secados y re-hidratados, los LUD se comportaron de una manera radicalmente diferente a la de los liposomas convencionales, siendo dicha conducta fuertemente dependiente del método de secado y de la proporción azúcar/lípido empleada.

Es posible señalar que la liofilización produjo la formación de hielo extravesicular responsable por el daño mecánico y/u osmótico sobre la estructura cuasi-inestable de los LUD (Siow et al., 2007; y sus referencias), o alternativamente que el liofilizado produjo un estrés de secado excesivo. Sin embargo, si esas fuesen las únicas razones para la falla en las reconstituciones, los dos métodos alternativos que evitan la formación de hielo y proveen una deshidratación menos intensa deberían haber sido exitosos. Diversos fenómenos que ocurren durante el proceso de secado deberían explicar la falla del método de *speed vac*.

Cuando las muestras que contienen azúcar son deshidratadas hasta menos de 0,2 g de agua residual por gramo de peso seco, se forma una matriz vítrea (Williams y Leopold, 1989). Los liposomas convencionales se protegen normalmente contra la deshidratación y durante su almacenamiento, cuando la temperatura de la transición vítrea (T_g) de la matriz de azúcar –inversamente proporcional a su contenido agua- está por encima de la temperatura ambiente. De este modo, las matrices vítreas altamente viscosas impiden la fusión de las vesículas y elevan la T_m de las bicapas cuando se someten a fuerzas de deshidratación, eliminando el incremento transiente de la permeabilidad (Crowe et al., 1984; Crowe et al., 1989). Incluso bajo condiciones de alto

contenido de sacarosa, los LUD son sensitivos a la liofilización, la cual paradójicamente es el único método de deshidratación capaz de producir matrices vítreas. Los vidrios de sacarosa anteriormente se creían suficiente protección para los liposomas, pero se encontró que no lograron proteger a los LUD sometidos a la liofilización. En este trabajo se ha encontrado que ni el secado al vacío ni el secado por *speed vac* produjeron estados vítreos a temperatura ambiente, dado que las matrices vítreas con su T_g por encima de 0°C solamente se producen al alcanzarse el rango de 0,02-0,05 g de agua residual por gramo de peso seco (Sun et al., 1996).

Cuando fueron sometidas a fuerzas centrífugas, las matrices gomosas obtenidas por *speed vac* fueron incapaces de impedir la agregación/fusión de LUD. Al emplearse el secado al vacío, un método en el cual el estrés de centrifugación está ausente, sólo la matriz gomosa más viscosa (20% p/v, asumiendo una pérdida de agua por gramo seco equivalente) pudo impedir la agregación/fusión de LUD. El módulo elástico más alto de los liposomas convencionales fue quizás la causa de su comportamiento menos sensitivo a la viscosidad de las matrices gomosas.

En suma, las gomas producidas por el secado al vacío resultaron apropiadas para estabilizar tanto a liposomas convencionales como a ultradeformables tras su deshidratación, pero con el costo de una sensibilidad mayor al estrés mecánico de los LUD y probablemente un período menor de preservación en buenas condiciones para ambos tipos de vesículas. En este trabajo se realizó un seguimiento de las reconstituciones exitosas de LUD hasta un período de 15 días almacenados a 4°C manteniendo sus características intactas, pero el dilema presentado acerca de la conservación de LUD en matrices gomosas deberá ser encarado en mayor profundidad en nuevas investigaciones.

CAPÍTULO 5

PENETRACIÓN CUTÁNEA DE LIPOSOMAS ULTRADEFORMABLES

Parte del presente capítulo ha sido enviada para su publicación al Journal of Controlled Release. En los experimentos aquí conducidos han participado como colaboradores el Lic. Leandro A. Lado y el Est. Leonardo Rivadeneyra.

5.1. Introducción

La vía tópica presenta una dificultad principal cuando se desea acceder a blancos ubicados en capas profundas de la piel o cuando se pretende una liberación sistémica: el estrato córneo -compuesto por una veintena de capas de células muertas muy compactadas- constituye una barrera superficial prácticamente impermeable que aísla el interior del cuerpo del medio externo. La gran mayoría de los productos cosméticos no consiguen atravesar esta barrera, y por lo tanto actúan solamente como depósitos externos para liberación sostenida del PA. Los liposomas ultradeformables, en cambio, tienen la capacidad de alterar su forma para atravesar los nanocanales del estrato córneo –cuya abertura es mucho menor que el diámetro de aquéllos- sin sufrir pérdidas estructurales cuando son impulsados por el gradiente de humedad existente a través de la piel (Barry, 2001; Cevc y Blume, 2003; Verma et al., 2003), el cual genera una fuerza motriz suficiente para que se produzca la penetración hacia las capas más hidratadas de la piel (Rama Krishna y Marsh, 1990; Seddon et al., 1990).

La forma de evaluar la penetración *in vitro* de un nanoSED es a través del Método de Penetración de Saarbrücken (MPS) (Wagner et al., 2000; Jacobi et al., 2005), en el cual la suspensión que contiene al nanoSED se incuba sobre una porción de piel entera. Dicha porción de piel (estrato córneo, epidermis y dermis) funciona por sí misma como compartimiento receptor de la formulación a ensayar, por lo tanto la formulación debe ser recuperada o cuantificada desde el interior del explanto al finalizar el ensayo.

Por otro lado, los estudios en *celdas de difusión de Franz* (CDF) permiten evaluar la permeación, es decir, se centran en la detección del PA que atravesó completamente la barrera evaluada que puede ser SC, SC y epidermis o piel entera o una membrana artificial, en un compartimiento receptor ubicado por debajo de éste (Essa et al., 2002; Mishra et al., 2006).

Cuando resulta crucial dilucidar el modo en que LUD logran franquear la barrera impermeable del SC, el método de CDF deja interrogantes irresueltos dado que trata al espesor de la piel como un modelo de “caja negra” aunque pueda cuantificarse con una extracción posterior el PA que quedó retenido (El Maghraby et al., 2000). Si bien pueden acotarse previamente las capas de la piel sobre las que se trabajará por medio de

procesos de separación por calor que permiten aislar dermis de estrato córneo y epidermis (Kligman y Christophers, 1963), e incluso procesos con digestiones enzimáticas que permiten aislar el SC aunque con gran dificultad experimental (Henning et al., 2008), el tortuoso camino a través de los nanocanales del SC nunca es revelado. En cambio, por medio del MPS seguido de la recuperación o cuantificación de los componentes del nanoSED y/o el PA incorporado, se puede estudiar en detalle la penetración, evaluando su distribución en función de la profundidad de la piel. Por otra parte, con el uso de la CDF la piel sufre una hidratación no fisiológica y excesiva, ya que el receptáculo aceptor se llena con líquidos en los que el PA es soluble, y esos cambios en el grado de hidratación por el lado inferior del explanto pueden provocar cambios en la penetración de diversos PA, así como un reflujo del mismo por penetración basolateral desde el compartimiento aceptor. En el MPS la hidratación de la piel es fisiológica, por lo que su pH solamente se ve influenciado por la suspensión que se agregue. Finalmente, la remoción sucesiva de las capas del SC (*tape-stripping*) o el procesamiento por criosección tras la incubación permiten determinar el perfil de penetración con respecto a la profundidad del tejido.

En particular, para que se produzca la locomoción de LUD hacia dentro de la piel es necesaria la formación y manutención del gradiente de humedad mediante una aplicación no oclusiva (Cevc y Gebauer, 2003), de modo tal que se permita la evaporación de los componentes líquidos del excipiente sobre la superficie expuesta al medio externo (aire), mientras que la parte interior permanece humedecida. De este modo, estudios comparativos en condiciones oclusivas y no oclusivas, revelaron una mayor penetración para estas últimas (Van Kuijk-Meuwissen et al., 1998), además se comprobó la estabilidad de LUD durante la deshidratación que supone este tipo de aplicación, verificándose la manutención de su estructura a medida que se evapora el líquido de la suspensión (Honeywell-Nguyen et al., 2002) durante el restablecimiento del gradiente natural de la piel. En el MPS convencional, sin embargo, suelen evaluarse aplicaciones oclusivas (Wagner et al., 2004), colocándose un tapón sellado sobre el explanto cutáneo.

Otro interrogante en torno a la liberación tópica de sustancias en nanoSED es sobre la integridad del nanoSED y su retención del PA durante el proceso. Se han reportado además efectos reforzadores de la penetración del PA cuando éste es administrado en su forma libre acompañado por la presencia de micro-nanopartículas vacías en la misma suspensión (Luengo J. et al., 2006).

El estudio del perfil de penetración de un nanoSED a través del SC deviene entonces fundamental para evaluar su potencial utilidad como sistema de *delivery* tópico, así como para conocer en detalle su interacción con el SC. El empleo de piel humana obtenida como material de descarte de intervenciones estéticas permite remedar *in vitro* las condiciones de barrera impermeable que son funcionales *in vivo* con una alta correlación (Honeywell-Nguyen et al., 2002), a diferencia de los ensayos realizados sobre pieles

animales o artificiales, cuyas mayores permeabilidades terminan produciendo sobreestimaciones en las interpretaciones de los resultados (Henning et al., 2009). En el presente capítulo, se describirá el estudio de la penetración de LUD utilizando MPS sobre explantos de piel humana, por cuantificación de la fluorescencia de sondas incorporadas a LUD y por microscopía confocal de fluorescencia.

Por otra parte, los Quantum Dots (QD) son nanocristales semiconductores con tamaños entre los 2 y los 100 nm que han captado recientemente la atención debido a que sus propiedades eléctricas y ópticas distintivas (Bruchez et al. 1998; Dabbousi et al. 1997) les confieren características fluorescentes únicas: alta intensidad y estabilidad, y emisión en el espectro visible de mayor penetrancia, lo que los convierten en fluoróforos óptimos para aplicaciones diagnósticas (Alivisatos 2004; Chan et al. 2002; Zhang y Monteiro-Riviere, 2008).

Los QD están formados por una estructura de "core/shell" (centro y cubierta) en la que el centro que determina el color de emisión, está compuesto por una variedad de metales complejos como semiconductores, metales nobles, y metales de transición, como p.ej. CdSe, CdTe, InAs, o InP. A su vez, la cubierta que confiere brillo y estabilidad, está compuesta de otra combinación de metales donde el semiconductor posee una separación de bandas mayor a la del presente en el centro, como p. ej. ZnS. Una de las propiedades únicas de QD es que poseen una ancha banda de excitación y el máximo de emisión depende del tamaño del centro. Por fuera de esta estructura de *core/shell*, un revestimiento externo los hace hidrofílicos para permitirles formar suspensiones estables, protege el escape de metales del centro, y a su vez puede conferirles una bioactividad específica (Hardman, 2006).

La toxicidad de QD depende su estructura química y de sus reacciones en el medio, p.ej. si fue oxidado, hidrolizado, etc. (Hardman, 2006). La composición y tamaño del centro, el tipo de recubrimiento (Ryman-Rasmussen et al., 2007), así como su concentración y estabilidad mecánica, fotolítica y oxidativa o el tipo celular, son factores implicados en la citotoxicidad, los que aún no están estandarizados (Jain et al., 2009). Es importante remarcar que los metales que forman los centros son frecuentemente tóxicos, carcinógenos y bio-acumulables con vidas medias biológicas de 15 a 20 años (Hardman, 2006). Aunque los mecanismos citotóxicos aún no se han definido por completo, se han propuesto como causas la generación de estrés oxidativo (Lovric et al., 2005) o el escape de metales del centro al medio de cultivo (Derfus et al., 2004). Asimismo se ha propuesto que los QD tendrían un alto potencial inflamatorio (Oberdorster et al, 2005). En particular, para QD de CdSe/ZnS, emisión a 655 nm, recubiertos con PEG se reportó un leve efecto citotóxico tras 48 hs de incubación en cultivos epidérmicos (Ryman-Rasmussen et al., 2007). Su potencial ingreso por la vía tópica ha aparecido entonces como sujeto de investigación en términos de riesgos de contaminación y toxicidad. La penetración de QD a

través de la piel intacta dependería de las condiciones del experimento y del tipo de QD utilizado, dados los diferentes resultados de los trabajos disponibles hasta el momento (Ryman-Rasmussen et al, 2006; Oberdorster et al., 2005; Tinkle et al., 2003; Zhang y Monteiro-Riviere, 2008) en los que se ha reportado tanto la penetración de los mismos en el SC, como por el contrario la incapacidad de superar dicha barrera.

Asimismo, se ha reportado la incorporación de QD a formulaciones liposomales (Chen et al., 2006; Feng et al., 2005). El MPS combinado con técnicas de microscopía confocal de fluorescencia permitirá evaluar la capacidad de penetración de QD de CdSe/ZnS en explantos de piel cuando se encuentran incorporados a LUD.

En este capítulo se estandarizó el MPS para estudiar la profundidad de penetración de LUD. Dos tipos de fluoróforos fueron incorporados en LUD: moleculares (convencionales, doble marca rodamina-PE y HPTS) y particulados (QD, monomarca). En el primer caso, la co-localización de la doble marca permitió mostrar el mantenimiento de la estructura liposomal a medida que ocurre la penetración. En el segundo caso, los QD con un radio hidrodinámico en el orden de los decenas de nm incorporados en LUD, mostraron cuál fue el límite físico a la profundidad de la penetración.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1 Materiales

La fosfatidilcolina de soja (SPC) (Phospholipon 90 G, pureza 92-98%) se obtuvo como donación de Phospholipid/Natterman, Alemania. El colato de sodio, Sephadex G50 y la 1,2-Dimyristoyl-*sn*-glycero-3-phosphoethanolamine-N-(Lissamine™ rhodamine B sulfonyl) (Rodamina-PE) fueron comprados a Sigma. El fluoróforo 8-hidroxipireno-1,3,6-ácido trisulfónico (HPTS) fue comprado a Molecular Probes. Los “Q tracker non-targeted Quantum Dots 655”, de estructura *core/shell* de CdSe/ZnS recubiertos con PEG, de Exc. máx. 405 nm, Em. Máx 650 nm (Quantum Dots o QD) fueron comprados a Invitrogen (Hayward, CA). La cinta adhesiva utilizada fue “Scotch 3M”. El “OCT Cryocompound” fue comprado a Leica Microsystems, Alemania. Los explantos de piel humana fueron donaciones provenientes de descartes de cirugías de reducción abdominal. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico y se adquirieron en Anedra.

5.2.2. Preparación liposomal

LUD conteniendo HPTS se prepararon como se describió en Capítulo 2, sección 2.2.6., sin el agregado del apagador de fluorescencia DPX.

Del mismo modo, se prepararon como control liposomas convencionales, sin presencia de ColNa en su formulación. Para el armado de los liposomas con doble marca de HPTS y Rodamina-PE (LUD-HPTS/Ro-PE), se incluyó en la mezcla de lípidos Rodamina-

PE en una proporción molar 1: 1000 (Rodamina-PE:SPC), siguiendo luego los pasos de preparación hasta separar las sondas no incorporadas por minicolumna de exclusión molecular.

Se prepararon LUD conteniendo Quantum Dots (LUD-QD) por un procedimiento similar al descrito anteriormente para la preparación de LUD-HPTS, reemplazando la solución de HPTS por una solución 0,01 nmol QD/ml en buffer Tris.

5.2.3. Caracterización de LUD-QD y QD

5.2.3.1 Tamaño

El tamaño promedio de partícula y su índice de polidispersión fueron determinados por dispersión de luz dinámica (*dynamic light scattering*) con un Nanozetasizer (Malvern).

5.2.3.2 Microscopias de transmisión electrónica

Se obtuvieron imágenes de LUD-QD y QD por microscopía electrónica de transmisión con un equipo TEM Philips 301, con y sin tinción con acetato de uranilo.

5.2.4. Preparación de la piel

La piel fresca recientemente escindida del abdomen del donante fue mantenida en una bolsa cubierta por hielo dentro de un recipiente hermético para su traslado desde el quirófano al laboratorio. En todos los casos la piel provino de individuos sanos del sexo femenino, de entre 35 y 45 años de edad, de tez caucásica, y fue obtenida durante los meses de primavera austral (setiembre-noviembre). En el laboratorio, la piel se clavó con grampas ubicadas cerca de sus bordes sobre una plancha de telgopor envuelta en papel de aluminio, con el estrato córneo apoyado sobre el mismo. Con la ayuda de tijeras y escalpelo se separó todo el tejido adiposo sobrante hasta obtenerse limpio el conjunto de estrato córneo, epidermis y dermis (Figura 5.1). La piel fue lavada con PBS, y luego fue cortada en trozos cuya medida no superase los 10 cm de lado, los cuales se envolvieron en papel de aluminio y se guardaron en bolsas de polietileno impermeable con cierre, sin aire en su interior, llevándose inmediatamente a freezer de -20°C para su conservación hasta uso, manteniendo así sus propiedades relativas a la penetración y permeación por un período de hasta 6 meses (Harrison et al., 1984; Schaefer y Loth, 1996).



Figura 5.1: remoción de tejido adiposo de un explanto de piel humana

5.2.5. Ensayo de penetración

5.2.5.1. Dispositivo de penetración y montaje de la piel

Se utilizó para este ensayo una variante *ad-hoc* del MPS, adaptada para penetración en condiciones no oclusivas. Para ello se fabricó una pieza de teflón con una cavidad cilíndrica de fondo plano de 25 mm de diámetro y 5 mm de profundidad. Se ubicó en el fondo de la pieza de sostén un disco de papel de filtro de 25mm de diámetro embebido en 300 l de buffer Tris para crear una condición de humedad alta en el interior.

Por medio de un sacabocados de 24 mm de diámetro y un martillo, se obtuvo un disco de piel (Figura 5.2.) a partir de las muestras conservadas según el punto 2.3. Se esperó hasta descongelación total, se limpió con un hisopo de algodón la superficie del disco, y se ubicó el mismo dentro del dispositivo sobre el papel de filtro, con el estrato córneo hacia arriba (Figura 5.3).



Figura 5.2: obtención de discos de piel para MPS

5.2.5.2. Aplicación e incubación de la muestra

Se aplicaron 50 μ l de la muestra correspondiente sobre el disco de piel montado en el dispositivo de teflón (11 μ l/cm² de piel, correspondientes a 0,12 mg de lípidos totales/cm²), repartidos en 20 microgotas de 2,5 μ l siguiendo un patrón en espiral del centro hacia los bordes. El dispositivo fue llevado a una estufa de 35 °C y se esperó inicialmente hasta evaporación total de las gotas de la superficie, considerando ese momento como el “tiempo cero” de incubación (Honeywell-Nguyen, 2003). A partir de allí, las muestras fueron incubadas en la misma estufa durante 1 h o 5 hs, luego de lo cual se retiró el dispositivo y se limpió con hisopos de algodón secos la superficie del estrato córneo, hasta que el algodón no tomase color luego de ser frotado contra el explanto. Todos los ensayos fueron realizados por quintuplicado con piel proveniente del mismo individuo.



Figura 5.3: disco de piel montado en el dispositivo de MPS

5.2.6. Remoción de capas del SC con cinta adhesiva (tape stripping)

Los discos de piel incubados con las muestras fueron montados en un bloque de polifan, sujetos por cuatro alfileres completamente clavados, ubicados equidistantes unos de otros, en los ángulos de un cuadrado de 20 mm de diagonal, y cubiertos con una máscara plástica adhesiva con una ventana circular de 15 mm de diámetro calada en su centro, la cual se hizo coincidir con el centro del explanto.

El *tape stripping* se realizó del siguiente modo: secuencialmente, 20 pedazos de cinta adhesiva fueron colocados sobre la máscara plástica, cubriendo la ventana a través de la cual se proporcionaba contacto directo con la piel. Una vez adherida, a cada cinta se le colocó encima un cilindro de teflón de 25 mm de diámetro para distribuir uniformemente sobre el explanto ubicado debajo un peso de 2 Kg aplicado durante 10 segundos. Seguidamente, cada cinta fue removida con ayuda de pinzas y recolectada en un tubo tipo falcon de 50 ml. Finalmente, el disco remanente de piel de 15 mm de diámetro bajo la ventana de la máscara fue removido con un bisturí y colocado en otro frasco.

5.2.7. Extracción y cuantificación de HPTS

En los tubos provenientes del *tape stripping* se agregaron 3 ml de una mezcla de etanol-agua 1:1 v:v y se llevaron a un agitador orbital mantenido a 37 °C, a 190 RPM por durante 1 hora.

Seguidamente, se determinó la emisión del HPTS a emisión = 510 nm en un fluorómetro Perkin-Elmer LS 55, equipado con el programa FL Winlab, con una excitación = 453 nm, un filtro tipo *cut-off* de 430 nm, un *slit* de emisión 5 y uno de excitación 14, en un tiempo de 4 segundos de integración, promediándose 5 valores por muestra. Un control realizado tras una incubación de piel con buffer reveló la ausencia de autofluorescencia del tejido. También se realizó un blanco con trozos de cinta adhesiva no usados que fueron sometidos al mismo proceso de extracción.

Para obtener los perfiles de penetración de la sonda en cada formulación se graficó la intensidad de fluorescencia en función del número de cinta (lo cual se relacionó asimismo con la profundidad) (Jui-Chen et al., 1991). Asimismo se graficó la intensidad de fluorescencia total detectada en las 20 cintas provenientes de cada ensayo.

5.2.8. Preparación y obtención de imágenes por microscopía confocal láser de fluorescencia

5.2.8.1. Obtención de cortes transversales de los explantos

LUD-HPTS/Ro-PE, liposomas convencionales-HPTS/Ro-PE, y LUD-QD fueron incubados durante 1 hora como se describió anteriormente (5.2.5.2). Luego, los discos fueron inmediatamente cortados transversalmente, congelados con hielo seco y embebidos en OCT. Por medio de un criostato Reichert-Jung CryoCut 1800 (Alemania) se realizaron cortes de 8 μ m de espesor, paralelos al plano del corte diametral (es decir, transversales al plano de la piel), a una temperatura de -20 °C. Los cortes de piel fueron fijados sobre un portaobjetos con formol al 10% por 10 minutos, y luego cubiertos por una capa de glicerina-gelatina y un cubreobjetos. Adicionalmente, otros cortes luego del fijado fueron sometidos a una tinción de hematoxilina-eosina, los cuales permitieron un chequeo instantáneo del estado de la piel al microscopio óptico. Como controles adicionales para la observación posterior, se incluyeron cortes de piel no incubada y cortes incubados con soluciones de HPTS y QD

5.2.8.2. Observación de cortes transversales con doble marca fluorescente por microscopía confocal

Los cortes transversales fueron observados por medio de un microscopio confocal láser de fluorescencia Olympus FV 300 equipado con el software Fluo View 3.3, con un láser de Ar de 488 nm para la excitación de la marca de HPTS o de QD, y uno de He-Ne de 543 nm para la excitación de la Rodamina.

5.2.8.3. Seccionamiento óptico por microscopía confocal

Discos intactos de piel incubados según 5.2.5.2. durante 1 y 5 horas con LUD-HPTS fueron observados al microscopio confocal con un aumento de 20X utilizando como fuente de excitación un láser de Ar de 488 nm, visualizándose la fluorescencia emitida en 510 nm. Se obtuvieron por cada muestra un total de 30 imágenes tomadas cada 2 μ m, producto de un barrido en el eje z desde 0 μ m (superficie) hasta 60 μ m de profundidad. Por medio del programa Image-J se obtuvo la intensidad de fluorescencia total en cada imagen, que luego fue graficada en función de la profundidad del plano seccionado.

5.3. Resultados

5.3.1. Penetración in vitro

Los perfiles de fluorescencia del HPTS extraído de cada cinta (*tape stripping*) tras 1 h de incubación que se muestran en la figura 5.4, mostraron diferencias significativas entre

la fluorescencia del HPTS según este fuera incubado incorporado en LUD o en liposomas convencionales.

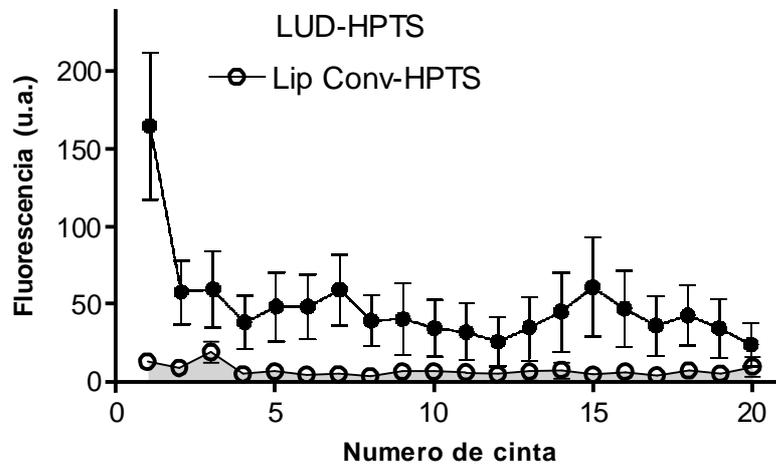


Figura 5.4: Perfil de fluorescencia vs número de cinta tras incubación con liposomas convencionales-HPTS y LUD-HPTS.

Si consideramos la fluorescencia de la sonda detectada en la totalidad del SC (suma de las 20 cintas), se halló aproximadamente 6.8 veces mayor fluorescencia cuando el HPTS se incubó incorporado a LUD que a liposomas convencionales (figura 5.5).

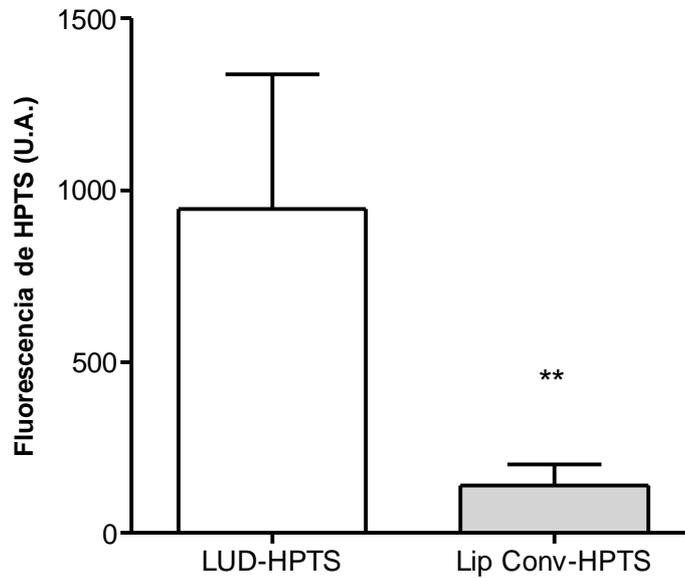


Figura 5.5: Fluorescencia total detectada en las 20 cintas luego de *tape stripping*, luego de incubación de piel por MPS con LUD y liposomas convencionales cargados con HPTS. Las diferencias son significativas (test Student ** $p < 0.05$) mostrando 6,8 veces más fluorescencia para la incubación con LUD-HPTS

Por otro lado, las imágenes de los cortes transversales obtenidas tras la incubación de la piel con liposomas con doble marca fluorescente (HPTS – Rodamina) revelaron la presencia de la Rodamina-PE de los LUD en numerosas capas del estrato córneo, hasta una profundidad de 14 m (con una mayor intensidad en los primeros 8 m) medido con el software Olympus Fluoview FV10-ASW ver 1.6, mientras que el HPTS se encontró en una fracción separada, ya incluso penetrando en la epidermis viable, con una profundidad promedio de 24m (figura 5.6 a y c). Por el contrario, la marca en liposomas convencionales sólo fue observada sobre la primera capa –superficial- del estrato córneo de los explantos (1 m Rodamina-PE y 2 m HPTS difuso y muy poco intenso) (figura 5.7

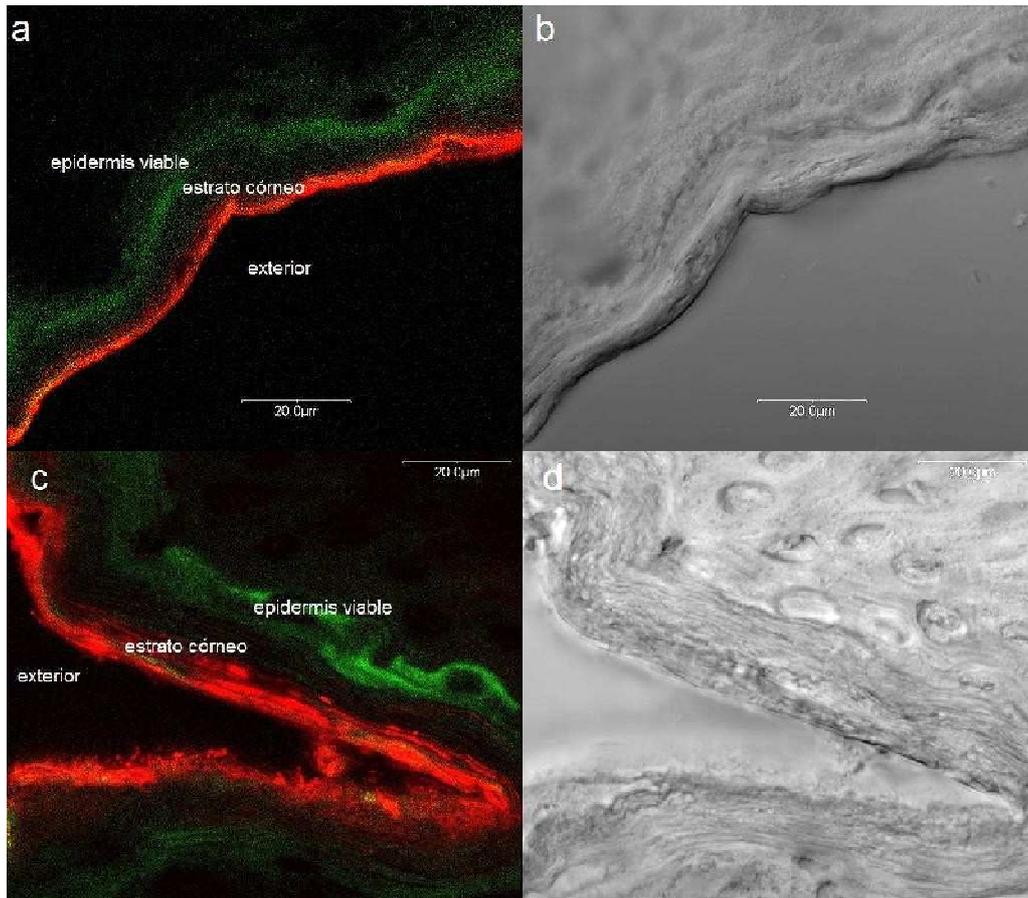


Figura 5.6: Microscopia confocal de criocortes de piel tras 1h de incubación con LUD-HPTS/Rodamina-PE. Se muestran 2 imágenes de distintas zonas del explanto en fluorescencia (a y c) y de los mismos campos en transmisión (b y d).

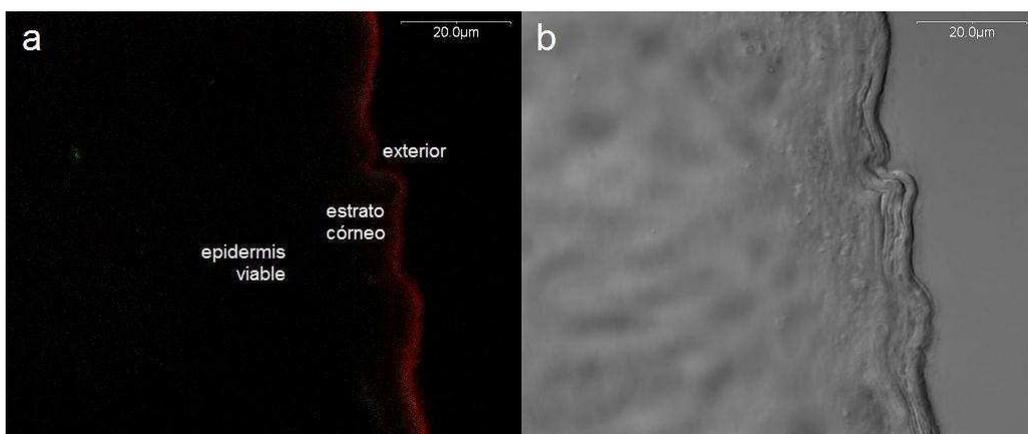


Figura 5.7: microscopia confocal de criocortes de piel tras 1h de incubación con liposomas convencionales-HPTS/Rodamina-PE. Se muestra el mismo campo en imagen de fluorescencia (a) y de transmisión (b).

5.3.2. Penetración en función del tiempo de incubación: 1 vs 5 hs

Posteriormente, se determinó la influencia del tiempo de incubación sobre la penetración de LUD-HPTS, obteniéndose los perfiles del *tape stripping* (figura 5.8.a) y de la fluorescencia acumulada en las 20 cintas (figura 5.8 b).

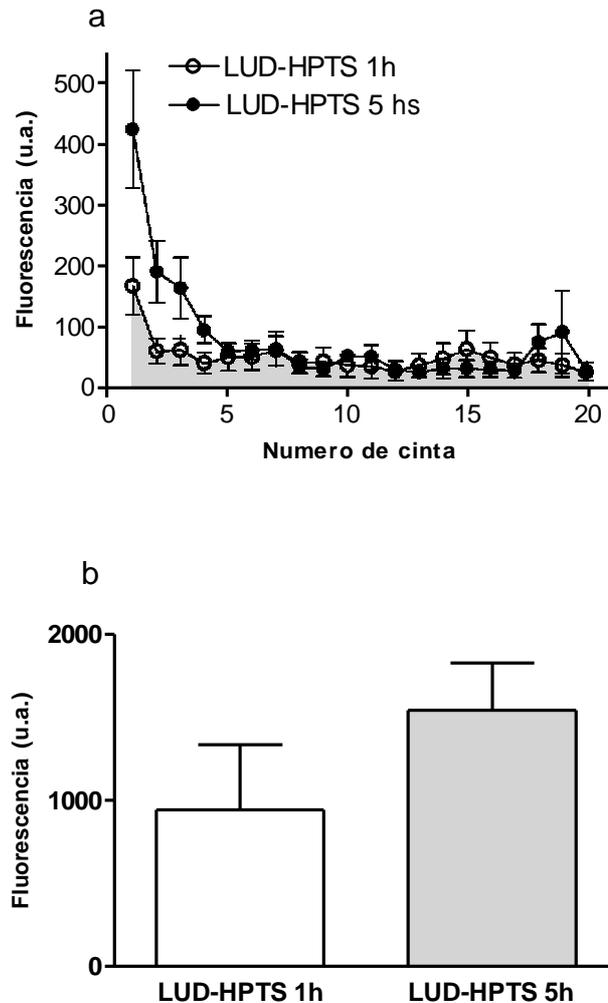
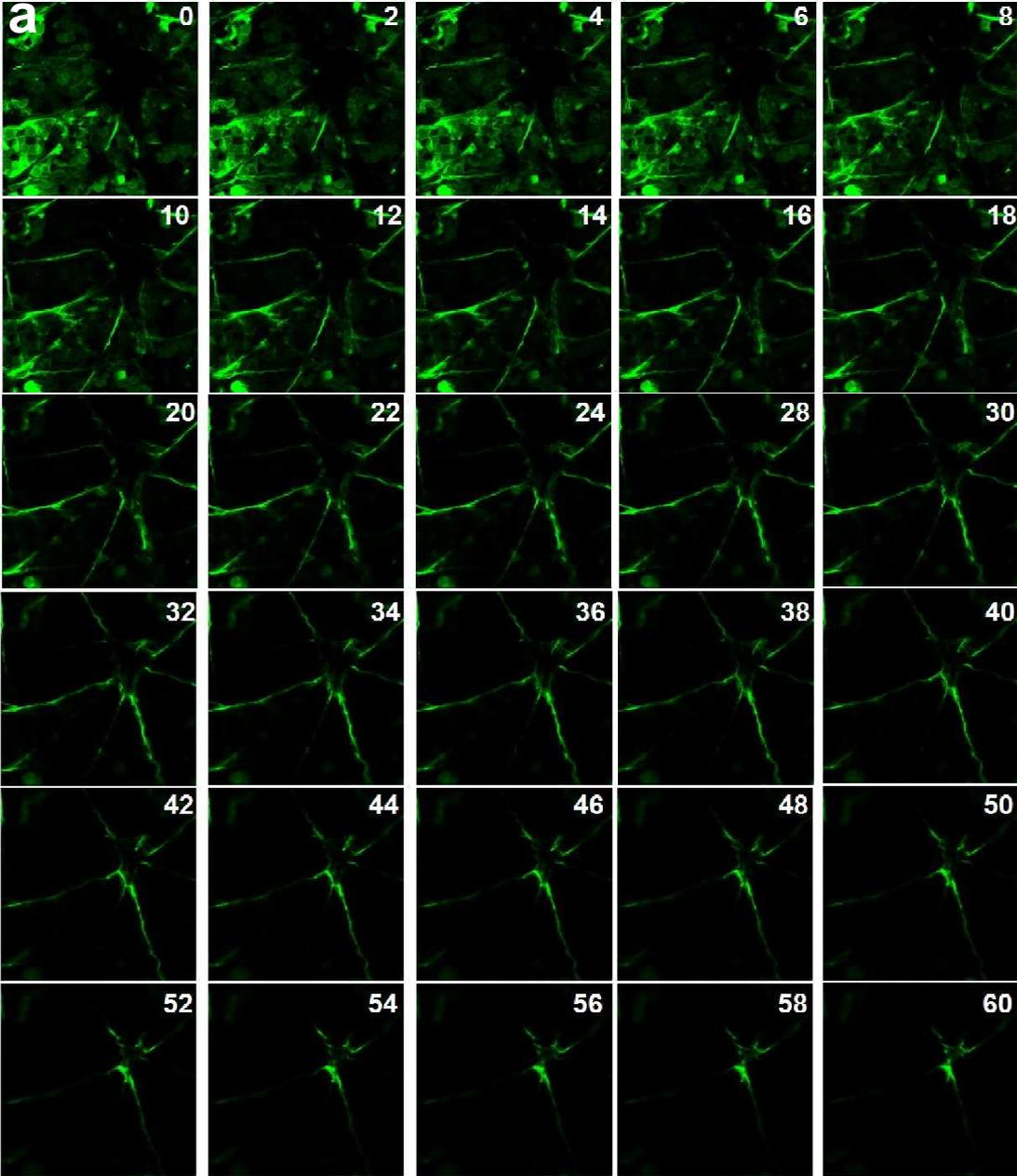
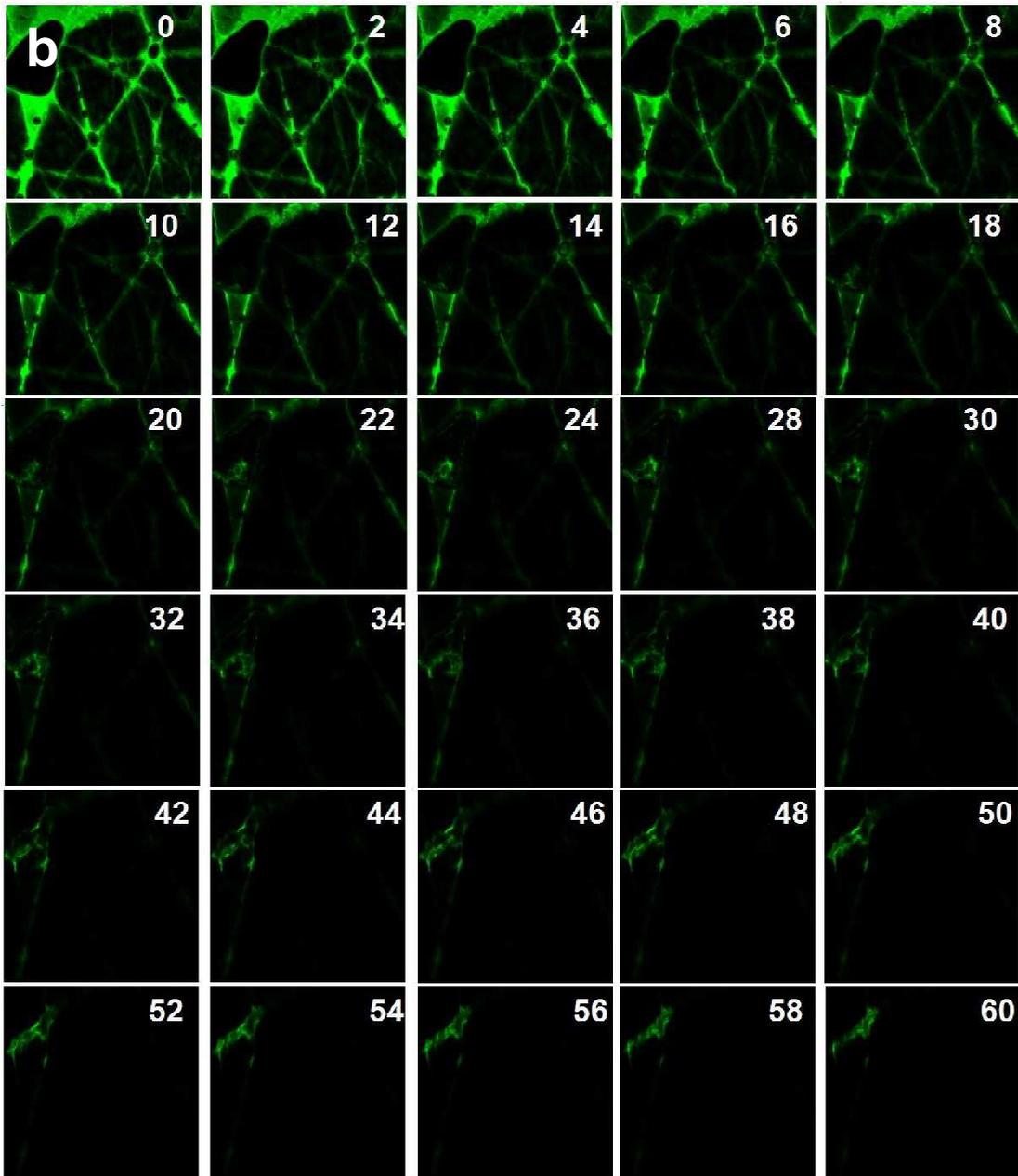


Figura 5.8: a) Perfil de fluorescencia tras incubaciones de 1 y 5 hs LUD-HPTS sobre piel por MPS seguido de *tape stripping*. b) Fluorescencia total en 20 cintas para el mismo experimento.

Adicionalmente, el estudio por seccionamiento óptico permitió obtener las series de imágenes confocales coplanares a la superficie de la piel, desde la superficie hasta 60 μ m de profundidad, para incubaciones con LUD-HPTS de 1 y 5 hs (figura 5.9. a y b, respectivamente). Para una mejor apreciación de la distribución de la fluorescencia observada a lo largo de canales entrecruzados, la figura 5.9.c muestra un detalle de la imagen correspondiente a la incubación de 5 hs a una profundidad de 8 μ m, que reveló la distribución de la marca fluorescente a lo largo de estructuras con forma de canales rectos

de entre 1 y 3 m de diámetro aparente, conformando una red tridimensional, que no puede ser distinguida por la técnica de fluormicrografía de criocortes transversales.





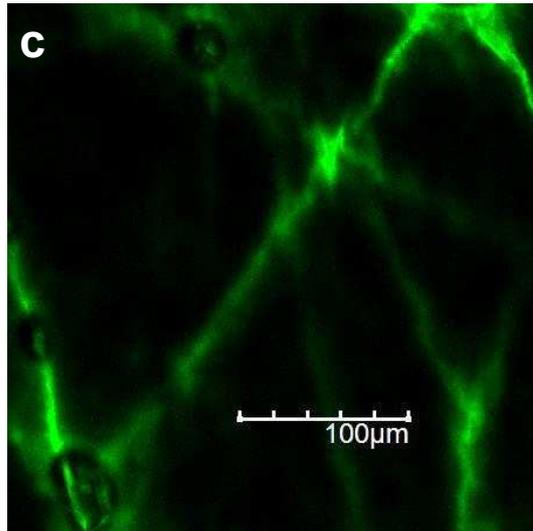
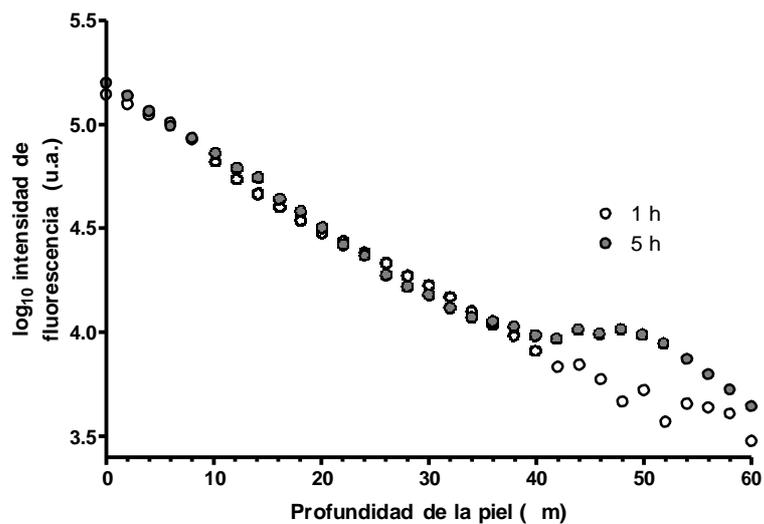


Figura 5.9. Imágenes confocales coplanares a la superficie de la piel desde el plano más superficial hasta el más profundo, tras 1 (a) y 5 (b) hs de incubación con LUD-HPTS (los números señalan la profundidad del eje z en μm). En (c) se muestra el detalle de una sección óptica (b), para una profundidad de 8 μm : se observa la fluorescencia distribuida a través de redes tridimensionales de canales de entre 1 y 3 μm de diámetro.

A partir de estas imágenes, se obtuvo la fluorescencia promedio de cada plano seccionado y se la graficó en función de la profundidad (Figura 5.10 a y b).

a



b

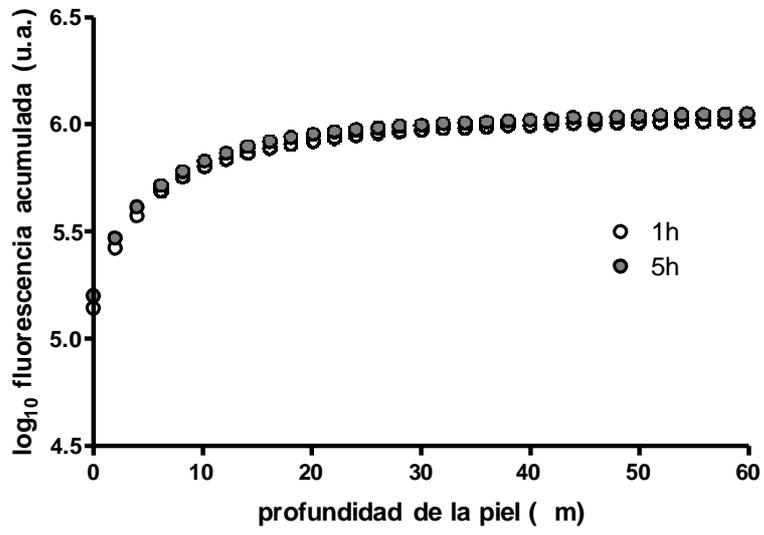


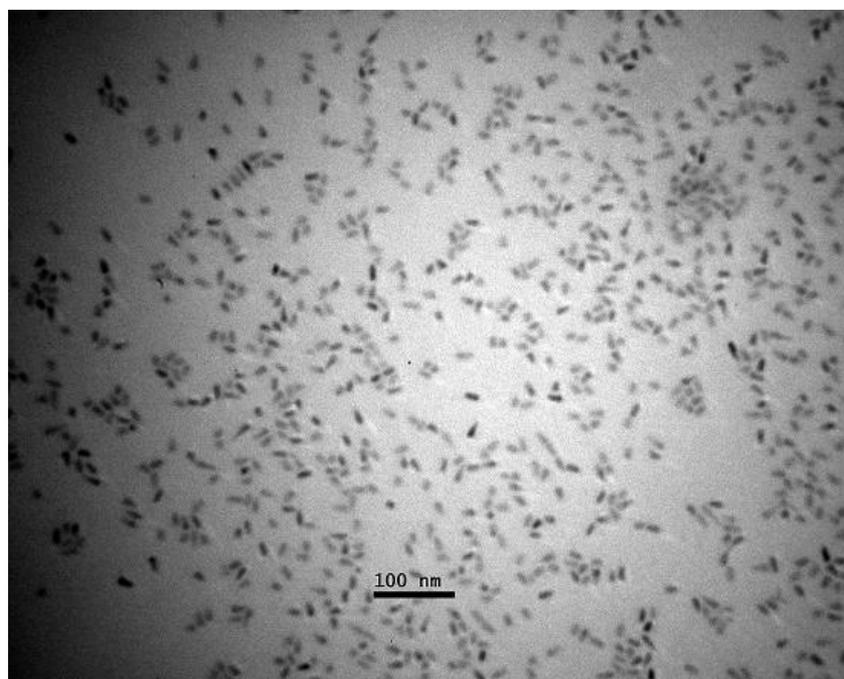
Figura 5.10: a) Perfil de fluorescencia en función de la profundidad de la piel obtenida a partir del seccionamiento óptico por microscopía confocal de la penetración de LUD-HPTS tras 1 y 5 h horas de incubación, en escala logarítmica. El gráfico b) muestra la fluorescencia acumulada, también en escala logarítmica. Las diferencias no fueron significativas.

No se encontraron diferencias significativas entre las fluorescencias obtenidas tras las incubaciones de 1 y 5 horas; ni en los perfiles de penetración obtenidos por *tape stripping* seguidos de extracción, ni en los obtenidos por seccionamiento óptico.

5.3.3. Caracterización de LUD-QD y QD

La suspensión de LUD-QD obtenida presentó aspecto translúcido y su tamaño promedio fue de 102 nm, con un índice de polidispersión de 0,128. Mientras que los QD libres se observaron con un aspecto cilíndrico al microscopio electrónico de transmisión (Fig 5.12 a), en las imágenes de la suspensión de LUD-QD se reveló la presencia de QD incorporados a LUD, aunque siendo estos LUD-QD una fracción minoritaria de la muestra, que se vio principalmente conformada por LUD vacíos (Figura 5.12 b), cuyo tamaño coincidió con el obtenido por dispersión de luz dinámica.

a.



b.

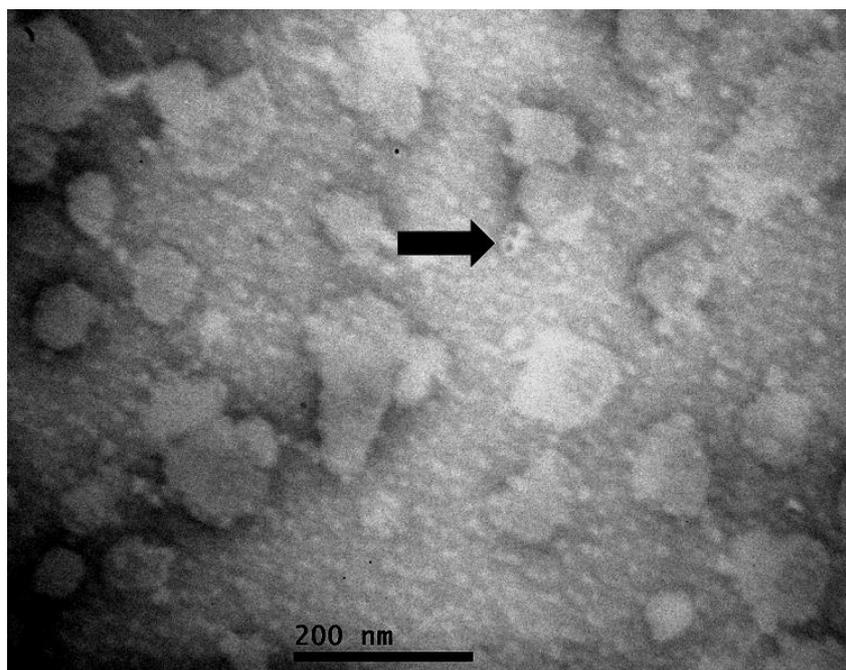
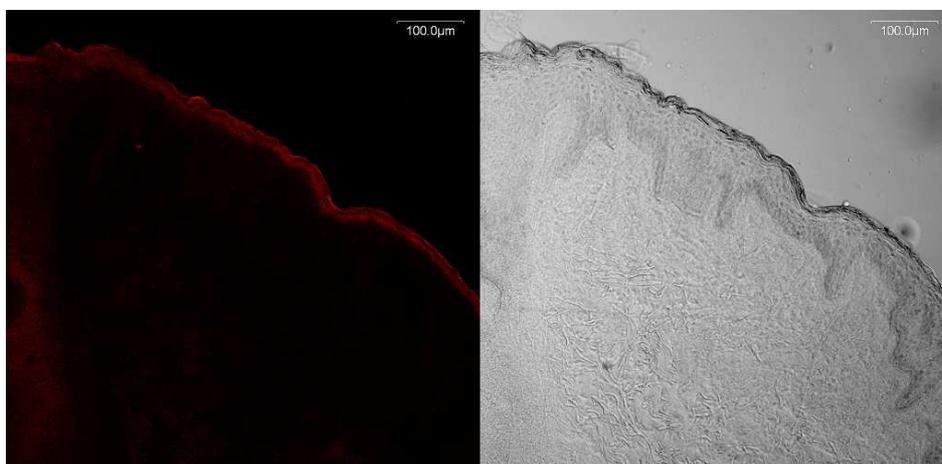


Figura 5.12: Microscopías electrónicas de transmisión. a) solución de QD, b) LUD-QD. La flecha señala una estructura vesicular conteniendo 2 QD.

5.3.4. Penetración de LUD-QD y QD

Se obtuvieron las imágenes de microscopía confocal de fluorescencia y microscopía óptica de transmisión para los ensayos de incubaciones de 1 hora sobre explantos de piel cortados transversalmente (figura 5.13). Para el explanto incubado con LUD-QD, la marca apareció confinada al espesor del SC (Figura 5.13 a). En cambio, la marca fluorescente en el explanto incubado con la solución de QD apareció distribuida tanto en el SC como por toda la epidermis viable (Figura 5.13 b)

a.



b.

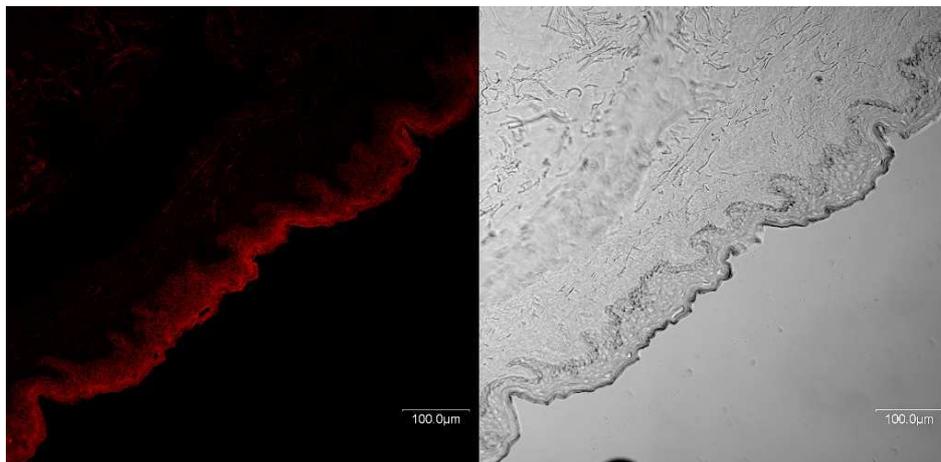


Figura 5.13: imágenes obtenidas por microscopía confocal de fluorescencia (izq) y microscopía óptica de transmisión (der), de explantos de piel humana incubados con LUD-QD (a), y solución de QD libres en buffer Tris (b)

5.4. Discusión

En este trabajo en primer lugar se adaptó el *Modelo de Penetración de Saarbrücken* para condiciones no oclusivas de aplicación de la muestra. Asimismo, se estandarizaron ciertos parámetros técnicos que la bibliografía disponible no detallaba y que podían introducir una alta variabilidad en los resultados: por un lado se trabajó con un dispositivo de montaje que permitiese exponer la parte superior de los explantos al aire para permitir la evaporación de los componentes volátiles de las formulaciones ensayadas, reestableciéndose así el gradiente de humedad que funciona como fuerza impulsora para la penetración de los LUD a través de la capa impermeable. Por otro lado, dado que la rugosidad de la piel y la elasticidad de su espesor exigen cierto estiramiento del explanto para lograr un *tape stripping* exitoso, se fijaron distancias de sujeción que fueron mantenidas en todos los ensayos. Debe notarse que si bien el área de explanto cubierto por la ventana plástica cuando éste está sujeto por tensores es menor que la que se expondría a la cinta si el explanto se mantuviese relajado, el mantener el mismo patrón de tensión a lo largo de todos los ensayos permite comparar áreas similares en todos los casos. De esta manera, realizando los ensayos por quintuplicado, proviniendo todos los explantos de una misma muestra de piel escindida de un único paciente, se intentó minimizar la variabilidad que de por sí presenta el método de *tape stripping*, cuya potencialidad analítica está firmemente consolidada pero sobre el cual se ha señalado con frecuencia la necesidad de optimizar el control de los factores que pueden introducir alta variabilidad (Honeywell-Nguyen et al., 2003; Honeywell-Nguyen et al., 2004; Henning et al., 2009).

La cuantificación reveló un patrón marcadamente diferente para la penetración de la sonda en las distintas capas del estrato córneo, según aquella se hallase incorporada a liposomas convencionales o a ultradeformables. Asumiendo que cada cinta al ser retirada se lleva adherida consigo una cantidad similar de estrato córneo (Jui-Chen et al., 1991) – si bien algunos trabajos proponen que debido a la mayor cohesión entre los queratinocitos de las capas más profundas esta cantidad iría decreciendo (Bashir et al, 2001)-, en estos perfiles obtenidos puede relacionarse directamente el número de cinta con la profundidad del estrato en el cual se detectó la marca. La penetración del HPTS para las formulaciones ultradeformables fue mayor que la observada en formulaciones convencionales a lo largo de todo el estrato córneo. Ello podría deberse lógicamente a la mayor capacidad de penetración de estas vesículas con propiedades especiales producto de su menor módulo elástico, y por tanto constituyó un resultado esperable.

Por otra parte, no se observaron diferencias significativas en la penetración para la incubación de 5 horas de LUD respecto de la de 1 hora, lo cual coincide con las observaciones de algunos autores que sostienen que ello sucede debido a que para el caso de las vesículas ultradeformables, la penetración se da de modo tan rápido que ocurre durante la primera hora, sin encontrarse gran diferencia en perfiles obtenidos con incubaciones más largas (Honeywell-Nguyen et al., 2004; van den Bergh et al., 1999). Otros trabajos habían registrado diferencia en ensayos comparativos de 1 y 4 hs de incubación utilizando el MPS para evaluar la penetración de una droga modelo en forma libre (Wagner et al., 2000). La cuantificación a partir de la intensidad de fluorescencia hallada en las distintas secciones ópticas obtenidas por microscopía confocal de explantos enteros confirmó la tendencia observada en los perfiles provenientes de la cuantificación por fluorimetría, patrones que son comparables hasta una profundidad de algo más de 20 micrómetros ya que hasta allí llega la remoción de estrato córneo por *tape stripping*

La microscopía confocal sobre cortes transversales, también conocida como fluoromicrografía (Yarosh et al, 1994; Kriwet et al., 1995; Verma et al., 2002) de explantos incubados durante 1 hora con liposomas con doble marca tuvo como primer fin comprobar la capacidad de penetración de las formulaciones ultradeformables en el estrato córneo, y adicionalmente monitorear el destino de la matriz liposomal y de su contenido acuoso simultáneamente. Se encontró que la matriz lipídica de los LUD penetró profundamente en el estrato córneo –a diferencia de la matriz lipídica convencional que permaneció por fuera de la capa impermeable-, con el costo de perder su contenido acuoso a lo largo de la penetración, si bien se verificó la entrada del mismo a la piel, incluso con un grado de penetración mayor que el de los lípidos, detectándose a mayores profundidades. Por otra parte, estudios previos han señalado la presencia de un cambio en el gradiente de hidratación entre el final del estrato córneo y la epidermis viable, lo cual debería incidir en un cese del avance de los LUD al llegar a dicho punto (Bouwstra et al., 2002). Ello podría

explicar el confinamiento de la sonda lipídica al estrato córneo. Asimismo, debe notarse que las moléculas hidrofílicas pequeñas de la sonda soluble en el interior acuoso fueron liberadas hacia el interior de la piel sólo en el caso de las matrices ultradeformables –dado que prácticamente no se halló señal de HPTS apreciable en la piel tratada con liposomas convencionales- siendo probablemente esta liberación una consecuencia del estrés elástico que supondría el pasaje a través del largo camino por el estrato córneo. Sobre la base de esta observación de una aparente pérdida apreciable de contenido acuoso, la elección de una droga liposoluble –como lo es la ftalocianina ZnPc- podría proveer una mayor certeza de asociación a la fracción lipídica durante el proceso de penetración, permaneciendo disponible en los liposomas una vez sorteada la barrera natural como propone Cevc (Cevc et al., 2002). Esta separación del contenido acuoso de la matriz liposomal ultradeformable no había sido observada en trabajos previos como el de Verma (Verma et al., 2002) que solamente detectaban una marca hidrosoluble en la epidermis concluyendo que era de suponer que la matriz lipídica también se encontrase en la misma capa de la piel, o en los trabajos mencionados en este mismo párrafo que detectaban el estancamiento de las matrices lipídicas hacia el final del SC.

El ensayo por seccionamiento óptico reveló además la distribución de la fluorescencia a lo largo de estructuras parecidas –aunque aparentemente de mayor espesor- a las redes de nanocanales observadas a profundidades similares por van den Bergh (van den Bergh et al., 1999) tras la incubación con LUD cargados con fluoresceína, habiendo sido también encontrados estos canales por otras técnicas (Honeywell-Nguyen et al., 2002).

Los QD utilizados tienen una forma elipsoide con un diámetro de 6 nm en su eje menor y de 12 nm en el eje mayor, pero que a causa de su recubrimiento con PEG (neutro), su diámetro hidrodinámico del eje mayor llega hasta los 45 nm (Ryman- Rasmussen et al., 2007). Previamente, Chen (Chen et al., 2006) había reportado la incorporación de este mismo tipo de QD a liposomas de 200 nm de diámetro. Si bien la preparación rindió un volumen de suspensión menor al obtenido para preparaciones que no involucran el trabajo con QD, otros autores (Chen et al., 2006) han señalado el mismo problema localizado en la etapa de separación en columna de Sephadex debido a la formación de una suerte de tapón en la misma a causa de la adsorción del PEG del recubrimiento de QD libres a la matriz de la columna.

Aunque con este esquema experimental se incorporó una fracción muy baja de QD a los LUD –a juzgar por las microscopías electrónicas de transmisión-, así como probablemente no hubo una separación total de los QD libres de los liposomas (de hecho, el relativamente gran tamaño de los QD supone una posible superposición parcial de su perfil de elución con el de los liposomas de 100 nm en una minicolumna de exclusión por centrifugación, de sólo 3 ml de capacidad para el lecho de Sephadex), resultó destacable el hallazgo de distintos perfiles de penetración de QD tras la incubación de la piel con las distintas suspensiones. Se

observó en primer lugar que en todos los casos se detectó la marca dentro de la piel. Para los LUD-QD la señal se detectó intensamente en todo el espesor del estrato córneo pero no más allá de él –lo cual supone de todos modos una efectiva penetración, ya que cuando no la hay la marca es detectable solamente en la primera hilera de queratinocitos como se vio en el ensayo de doble marca para formulaciones convencionales descrito en 5.7b.-; para el caso de la solución de QD, la señal se detectó no sólo en el estrato córneo, sino también en toda la epidermis viable. A su vez, el perfil de penetración de los QD libres coincidió con observaciones de otros trabajos recientes que aseveran la posibilidad de entrada de estos nanoconstructos a la piel intacta (Ryman-Rasmussen et al, 2006), en contraposición a otros resultados que sustentaban la impermeabilidad total de la barrera ante los nanomateriales (Oberdorster et al., 2005; Tinkle et al., 2003) o una penetración con confinamiento de los QD en el SC (Zhang y Monteiro-Riviere, 2008).

La penetración fue máxima para los QD libres. Esto significa que los QD merced a su cubierta hidrofílica de PEG, pudieron desplazarse a través de los nanocanales de la epidermis aun hasta su estrato más profundo. Cuando los QD se incorporaron en liposomas, sin embargo, la profundidad de su penetración disminuyó. Esto podría ser consecuencia de su confinamiento en el interior del compartimiento liposomal. Aun confinados en pequeñas cantidades (baja relación QD/lipido), la elevada relación entre radio hidrodinámico QD y radio liposomal (50 vs 100 nm) resultaría en un impedimento estérico a la penetración, que la ultradeformabilidad de la membrana no podría superar.

Evidentemente los QD no se escaparon de los LUD, porque en ese caso se observaría el mismo perfil de fluorescencia que presentado por los QD libres. Muy probablemente la retención en el interior vesicular lleve al patrón de bloqueo que se propone en el esquema de la Figura 5.14. Esto indicaría que hay un límite a la locomoción de los LUD que está dado por el tamaño del material particulado (por ejemplo, para el tamaño de los QDs que se utilizaron en esta experiencia), cuando deben atravesar nanocanales como los de la piel. Cabe remarcar que la marca de LUD-QD apareció distribuida en todo el SC y no solamente en la capa más superficial, lo que indicaría que la limitación a la locomoción no implicó la imposibilidad absoluta de penetración, sino una disminución de la misma que los confinó a ese estrato.

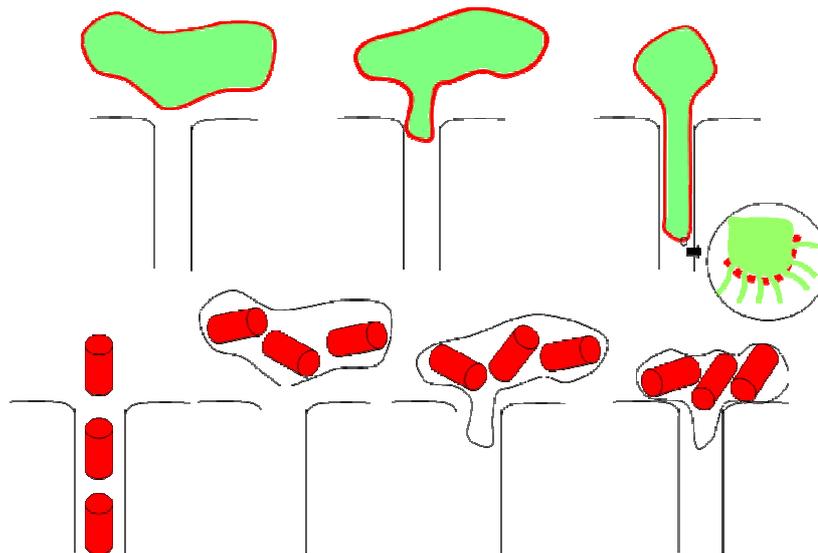


Figura 5.14: esquema propuesto para la penetración en el SC de QD libres y de LUD-QD. En la parte superior se describe la penetración de LUD con doble marca de Rodamina-PE + HPTS: El contenido acuoso marcado con HPTS (verde) escaparía de la matriz de LUD debido al estrés sufrido durante la penetración a través del SC. En la parte inferior del esquema, se compara la penetración de QD libres a través del SC con el bloqueo de penetración que sufren los LUD-QD debido al impedimento estérico, más allá de la ultradeformabilidad

Por último, se ha criticado previamente la técnica de fluoromicrografía por la posibilidad de alterar la organización lipídica de la piel debido a la congelación, lo cual podría llevar a una redistribución de la marca (Shotton y White, 1989). Sin embargo, en este trabajo se obtuvieron patrones de distribución de fluorescencia diferentes para los ensayos de penetración de LUD-HPTS-Ro-PE y de liposomas convencionales-HPTS-Ro-PE. Dado que los pasos de preparación de la piel para la técnica empleada fueron comunes a ambos ensayos, puede decirse que la diferencia en los patrones observados se debió a una distribución realmente diferente de la marca en la piel y no a un defecto de la técnica. A su vez, debe destacarse que la señal detectada en las capas profundas de la epidermis en el MPS se debe exclusivamente a la llegada de la misma desde la superficie de la piel, sorteándose con este método el problema de la penetración basolateral inherente a los estudios de permeación en Celda de Franz (Wagner et al., 2000)

En resumen, los experimentos de penetración en piel revelaron la capacidad diferencial de ingreso de los LUD a través del SC, resultando éstos vehículos mucho más adecuados que los liposomas convencionales para el direccionamiento de PAs hacia el interior de la piel luego de una aplicación tópica. Sin embargo, los perfiles diferentes hallados para marcas en el contenido acuoso y en la membrana lipídica, indicarían probables alteraciones de la estructura liposomal durante los eventos de penetración a través del

SC cuyas causas deberían ser elucidadas en posteriores análisis más exhaustivos. Asimismo, se halló que la ultradeformabilidad de la membrana no sería una condición suficiente para asegurar el ingreso de LUD cuando estos incorporan material particulado cuyo tamaño implique impedimentos estéricos para la locomoción a través de los nanocanales del SC.

CAPÍTULO 6

ACTIVIDAD ANTI-LEISHMÁNICA *IN VITRO* DE LIPOSOMAS ULTRADEFORMABLES FOTODINÁMICOS

Parte de este capítulo ha sido enviada para su publicación al Journal of Controlled Release. Los experimentos involucrando cepas de Leishmania braziliensis fueron llevados a cabo en colaboración con la Dra. Cristina Salomón (UNCuyo) y las Dras. Mónica Esteva y Cristina Maidana (Instituto Nacional de Parasitología Dr. Mario Fatała Chabén).

6.1. Introducción

Los resultados del capítulo 5 mostraron que las matrices ultradeformables pueden atravesar el SC. Potencialmente, por lo tanto, parte de esas matrices podrían acceder como material particulado hasta los amastigotes que colonizan macrófagos de los estratos profundos de la epidermis. En particular, es esperable que ftalocianina hidrofóbica permanezca asociada a la matriz UD, en tanto que la ftalocianina hidrofílica se perdiese durante el tránsito. En este capítulo por tanto, se hará hincapié en el estudio del efecto de LUD-ZnPC tanto sobre líneas celulares derivadas de mamífero como sobre promastigotes y amastigotes de *Leishmania* en cultivo.

Si bien los fotosensibilizadores (FS) son excitados en terapéutica fotodinámica generalmente por fuentes coherentes (láser) o incoherentes artificiales, también son sensibles a fuentes multifrecuencia como la luz blanca (Schneider-Yin et al., 2009) e incluso a la luz natural diurna. La capacidad de la luz natural de activar FS ha sido ampliamente descripta (Mahmoud et al., 2008), existiendo ya ensayos clínicos de TFD activados por exposición a la luz diurna (Wiegell et al., 2008; Wiegell et al., 2009). La constante solar, que oscila en un rango de entre 80-100 mW/cm² (Hartmann, T., 1988), permite obtener luego de una irradiación de 1 min una tasa de fluencia sobre la piel de 4,8-6 J/cm². En particular, se ha reportado daño sobre leishmanias por TFD al excitar al FS con una tasa de fluencia menor (2-3 J/cm²), proveniente de una fuente de luz coherente (Escobar et al., 2006).

Las ftalocianinas, en su calidad de FS de segunda generación, son moléculas estables, con alto rendimiento cuántico de oxígeno singlete, de baja toxicidad en ausencia de luz, y con alta absorción en la zona "NIR" (*cercana al infrarrojo*) del espectro, correspondiente a longitudes de onda de alta penetrancia (Kolárová et al., 2003). Debido a ello, numerosos derivados de ftalocianinas se han ensayado como fotosensibilizadores (Ben-Hur et al., 1985; Moan et al., 1994; Decreau et al., 1999; Stojiljkovic et al., 2001; Milla et al., 2009). La inclusión de ftalocianinas en liposomas (Yu et al., 2001; Namiki et al., 2004; Takeuchi et al., 2004; Postigo et al., 2004; Sadzuka et al., 2005) permite modificar su direccionamiento

hacia blancos de acción, convirtiéndolas en fotosensibilizadores de tercera generación (Allison et al., 2008; Moser, J.G, 1997). Es de esperarse que el tránsito intracelular de un fotosensibilizador se vea alterado cuando está incorporado a un SED. En este caso, los LUD-ZnPc deberían tener acceso preferencial a macrófagos cutáneos y células de Langerhans, ya que por ser estos SED material particulado con un diámetro promedio del orden de los 100 nm, serían blanco de fagocitosis por parte de estos tipos celulares.

La ubicación de los parásitos de *Leishmania* colonizando macrófagos cutáneos y células de Langerhans en las capas profundas de la epidermis no es un obstáculo para la activación de un FS de segunda o tercera generación que pudiese ser dirigido hasta allí, ya que las longitudes de onda del visible con las que estos se excitan presentan alta penetrancia cutánea. En cuanto a la toxicidad diferencial que los FS pudieran presentar sobre los parásitos y los macrófagos colonizados, existe cierta controversia, sosteniendo algunos autores que el proceso es inocuo para el hospedador (Bristow et al., 2006), y otros que refieren que la eliminación de amastigotes es consecuencia de la eliminación conjunta del parásito y de la célula huésped (Akilov et al., 2007a). Asimismo, existen dificultades relativas a falta de estandarización de métodos para la evaluación del daño producido por TFD (Akilov et al., 2007b), lo que hace poco comparables a muchos trabajos que utilizan fotosensibilizadores para producir toxicidad sobre el parásito y cuyos resultados son disímiles entre sí. Además, las formas de promastigote y amastigote de *Leishmania* aparentan tener diferentes susceptibilidades de inhibición por TFD (Morgenthaler et al., 2008)

En el presente capítulo, entonces, se estudiará el tránsito intracelular y la citotoxicidad de LUD-ZnPc sobre líneas celulares derivadas de mamífero. Posteriormente se evaluará la toxicidad de las formulaciones sobre formas libres de *Leishmania*, para finalmente evaluar el efecto tóxico sobre cultivos celulares infectados con amastigotes. La ftalocianina será activada únicamente por irradiación solar. Estos experimentos podrían ser un hito en el camino hacia el desarrollo de un tratamiento antileishmánico de aplicación tópica.

6.2. Materiales y métodos

6.2.1. Materiales

La fosfatidilcolina de soja (SPC) (phospholipon 90 G, pureza 92-98%) fue un regalo de Phospholipid/Natterman, Germany. El colato de sodio y Sephadex G-50, los reactivos del ensayo de consumo de glutatión reducido (GSH), el medio de cultivo RPMI 1640, los antibióticos, el suero fetal bovino (SFB) y la Rodamina-PE fueron comprados a Sigma. El medio bifásico NNN (Novy-McNeal-Nicolle) fue preparado en el laboratorio a base de sangre de conejo en base agar y RPMI. El fluoróforo 8- hidroxipireno-1,3,6- ácido trisulfónico (HPTS) y el apagador (*quencher*) bromuro de *p*- xileno-bis-piridinio

(DPX) fueron comprados a Molecular Probes. Ambas ftalocianinas de zinc fueron sintetizadas como se describió en el Capítulo 2, sección 2.2.2. Los demás reactivos utilizados fueron de grado analítico, comprados a Anedra, Argentina.

6.2.2. Preparación liposomal

LUD, LUD-ZnPc y LUD-ZnPcMet fueron preparados como se describió en el Capítulo 2, sección 2.2.3.

6.2.3. Ensayos de citotoxicidad y captura celular

6.2.3.1. Determinación de citotoxicidad por medición de actividad deshidrogenasa mitocondrial

La viabilidad celular luego de incubación con ambas ftalocianinas libres o liposomales en oscuridad o bajo la radiación solar o artificial, fue medida a través de la actividad deshidrogenasa mitocondrial empleando una sal de tetrazolio (MTT) en fibroblastos de la línea celular Vero y en macrófagos murinos de la línea J-774.

Las células mantenidas a 37 °C con 5% de CO₂ en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de SFB, glutamina 2 mM, 100 UI/ml de penicilina y 100 g/ml de streptomycin y anfotericina, fueron sembradas en microplacas de 96 pocillos de fondo plano a razón de 5×10^4 células por pocillo.

El medio de cultivo en los pocillos sobre las monocapas casi confluyentes fue reemplazado por 100 μ l de medio conteniendo las ftalocianinas libres o liposomales en una concentración de 1 o 10 μ M, lo que correspondió a 0,8 y 8 mM de fosfolípidos para LUD-ZnPc y 2 y 20 mM de fosfolípidos para LUD-ZnPcMet. LUD vacíos a una concentración 18 mM de fosfolípidos fueron utilizados como control. Debido a su baja solubilidad en agua, la ZnPc libre se disolvió en dimetilsulfóxido (DMSO) y una alícuota de esta solución (concentración final de DMSO menor al 1% v/v) se agregó al medio de cultivo para obtener una concentración de 1 o 10 μ M. Luego de incubar 18 hs a 37 °C en oscuridad, se removió el medio conteniendo las suspensiones reemplazándose por medio RPMI fresco y los cultivos se expusieron a dos fuentes de luz diferentes: luz del sol directa durante 15 minutos (dosis lumínica de 15 J/cm² a λ =600-650 nm medidos con un radiómetro Radiometer Laser Mate Q, Coherenr; coincidente con el valor reportado de la radiación solar promedio en la superficie terrestre) (Uriarte Cantolla, 2003) o irradiación con una lámpara halógena de 6V-20W de microscopio de fluorescencia durante 30 min para alcanzar el valor de 15 J/cm². El mismo procedimiento se llevó a cabo sin irradiación lumínica para determinar la toxicidad en oscuridad.

Luego de los tratamientos, los cultivos celulares fueron incubados durante 24 horas a 37 °C, los medios fueron removidos y reemplazados por RPMI fresco conteniendo 0,5 mg/ml de MTT. Luego de 3 hs de incubación, la solución de MTT fue quitada, los cristales insolubles de formazán fueron disueltos en DMSO y la absorbancia fue medida a 570 nm en un lector de multiplaca.

6.2.3.2. Determinación de citotoxicidad por medición de lactato deshidrogenada (LDH)

Se determinó la toxicidad de LUD vacíos sobre cultivos celulares por el método de medición de actividad de LDH, la cual es liberada por aumento de la permeabilidad de la membrana plasmática cuando ocurren procesos de muerte celular por una acción tóxica. El aumento de actividad LDH en el sobrenadante es proporcional al número de células lisadas. La LDH cataliza la reducción de NAD⁺ a NADH en presencia de L-lactato. La aparición de NADH se mide por una reacción acoplada de reducción de una sal de tetrazolio que genera formazán soluble, que puede medirse colorimétricamente. En este caso, cultivos de las líneas celulares J-774 y Vero se sembraron en una multiplaca de 96 pocillos a razón de 5×10^5 células por pocillo en RPMI suplementado con antibióticos y SFB al 10%, y se incubaron con LUD en concentraciones de 1,8 mM y 10 mM. Los inóculos se retiraron luego de 1h lavándose con buffer fosfato (PBS) pH 7.4 y reemplazándose por medio fresco, llevándose los cultivos a estufa de 37°C, 5% CO₂ por 24 hs. Los sobrenadantes de los cultivos fueron transferidos a otra placa donde se agregó la

mezcla reactiva de lactato (26 mg/ml en buffer Tris), iodonitrotetrazolio (2 mg/ml, proveniente de una dilución 1:10 en PBS de una solución 20 mg/ml en DMSO), y sustrato NAD⁺ (3 mg/ml NAD⁺, 13,5 U/ml diaforasa, 0,03% BSA, y sacarosa 1,2% en PBS). La reacción se detuvo por agregado de oximato de sodio (16,6 mg/ml), y se midió la absorbancia a 490 nm en un lector de multiplaca.

6.2.3.3 Determinación de estrés oxidativo por medición de glutatión reducido (GSH)

Se determinó la generación de estrés oxidativo luego de tratamientos e irradiación por medición de GSH (Tietze F., 1969). La enzima glutatión reductasa cataliza la reducción del glutatión oxidado por oxidación del NADPH+H⁺ generando glutatión reducido (GSH) y NADP⁺. El GSH puede cuantificarse indirectamente por su reacción con DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis (2-nitrobenzoico)) que genera un producto coloreado. En este experimento, brevemente, se sembraron 5x10⁴ células de la línea J-774 por pocillo en 2 juegos de multiplacas, en RPMI suplementado con antibióticos y SFB al 10%, y se incubaron con LUD-ZnPc en concentraciones de 1 M y 10 M de ftalocianinas. Todos los ensayos fueron llevados a cabo por quintuplicado. A las 24 hs se retiraron los inóculos, se agregó medio fresco, y se expuso uno de los juegos de placas al sol durante 15 min al mediodía, en un día sin nubes. 24 hs después, se levantaron las células con tripsina y se transfirieron a tubos eppendorf inactivándose la tripsina con SFB. Se llevaron a cabo 2 lavados por centrifugación a 2.000 x g por 10 min a 4 °C con PBS y finalmente el pellet celular se resuspendió en 100 l de EDTA 1 mM. Los tubos fueron sonicados en frío con un sonicador de punta durante 10 segundos, y luego fueron centrifugados a 10.000 x g por 15 min a 4 °C. 20 l del sobrenadante de cada tubo fueron transferidos a una placa de 96 pocillos. Sobre cada alícuota se agregaron 180 l de una mezcla de EDTA (0,1 mM en PBS), DTNB (60 M en NaHCO₃ al 0,1 %), GSH reductasa (2,4 UI/ml) y NADPH (1,5 mM en NaHCO₃ al 0,1%). Se dejó reaccionar por 15 min y se procedió a la lectura de absorbancia a 410 nm en un lector de multiplaca. Una curva de calibración de GSH (6 diluciones entre 12,5 y 0,4 M) fue preparada simultáneamente para la cuantificación.

6.2.3.4. Captura celular de liposomas y destino del HPTS liposomal tras irradiación

La captura celular y el destino intracelular de la sonda fluorescente HPTS incorporada en LUD (LUD-HPTS/DPX) o junto con cada ftalocianina (LUD-HPTS/DPX- ZnPc y LUD-HPTS/DPX-ZnPcMet) preparados como se describió en el Capítulo 2, fueron monitoreados tras la incubación sobre células Vero y J-774 por microscopía de fluorescencia.

En primer lugar, el tiempo mínimo requerido para la captura celular de LUD fue determinada en ambos tipos celulares crecidos casi hasta confluencia sobre cubreobjetos

redondos en el fondo de multiplacas de 24 pocillos. Luego de 5, 10 o 15 min de incubación a 37°C con LUD-HPTS/DPX en oscuridad, las suspensiones liposomales fueron removidas, las células fueron lavadas, y los cubreobjetos se montaron en un microscopio de fluorescencia. La fluorescencia asociada a células del HPTS fue monitoreada por 45 min con un microscopio de fluorescencia Nikon Alphaphot 2 YS2.

Luego, el efecto de las ftalocianinas y la irradiación sobre el destino del HPTS liposomal fue determinado en ambos tipos celulares, crecidos del modo antes mencionado, en dos multiplacas de 24 pocillos tras incubación de 45 min con LUD- HPTS/DPX, LUD-HPTS/DPX-ZnPc o LUD-HPTS/DPX-ZnPcMet. Luego de la incubación, las células fueron lavadas y una placa fue colocada bajo la luz irradiada por el microscopio hasta recibir una dosis total de energía de 15 J/cm^2 mientras que la otra placa permaneció en la oscuridad, y se procedió a tomar fotografías secuenciales a lo largo de 30 min.

Finalmente, estas mismas células incubadas por 45 min, fueron fijadas con metanol por 10 min y la emisión del HPTS y de las ftalocianinas fue registrada con un microscopio confocal laser Olympus FV300, bajo excitación con láser de Ar 488 nm y uno de HeNe 633 nm respectivamente.

6.2.4 Determinación de actividad anti-promastigote

A partir de un cultivo de promastigotes de *Leishmania braziliensis* a 25° C en medio bifásico (agar-sangre de conejo y RPMI suplementado con penicilina/ estreptomycin -PE/ST- y 10% de SFB), se realizó un conteo de parásitos vivos en cámara de Neubauer, encontrándose $1,63 \times 10^7$ parásitos/ml en la fase móvil. Se transfirieron alícuotas de 30 l (conteniendo 5×10^5 parásitos) a tubos eppendorf y a cada uno se le agregaron 100 l de RPMI (PE/ST, SFB 10%) y 10 l de la suspensión a evaluar; por lo que la concentración inicial fue de $3,57 \times 10^6$ promastigotes/ml. Las suspensiones ensayadas fueron las siguientes: a) LUD-ZnPc (3,8 M de ZnPc; 0,84 mg/ml de lípidos totales, con una proporción de $2,7 \times 10^7:1$ LUD:promastigote) para posterior irradiación solar; b) LUD-ZnPc (3,8 M en ZnPc; 0,84 mg/ml en lípidos totales, con una proporción de $2,7 \times 10^7:1$ LUD:promastigote) mantenido en oscuridad; c) LUD vacíos (0,93 mg/ml en lípidos totales, con una proporción de $3,0 \times 10^7:1$ LUD:promastigote); d) y e) control de promastigotes sin tratamiento (10 l buffer Tris), uno posteriormente irradiado y uno mantenido en oscuridad. Los tubos fueron incubados por 30 min a 25 °C y luego se centrifugaron (3 min a $3830 \times g$, centrífuga para eppendorfs). El sobrenadante conteniendo LUD no capturados por los promastigotes fue removido y el pellet de parásitos se resuspendió en medio RPMI. Uno de los tubos incubados con LUD-ZnPc (a) y un control de promastigotes sin tratamiento (d) fueron seguidamente expuestos 15 min al sol (día despejado, a media tarde). Luego todos los tubos se incubaron a 25 °C y a las 24 y 48 hs se tomaron alícuotas y se contaron promastigotes en cámara de Neubauer.

Adicionalmente, los tubos (a) y (d) fueron irradiados nuevamente tras 24h durante 15 min al sol del mediodía. La actividad anti-promastigote (% AP) se calculó de la siguiente manera:

$$\%AP = \{1 - [(n^{\circ}\text{promastigotes tras incubados con suspensión}) / (n^{\circ}\text{promastigotes control})]\} \times 100$$

Adicionalmente, se evaluó la motilidad como índice de la viabilidad de promastigotes (Papagiannaros et al., 2005) expuestos a un tiempo corto de incubación con LUD vacíos. Se agregaron 100 μ l de RPMI y 10 μ l de LUD en dos concentraciones: 1,29 y 0,13 mg/ml de lípidos totales, a 5×10^5 parásitos por ensayo (proporciones de 4,1x10⁷:1 y 4x10⁶:1 liposomas:promastigote respectivamente). Se incubó por 5 minutos y seguidamente se centrifugó 10 minutos a 20 °C a 3830 x g. Se retiró el sobrenadante y se agregó medio fresco, se incubó por 3 hs y se tomaron alícuotas para observar al microscopio en cámara de Neubauer.

6.2.5. Ensayos de captura liposomal por promastigotes

6.2.5.1. Ensayos de captura de LUD-ZnPc

Se colocaron en 2 tubos eppendorf alícuotas de 20 μ l de la fase líquida del medio de crecimiento de los promastigotes de *L. braziliensis* con 80 μ l de RPMI y se agregaron 50 μ l de LUD-ZnPc (3,9 mg/ml de lípidos totales). Se incubaron sendos tubos a 4°C y 25°C respectivamente por 15 minutos. Seguidamente se centrifugaron por 3 minutos a 3830 x g en centrífuga de eppendorf, se descartó el sobrenadante conteniendo los liposomas no capturados, y se resuspendió el pellet de parásitos en 100 μ l de formaldehído al 2% en buffer PBS durante 10 minutos para fijación, luego de lo cual se extendió una gota (5 μ l) de cada preparado en un portaobjetos y se cubrió con un cubreobjetos. La emisión de fluorescencia de la ftalocianina fue registrada con un microscopio confocal laser Olympus FV300, bajo excitación con un láser de HeNe 633 nm.

6.2.5.2. Ensayos de captura de LUD con doble marca fluorescente

Adicionalmente, se realizó un ensayo en condiciones similares al anterior, pero incubándose los parásitos con LUD marcados con el fluoróforo hidrofílico HPTS en su interior acuoso y con el fluoróforo lipofílico Rodamina-PE en la membrana (LUD- HPTS/Ro-PE). Las muestras fueron observadas al microscopio óptico de fluorescencia con un set de filtros para fluoresceína/rodamina, y al microscopio confocal de fluorescencia bajo excitación del láser de Ar de 488 nm para la marca de HPTS, y He-Ne de 543 nm para la de Rodamina.

6.2.6. Determinación de actividad anti-amastigote intracelular

Se sembraron células fagocíticas de la línea celular RAW en 2 juegos de multiplacas de 24 pocillos sobre cubreobjetos redondos en el fondo, a razón de 3×10^5 células/pocillo y se crecieron 18 hs en 500 μ l de medio RPMI suplementado con PE/ST y SFB 10%. Posteriormente, se infectaron las células con promastigotes de *L. braziliensis* en una proporción de 10:1 (leishmania: células) y se realizaron distintas incubaciones (por duplicados) según el siguiente esquema:

- (1)- LUD-ZnPc (t_0 hasta t_{24}) (4,5 μ M en ZnPc, 1,07 mg/ml en lípidos totales)
- (2)- LUD-ZnPc (t_{22} hasta t_{24}) (4,5 μ M en ZnPc, 1,07 mg/ml en lípidos totales)
- (3)- LUD-ZnPc (t_0 hasta t_2) (4,5 μ M en ZnPc, 1,07 mg/ml en lípidos totales)
- (4)- ZnPc (t_0 hasta t_{24}) (4,5 μ M en ZnPc)
- (5)- ZnPc (t_{22} hasta t_{24}) (4,5 μ M en ZnPc)
- (6)- ZnPc (t_0 hasta t_2) (4,5 μ M en ZnPc)
- (7)- LUD (t_0 hasta t_2) (1,07 mg/ml en lípidos totales)
- (8)- (control de infección) (t_0 hasta t_{24})
- (9)- (control de infección) (t_0 hasta t_2)

Es decir, se ensayaron 3 combinaciones de tiempo de incubación distintas:

- (1) y (4)= se incuban a la vez los promastigotes y LUD-ZnPc o ZnPc libre durante 24 hs
- (2) y (5)= primero se inoculan los promastigotes durante 22 hs, y entonces se incuban LUD-ZnPc, ZnPc libre o LUD vacíos por 2hs, hasta cumplir las 24 hs
- (3),(6) y (7)= se incuban a la vez los promastigotes y LUD-ZnPc o ZnPc libre durante 2 hs. Este es un esquema similar al (1) y (4) pero con un tiempo de incubación menor.

En todas las incubaciones con liposomas, la proporción liposomas:parásitos fue de $2,9 \times 10^8$:1

Luego de las incubaciones se lavaron los cultivos para eliminar los promastigotes y liposomas/ftalocianinas que no hubieron ingresado a las células, se repuso medio fresco y se expuso una de las placas por 15 min al sol del mediodía mientras que la otra se mantuvo en oscuridad. Las placas se incubaron en estufa por 24 hs, luego de cual las células se fijaron y tiñeron con la tinción de May Grunwald/Giemsa, los cubreobjetos

fueron secados y luego montados sobre portaobjetos. Finalmente, se realizó el conteo de amastigotes intracelulares, en microscopio óptico a 1000x, contando los amastigotes en 300 células por cubreobjetos, calculándose luego el porcentaje de actividad anti-amastigote (%AA) de la siguiente manera:

$$\%AA = \{1 - [(n^{\circ} \text{ amastigotes} / 100 \text{ células tratadas}) / (n^{\circ} \text{ amastigotes} / 100 \text{ células sin tratar})]\} \times 100$$

6.3. Resultados

6.3.1. Citotoxicidad

En primer lugar, el efecto de las ftalocianinas libres o liposomales sobre la viabilidad de células Vero y J-774, ya fuera en la oscuridad o luego de irradiación solar, fue determinado por el ensayo de MTT. Se utilizaron estas líneas celulares para evaluar el efecto tóxico mediado por dos vías de ingreso celular diferentes: mientras que las células J-774 son células fagocíticas, del mismo tipo que las colonizadas por los parásitos de *leishmania* y se especializan en la captura y procesamiento rápido de material particulado, las células Vero se especializan en la endocitosis de material soluble y podrían verse como modelo de células que no son colonizadas.

La viabilidad de ambas líneas celulares no fue afectada por LUD vacíos. Similarmente, las células Vero no fueron afectadas por las ftalocianinas libres ni por las liposomales hasta una concentración de 10 μM (de ftalocianinas) en oscuridad o tras la irradiación.

Por otro lado, como se muestra en la Figura 6.1, las células J-774 no fueron afectadas por las ftalocianinas libres ni por ZnPcMet liposomal (hasta 20 mM de fosfolípidos); sin embargo, LUD-ZnPc en una concentración de ZnPc 10 μM (correspondientes a 8 mM de fosfolípidos) redujo significativamente la viabilidad al 25%, tanto en oscuridad (barras grises) como luego de irradiación (barras blancas).

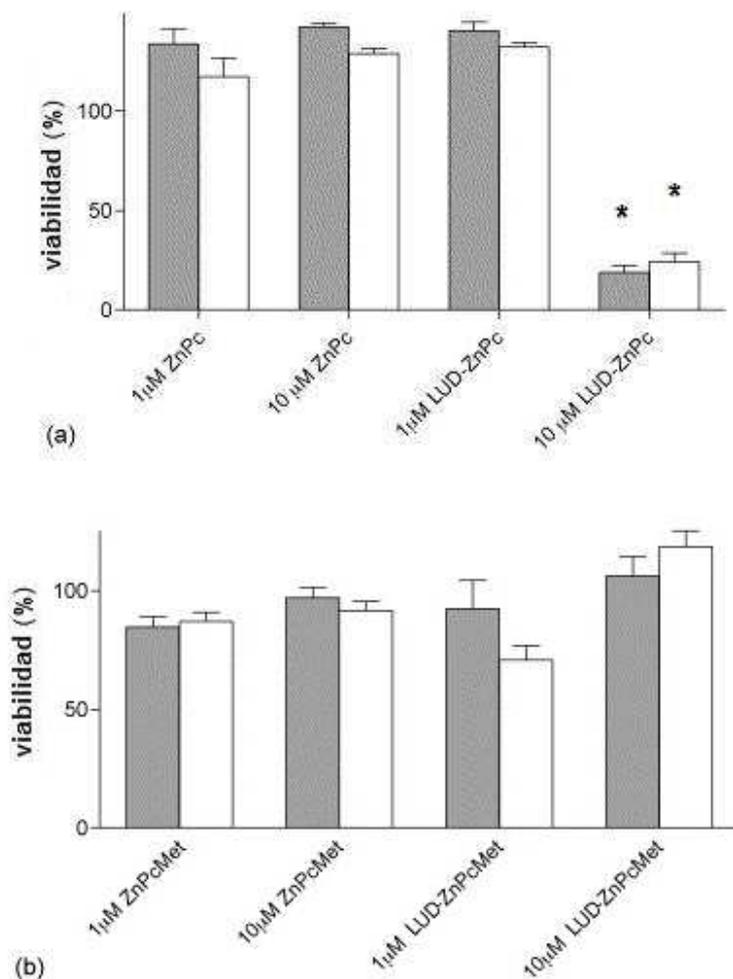


Figura 6.1 Citotoxicidad (determinada por MTT) de LUD conteniendo ftalocianinas y ftalocianinas libres en oscuridad y tras irradiación en células J-774: (a) ZnPc; (b) ZnPcMet. Cada valor representa el promedio \pm desviación estándar ($n=3$). El test t de Student se utilizó para comparar la diferencia entre tratamiento (* $p<0.05$)

Posteriormente, se evaluó la toxicidad de LUD vacíos en oscuridad sobre células J-774 y Vero por el método de LDH. Los resultados mostrados en la figura 6.2, indicaron también que además de una disminución basal de viabilidad de un 15 % para ambas líneas celulares, sólo las células J-774 disminuyeron significativamente su viabilidad en un 80 % respecto del control tras la incubación con LUD a 10 mM de fosfolípidos.

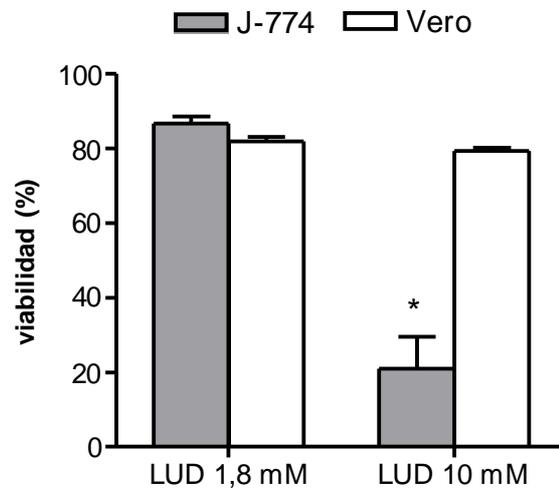


Figura 6.2. Viabilidad de células J-774 y Vero por método de LDH tras incubación con LUD vacíos en oscuridad. El test *t* de Student se utilizó para comparar la diferencia entre tratamiento (* $p < 0.05$).

La generación de estrés oxidativo determinado por la consumición de GSH fue evaluado sobre células J-774, tanto en condiciones de oscuridad como tras la irradiación solar. Los resultados mostraron consumición de GSH solamente luego de la incubación con LUD-ZnPc 10 M (8 mM de fosfolípidos) (figura 6.3).

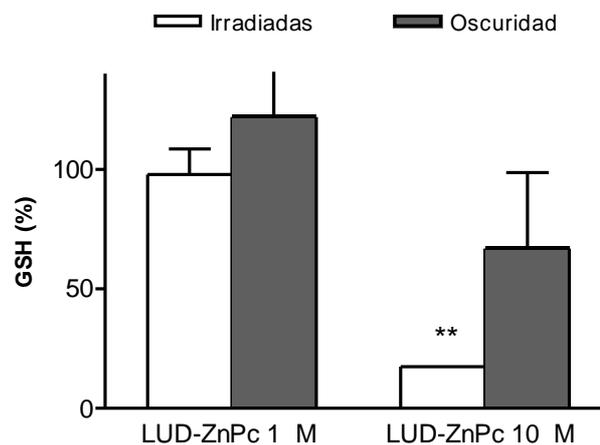


Figura 6.3. Determinación de GSH en células J-774 tras la incubación con LUD-ZnPc. El test *t* de Student se utilizó para comparar la diferencia entre tratamiento (** $p < 0.01$).

6.3.2. Captura liposomal celular y destino del HPTS liposomal tras irradiación

El espectro de excitación del HPTS (350-450 nm) es altamente sensitivo al pH, mientras que su espectro de emisión (510 nm) es invariante. Cuando los liposomas conteniendo HPTS/DPX son capturados por células y mientras permanecen intactos dentro de los endo/fago/lisosomas (debido al apagamiento de contacto) o si el HPTS es liberado dentro de esos compartimientos acídicos (sensibilidad al pH del espectro de excitación), se registra una fluorescencia pobremente visible bajo excitación en el rango del azul. En contraste, la liberación de HPTS en un compartimiento de pH neutro tal como el citoplasma, se detecta como la aparición de una fluorescencia intensa llenando toda la célula (Straubinger, 1993) frente a la misma excitación en el azul.

Respecto de la captura liposomal celular, sólo las células J-774 mostraron fluorescencia luego de 5 min de incubación, mientras que las células Vero requirieron al menos una incubación de 15 min para que fuese detectable una señal. Al primer minuto posterior a los 15 min de incubación, las células Vero presentaron fluorescencia periférica (Figura 6.4.a), mientras que las células J-774 ya presentaban su zona perinuclear completa llena de fluorescencia verde (Figura 6.4.b). Luego de aproximadamente 45 min, se observó la aparición de compartimientos vesiculares fluorescentes en el citoplasma de las células Vero, mientras que la fluorescencia periférica permaneció presente; no se registró cambio en la señal de las células J-774 a lo largo del mismo período de tiempo. El tiempo requerido para la aparición de evidencia de captura liposomal y el tránsito más lento desde la periferia hacia la zona perinuclear, indicaron que las células Vero capturaron y procesaron los LUD fluorescentes a una velocidad mucho más lenta que las células J-774. La co-localización intracelular en células Vero (Figuras 6.4.c y d) y J-774 (Figuras 6.4.e y f) de ambas ftalocianinas (fluorescencia roja; Figuras 6.4.c y e) y HPTS (fluorescencia verde; Figuras 6.4.d y f) tras 45 minutos de incubación (un período de tiempo lo suficientemente largo para permitir la captura y procesamiento de los LUD por ambas líneas celulares) en oscuridad con ftalocianinas liposomales (LUD-ZnPc y LUD-ZnPcMet, ambas conteniendo HPTS/DPX) fue revelada a través de fotografías secuenciales de microscopía confocal en el eje z.

Con respecto al destino del HPTS, en cuanto al efecto de las ftalocianinas y efecto de la irradiación, no se registraron cambios en la fluorescencia vesicular pálida de los citoplasmas de las células Vero ni en el brillo perinuclear en las células J-774 incubadas con LUD conteniendo HPTS/DPX luego de 30 min de irradiación. Por otro lado, las ftalocianinas liposomales (LUD-ZnPc y LUD-ZnPcMet, ambas conteniendo HPTS/DPX) no indujeron cambios en la distribución de la señal del HPTS tras 30 min de irradiación tanto en células Vero (Figura 6.4.g) como en J-774 (Figura 6.4.h). Adicionalmente, ninguna de las dos ftalocianinas liposomales produjo diferencias en la señal de HPTS en cada una de las líneas

celulares.

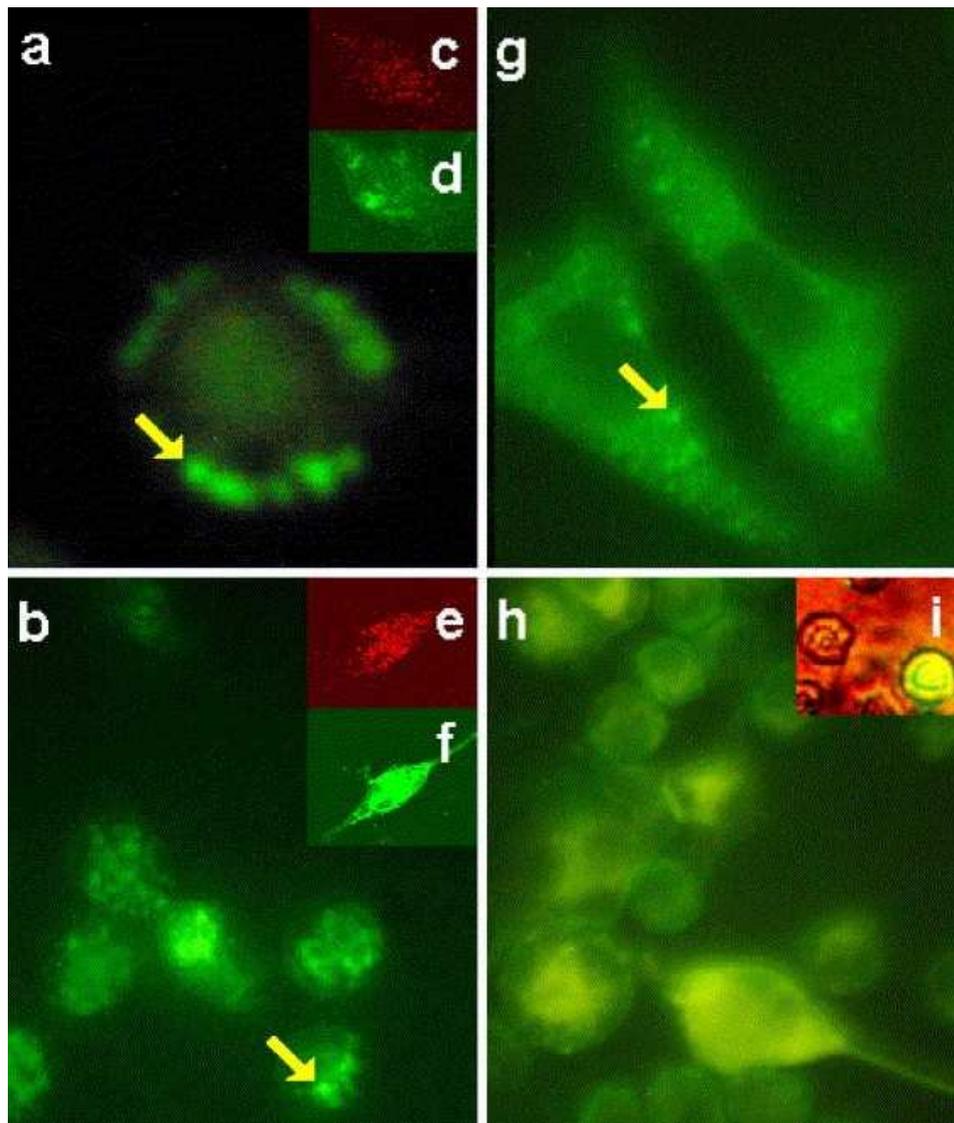


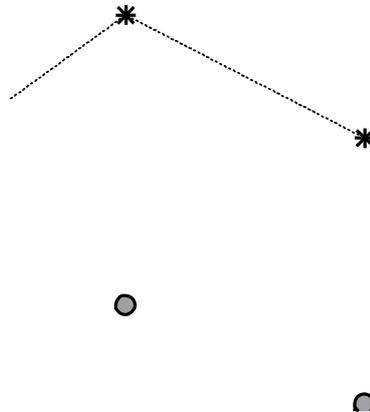
Figura 6.4: Imágenes de fluorescencia de células Vero (a) y J-774 (b) tras 15 min de incubación en oscuridad con LUD marcados con HPTS/DPX. Microscopías confocales de fluorescencia de Vero (c y d) y J-774 (e y f) tras 45 min en oscuridad con LUD-ZnPcMet marcados con HPTS/DPX mostrando la distribución de la ftalocianina en rojo (c y e) y del HPTS en verde (d y f), a una profundidad de 5 μ m en el eje z. Células Vero (g) y J-774 (h) tras 45 min de incubación en oscuridad seguidas de 30 min de irradiación. (i) Liberación de HPTS en el citoplasma de células J-774 por medio de liposomas pH-sensibles. Las flechas indican fluorescencia vesicular

6.3.3 Actividad anti-promastigote

La actividad anti-promastigote se determinó por conteo de parásitos vivos en cámara de Neubauer al cabo de 24 o 48 hs. En primer lugar, se observó que LUD vacíos presentaron actividad anti-promastigote moderada, ya que tan solo 30 min de incubación fueron suficientes para disminuir 7 y 65 veces la cantidad de parásitos presentes en el cultivo al cabo de 24 y 48 hs, respectivamente.

Por otro lado, los LUD-ZnPc incubados sobre un cultivo mantenido en oscuridad tuvieron un efecto similar al de los LUD, disminuyendo 3,8 y 111,4 veces la cantidad de parásitos a las 24 y 48 hs respectivamente. Finalmente, el mayor efecto anti-promastigote se registró cuando la incubación con LUD-ZnPc fue seguida de 15 minutos de irradiación solar, con una caída drástica en la cantidad de promastigotes hallándose 100 veces menos promastigotes que el control, y 390 veces menos tras 24 hs 48 hs de incubación (Figura 6.5)

---*--- Promastigotes control ---●--- LUD-ZnPc (oscuridad)
---●--- LUD ---⊙--- LUD-ZnPc (irradiado)



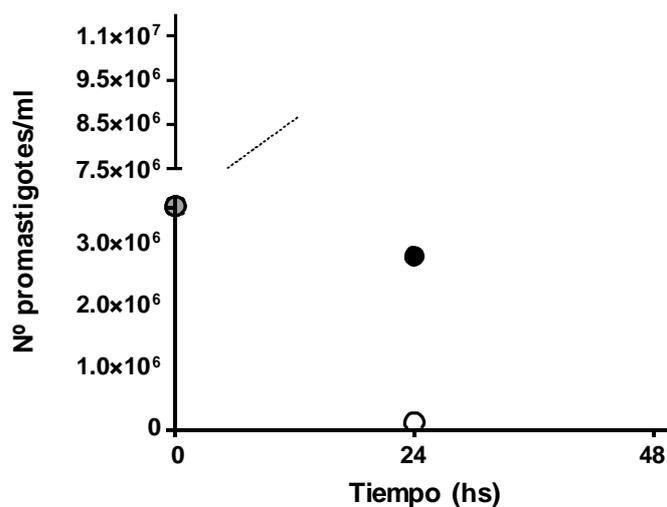


Figura 6.5. Conteo de promastigotes en cámara de Neubauer luego de la incubación con LUD y LUD-ZnPc mantenidos en oscuridad o expuestos a 15 min de radiación solar

En suma, todos los tratamientos produjeron toxicidad sobre los promastigotes dentro de las primeras 24 hs, siendo este efecto más notorio en los LUD-ZnPc expuestos a la luz, donde se eliminaron más del 99% de los parásitos (figura 6.6); a las 48 hs los tres tratamientos presentaron una actividad anti-promastigote cercana al 100% (figura 6.6).

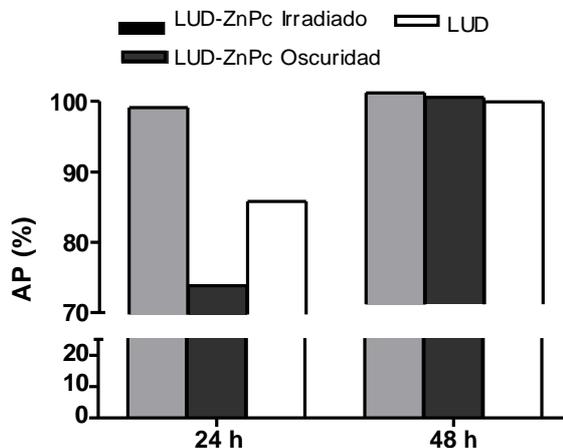


Figura 6.6 Actividad anti-promastigote (% AP) luego de incubación con LUD y LUD-ZnPc mantenidos en oscuridad o expuestos a 15 min de radiación solar

A partir del hallazgo de actividad anti-promastigote de LUD vacíos luego de tan solo 30 min de incubación, surgieron una serie de interrogantes, por ejemplo si el efecto observado se debía a la presencia de colato de sodio en LUD, y cuan velozmente se desencadenaba dicha actividad. Por dichos motivos, seguidamente se determinó el efecto de 5 min de incubación con LUD y con liposomas convencionales (sin colato de sodio)

sobre promastigotes. Al observar los parásitos tras los 5 min de incubación se hallaron promastigotes que no estaban quietos pero cuya motilidad ocurría aproximadamente a un décimo de la velocidad de los controles sin tratamiento. De modo que se utilizó una clasificación basada en la motilidad: “-“ (ausencia total de motilidad); “+” (muy poca motilidad) y “++” (alta motilidad similar al control).

Los resultados mostraron que en los cultivos incubados con liposomas convencionales (en concentraciones de fosfolípidos de 0,13 mg/ml y 1,29 mg/ml), un 17% y un 29% de parásitos respectivamente estaban completamente inmóviles, mientras que los parásitos restantes en ambos cultivos presentaban alta motilidad. Remarcablemente, los cultivos incubados con LUD en las mismas concentraciones lipídicas, presentaron ambos un 90% de parásitos totalmente inmóviles, mientras que el 10% restante presentó motilidad alta en el cultivo incubado con la menor concentración, y muy poca motilidad en el incubado con la mayor.

Concentración de fosfolípidos (mg/ml)	LUD		Liposomas convencionales	
	Parásitos móviles (%)	Motilidad	Parásitos móviles (%)	Motilidad
1,29	10	+	71	++
0,13	10	++	83	++

6.3.4. Captura de LUD por promastigotes

De acuerdo a los resultados obtenidos hasta el momento, el paso siguiente fue determinar si los promastigotes eran capaces de capturar LUD. Para verificar si había captura activa por parte del parásito o solo adsorción superficial, se realizó el experimento a 25°C (temperatura óptima de crecimiento del parásito) y a 4°C (temperatura a la cual los procesos activos se hallan disminuidos).

Las imágenes de microscopía confocal obtenidas tras la incubación de promastigotes de *L. braziliensis* con LUD-ZnPc (figura 6.7) revelaron la presencia de la ftalocianina dentro de los parásitos. La intensidad de fluorescencia tras la incubación a 25 °C fue mayor que la observada en la muestra incubada a 4 °C, lo que indicaría una captura activa de LUD-ZnPc por las leishmanias. Se superpuso una imagen de transmisión para mejor reconocimiento de la morfología de los parásitos



Figura 6.7: Microscopía confocal de fluorescencia (600x) de promastigotes de *L.braziliensis* incubados con LUD-ZnPc a 4 y 25 °C respectivamente. En rojo se aprecia la fluorescencia debida a ZnPC

Por su parte, para estudiar la integridad de los LUD tras la captura, se llevo a cabo un ensayo con doble marca liposomal (Rodamina-PE en la bicapa lipídica y HPTS en interior acuoso). Las microscopías ópticas de fluorescencia (figura 6.8) permitieron observar una distribución de las marcas dentro de los parásitos en el espacio cercano a su membrana plasmática, verificándose la co-localización de ambas sondas fluorescentes (rojo = rodamina; verde = HPTS)

Las microscopías confocales (figura 6.9) permitieron una apreciación más detallada de esta presencia de ambas marcas en el interior de las leishmanias, exhibiendo co-localización.

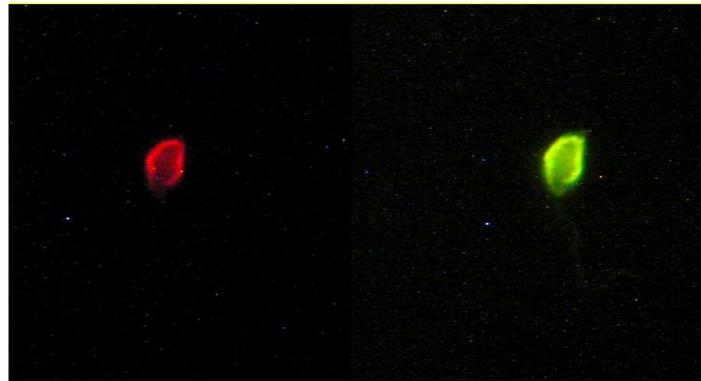


Figura 6.8: Imagen de microscopia de fluorescencia (512 nm HPTS-verde; 590 nm Rodamina-PE-rojo) de promastigotes de *L. braziliensis* incubados con LUD-HPTS/Ro-PE (1000x)

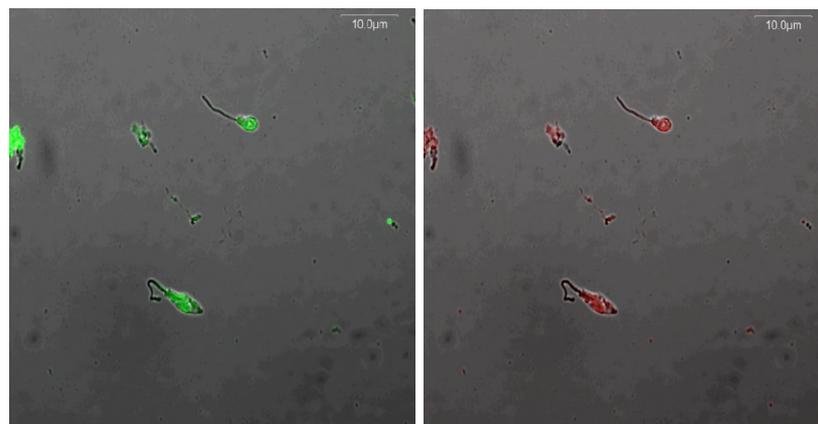


Figura 6.9: Imagen de microscopía confocal de fluorescencia (512 nm HPTS-verde; 590 nm Rodamina-PE-rojo) de promastigotes de de *L. braziliensis* incubados con LUD-HPTS/Ro-PE

6.3.5. Actividad anti-amastigote intracelular

La figura 6.10 muestra la actividad anti-amastigote intracelulares crecidos en macrofagos RAW de ZnPc libre o incorporada en LUD cuando fueran incubadas en conjunto con los promastigotes extracelulares por diferentes tiempos. En primer lugar se observa que LUD vacíos no tuvieron efecto anti-amastigote. Por otro lado, tanto ZnPc libre como LUD-ZnPc presentaron actividad anti-amastigote y dichas actividades aumentaron al aumentar el tiempo de incubación de 2 a 24 hs. Si bien ZnPc libre fue solo activa tras la irradiación (35% y 20% tras 2 y 24 hs, respectivamente) cuando incorporada en LUD no se hallaron diferencias entre la AA de células irradiadas y las mantenidas en oscuridad (40 y 80% tras 2 y 24hs, respectivamente). Aunque en para ambos tiempos de incubación la AA de LUD-ZnPc fue aproximadamente el doble de ZnPc libre.

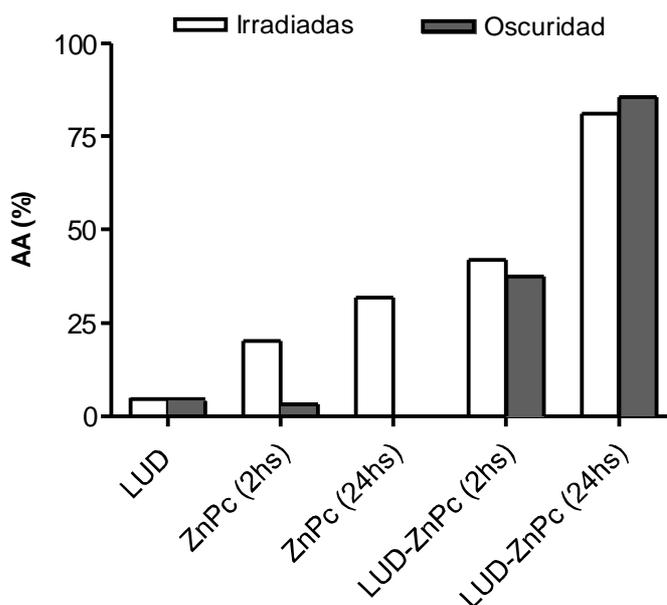


Figura 6.10: Actividad anti-amastigote (AA) en cultivos de la línea celular RAW infectada con *L. braziliensis*, luego 2 o 24 hs de incubación durante con LUD, ZnPc libre y LUD-ZnPc seguida de 15 min de exposición a la luz solar y posteriores 24 hs de crecimiento a 37 °C.

Finalmente, como se observa en la figura 6.11, la AA tras 2 hs de incubación tanto de ZnPc como de LUD-ZnPc sobre células previamente infectadas (22 hs de incubación con promastigotes) fue similar a la hallada cuando se incubaron por 2hs en conjunto con los promastigotes.

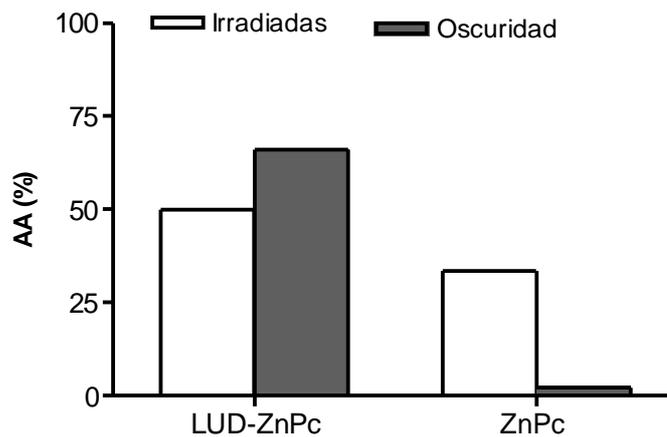


Figura 6.11: Actividad anti-amastigote en cultivos de la línea celular RAW previamente infectada por incubación de 22 hs con promastigotes de *L. braziliensis*, tras 2 hs de incubación con LUD-ZnPc y con ZnPc, seguida de 15 min de exposición a la luz solar y posterior crecimiento por 24 hs a 37 °C.

En esta prueba de concepto el esquema experimental se acotó al uso de la ftalocianina lipofílica, ZnPc, en base a los resultados del capítulo 5 que supusieron la retención de la misma en la matriz de LUD durante la penetración en piel.

6.4. Discusión

Las ventajas de la terapia fotodinámica en comparación con la quimioterapia antimicrobiana convencional son la ausencia de selección de cepas TFD resistentes incluso luego de tratamientos múltiples (Nitzan et al., 1994; Calzavara-Pinton et al., 2005) y el relativamente bajo costo de los FS que hacen a la TFD apta para ser implementada en sistemas sanitarios de bajos recursos (por ejemplo en los países en vías de desarrollo). Desde hace algunos años se sabe que los amastigotes de leishmania son sensibles a la TFD con derivados de ftalocianinas. Como fuera sugerido por Dutta (Dutta et al, 2005), tanto los promastigotes como los amastigotes axénicos de *L. amazonensis* fueron más sensibles que las células J-774 a la TFD con AlPhCl (cloruro de ftalocianina de aluminio), registrándose citólisis a bajas concentraciones (alrededor de 1 M) y dosis bajas de luz (1,5

J/cm²). Sin embargo, sólo se obtuvo actividad sobre amastigotes intracelulares cuando se utilizaron promastigotes previamente tratados con AIPhCl para infectar células J-774 pero no cuando se trataron con AIPhCl las células previamente infectadas. La incapacidad del FS de llegar los amastigotes intracelulares podría ser una posible causa de su limitada actividad.

Por ello, la estrategia de entrega de un PA en un tratamiento contra leishmaniasis debe tener en cuenta el entorno complejo impuesto por las barreras tridimensionales, como la membrana celular de las células infectadas, la membrana de la vacuola del amastigote y la membrana del amastigote. La distribución intracelular adecuada es clave para ejercer actividad fotodinámica ya que dentro de las células, se requiere la co-localización o confinamiento del FS y el blanco terapéutico en un pequeño volumen, debido a la vida media muy corta (<0,1 ms) y al corto radio de acción (10-20 nm) del oxígeno singlete (Moan y Berg, 1991). Comparándose con los abundantes estudios sobre los efectos intracelulares causados por FS libres, hay menos información sobre el efecto de FS liposomales, y menos aún inclusive sobre FS incorporados a LUD (posteriores a la publicación original de nuestros trabajos en 2007) (Montanari et al., 2007). En este marco, la primera parte de este estudio *in vitro* comenzó con la determinación del tráfico intracelular y continuó con la evaluación de efectos tóxicos sobre cultivos celulares de mamífero. En la segunda parte se determinaron las toxicidades sobre cultivos de promastigotes y sobre amastigotes intracelulares.

Tránsito intracelular

Dado que los liposomas son capturados por mecanismos fagocíticos-endocíticos, para luego seguir complejos tráficos intracelulares, el tráfico vesicular de LUD-ZnPc, revelado por la incorporación del par fluoróforo/apagador (HPTS/DPX) fue monitoreado antes y después de la irradiación. Los amastigotes infectan células fagocíticas (macrófagos cutáneos y células de Langerhans). Por ello se siguió el tráfico de LUD- ZnPc y LUD-ZnPcMet en macrófagos murinos J-774. Los diferentes patrones de fluorescencia de LUD-HPTS/DPX antes de la irradiación fueron reflejo de las diferentes actividades metabólicas y velocidad de captura de material particulado entre células J-774 y Vero. Mientras que las células J-774 se especializan en la captura y procesamiento rápido de material particulado (Hackam et al., 1998; Cox et al., 2000), las células Vero se especializan en la endocitosis de material soluble (Conner y Schmid, 2003). En oscuridad, las células J-774 capturaron más rápidamente y en mayor cantidad que las células Vero a los LUD, a juzgar por los patrones de fluorescencia de LUD-HPTS/DPX obtenidos a lo largo de 1 hora. Por otro lado, luego de irradiar con una densidad de energía de 15 J/cm² (correspondiente a la energía recibida en promedio por una exposición a la luz solar de 15 min al mediodía en la

latitud de Buenos Aires), no se hallaron cambios en la señal de HPTS sobre ninguna línea celular. La señal de HPTS correspondió a la propia del confinamiento de la sonda en vesículas ácidas, como podrían ser los endosomas o lisosomas, es decir, puntos pálidos de fluorescencia. Esta señal es muy diferente a la del brillo masivo en el citoplasma de una célula J-774 en la figura 6.4.i, producido luego de la captura de liposomas pH-sensibles cargados con HPTS y resultante de la liberación del HPTS al citoplasma de pH neutro (Morilla et al., 2005). El fenómeno conocido como internalización fotoquímica (Berg y Moan, 1994; Moan et al., 1994; Høgset et al., 2004) ocurre tras la irradiación de células conteniendo FS ubicados en las membranas de los endosomas, con liberación del FS y de moléculas no relacionadas (p.ej. proteínas o ácidos nucleicos) desde el interior de endosomas o lisosomas, al citoplasma. La internalización fotoquímica puede suceder sin inducir muerte celular (Berg y Moan, 1994). En nuestro caso, los FS no se hallaban en las membranas endosomales sino en el interior endosomal, asociados a los liposomas que ingresaron por fagocitosis o endocitosis. La internalización fotoquímica se ha registrado solamente para FS anfipáticos de baja agregación que se particionan en la membrana endosomal, con sus extremos hidrofílicos hacia el lumen endosomal (Prasmickaite et al., 2001). Así, la ausencia de internalización fotoquímica para ftalocianinas libres podría adscribirse a la solubilidad acuosa de la ZnPcMet y a la alta hidrofobicidad de la ZnPc. Adicionalmente, la ausencia de internalización fotoquímica de las ftalocianinas liposomales podría deberse a su localización intra-liposomal, tanto solubles en el contenido acuoso interno como particionadas en la bicapa.

Podría esperarse que la existencia intacta de la estructura endo-lisosomal – sugerida por la ausencia de internalización fotoquímica tras irradiación- permitiese que tanto los amastigotes de *Leishmania* como el fotosensibilizador permaneciesen confinados dentro del sistema endo-lisosomal, incrementando así el efecto tóxico sobre los parásitos. Aunque se requieren estudios posteriores *in vivo* para confirmar estos resultados *in vitro* para diseñar una herramienta estratégica capaz de cruzar barreras estructurales, estos primeros resultados permitirían proponer el uso de FS hidrofobicos incorporados a LUD como agentes tópicos potenciales para terapia fotodinámica contra etapas tempranas de LC.

Citotoxicidad general sobre células de origen mamífero

Ninguna ftalocianina libre hasta una concentración 10 M, ni LUD vacíos hasta 18 mM lípidos, tanto en oscuridad como luego de irradiación solar causaron citotoxicidad medida por el ensayo de MTT sobre las líneas celulares Vero y J-774. Ninguna ftalocianina liposomal fue tóxica sobre células Vero, ni siquiera luego de la irradiación. Únicamente el tratamiento con LUD-ZnPc a 10 M (correspondiente a 8mM lípidos), independientemente de la irradiación, redujo la viabilidad de las células J-774 en un 25 %. Esto indicó que la citotoxicidad determinada por MTT fue dependiente de la línea celular y de la concentración

de LUD-ZnPc, y que no fue causada por la matriz lipídica vacía ni por las ftalocianinas aisladas, sino por su combinación en LUD-ZnPc. La misma estuvo presente independientemente de la irradiación y por lo tanto puede atribuirse a una toxicidad química (y no fotoquímica) inducida por LUD-ZnPc luego de su internalización.

Toxicidad particular debida a ftalocianinas sobre células de origen mamífero

La medición de GSH como indicador de estrés oxidativo tuvo por objeto elucidar si la toxicidad determinada por MTT respondía a efectos atribuibles a la generación de oxígeno singlete por parte de LUD-ZnPc. Los resultados mostraron que 10 μ M LUD-ZnPc, responsable del 75 % reducción de viabilidad en células J-774 por MTT, también causo un alto estrés oxidativo, pero únicamente después de recibir irradiación. Este ensayo puso en evidencia que si bien se genera estrés oxidativo luego de la irradiación, el mismo quedaría enmascarado por la citotoxicidad química de LUD-ZnPc. La disminución de viabilidad observada por MTT no estaría directamente relacionada con el estrés oxidativo observado en este ensayo.

Toxicidad particular debida a LUD sobre células de origen mamífero

La existencia de citotoxicidad debida a disrupción de la membrana celular, evidenciada mediante la determinación de liberación de la enzima LDH citosólica, se llevo a cabo en razón de la presencia de un 30 % en mol de tensioactivo colato de sodio de la matriz LUD. El ensayo se llevo a cabo tanto sobre Vero como sobre J774 con LUD vacíos a 1,8 y 10 mM fosfolípidos, hallándose una importante citotoxicidad de LUD a 10 mM sobre J774., que no había sido detectada por MTT (que mostró ausencia de citotoxicidad hasta 18 mM LUD). Se determinó que el tratamiento control empleado de liposomas convencionales sin colato de sodio a la misma concentración no reveló citotoxicidad por LDH. La susceptibilidad de las células J774, a juzgar por la citotoxicidad medida por liberación de LDH frente a la ausencia de efecto sobre células Vero, indicó que la fagocitosis, probablemente por operar muy velozmente ingresando mayor cantidad de material tensioactivo /célula que en la endocitosis, sería el mecanismo responsable del efecto tóxico.

En su conjunto, estos ensayos indicaron que existen diferentes procesos responsables de la citotoxicidad que no pueden ser registrados mediante un único método. MTT mostró la citotoxicidad global de todos los agentes en función del daño de deshidrogenasa mitocondrial, en tanto que LDH mostró un daño más temprano, mediado por liberación de enzima citosólica, específicamente atribuible a la matriz LUD vacía. Por último, la depleción de GSH revelo un estrés oxidativo que en el ensayo de MTT quedaba enmascarado por la citotoxicidad química de LUD-ZnPc. No puede descartarse que la citotoxicidad medida por LDH no muestre un daño basal latente que *in vivo* culminaría en daños mayores, tal vez horas más tarde. En términos generales, las dosis de irradiación ensayadas no causaron un

daño importante sobre células de mamíferos.

Toxicidad sobre parásitos de *L.braziliensis*

Con los datos de internalización y citotoxicidad en mano, se llevo a cabo una prueba de concepto de la actividad de LUD-ZnPc sobre promastigotes y amastigotes de *L. braziliensis*. Nuestros resultados habían indicado que LUD-ZnPc eran capturados por células fagocíticas, y que luego de la internalización, tras 15 min de irradiación solar los compartimientos fago/lisosomales permanecían intactos. En el caso de los amastigotes, la ausencia de citotoxicidad para las células hospedadoras, a concentraciones menores de 10 mM LUD-ZnPc, luego de la irradiación así como la generación de una cierta cantidad de estrés oxidativo permitió vislumbrar que los LUD-ZnPc podrían ser herramientas terapéuticas capaces de causar efecto leishmanicida sobre alguna de las formas parasitarias.

Primeramente, se determino el efecto de LUD sobre promastigotes. Luego, el efecto de LUD-ZnPc sobre promastigotes tanto en oscuridad como ante irradiación con luz solar. Finalmente, se determino el efecto este último tratamiento sobre amastigotes en células de mamífero.

Los promastigotes normalmente tienen un movimiento constante y muy rápido del flagelo, mientras que los parásitos muertos no se mueven. En este trabajo se halló que los LUD, al cabo de solamente 5 min de incubación a 25 °C, eran capaces de producir un importante descenso en la motilidad -y por ende la viabilidad (Papagiannaros et al., 2005)- aun frente a suspensiones liposomales diluidas. Remarcablemente, los liposomas convencionales no fueron capturados por los parásitos, ni tampoco se observo pérdida importante de motilidad. La pérdida de motilidad estaría asociada a la captura de LUD y probablemente el colato de sodio sería un componente clave responsable de la inmovilización y por ende de la actividad anti-promastigote.

Para estimar más detalladamente la relación entre toxicidad sobre promastigotes y la captura de LUD, se llevaron a cabo ensayos de captura de LUD-ZnPc o de LUD con doble marca fluorescentes. Notoriamente, al cabo de 15 min de incubación a 37 °C, ambas sondas fluorescentes se co-localizaron en el interior de los parásitos, lo que indicaría que las leishmanias fueron capaces de capturar material particulado, un evento que hasta el momento no ha sido descrito. El promastigote de *Leishmania* tiene un citoesqueleto de microtúbulos que se organiza rígidamente, formando una suerte de andamiaje por debajo de su membrana celular. La única zona disponible para el intercambio de material con el exterior al bolsillo flagelar, de aproximadamente 1 μm^2 de superficie. Probablemente, los LUD accederían por endocitosis mediada por este bolsillo flagelar, hacia el interior del promastigote. Papagiannaros et al., 2005, señala que liposomas de 200 nm (mayores a los del presente estudio) son únicamente capaces de

adsorberse a la superficie del parásito, dado que no sería posible endocitar material de 200 nm diámetro. En nuestro caso, hallamos que la intensidad de la fluorescencia de ambas sondas disminuía sustancialmente cuando la incubación se llevaba a cabo a 4°C. Esto nos permitió inferir que efectivamente ocurrió la captura de LUD mediante un proceso endocítico que únicamente opera a 37 °C, en tanto que a 4 °C, cuando la captura activa disminuye y únicamente median procesos adsortivos, no hay interacción relevante con el parásito. En suma, el efecto de inmovilización post internalización puede asociarse con el previamente observado para la citotoxicidad post internalización revelada por LDH sobre células J-774.

A continuación, se halló una importante actividad leishmanicida de LUD-ZnPc luego de 15 min de irradiación solar. Al cabo de 24 hs, los LUD-ZnPc causaron la muerte del 99 % de los parásitos. Este es uno de los primeros trabajos en demostrar actividad leishmanicida contra promastigotes gatillada por la luz del sol, y el primero en utilizar para tal fin un FS incorporado a LUD. Asimismo, se halló una actividad leishmanicida basal mediada por LUD-ZnPc en oscuridad y por LUD. En efecto, tanto LUD-ZnPc en oscuridad como LUD también produjeron importante toxicidad sobre los parásitos (73,9 y 85,89 % de actividad anti-promastigote respectivamente a las 24 hs y casi 100% a las 48 hs). Si bien nuevamente la toxicidad química de LUD-ZnPc, así como la de LUD se superpone con el efecto fotoquímico post irradiación, del mismo modo que se observó previamente con cultivos de J-774, esta vez los parásitos de leishmania han mostrado ser sustancialmente más susceptibles, a juzgar por la casi totalidad de su muerte únicamente luego de la irradiación, que las células de mamífero en cultivo.

La última determinación de actividad leishmanicida se llevó a cabo sobre amastigotes intracelulares en la línea celular RAW. Si bien la misma mostró una importante actividad anti-leishmánica de los LUD-ZnPc, dicha actividad no fue mediada por un efecto fotoquímico post-irradiación, ya que se halló la misma toxicidad tanto para los cultivos irradiados como sobre los que fueron incubados en oscuridad. Notoriamente sin embargo, la misma solo ocurrió para LUD-ZnPc y no para LUD ni ZnPc libre en oscuridad.

Asimismo, se observó que la toxicidad de LUD-ZnPc fue dependiente del tiempo de incubación (mínima para 2 hs de incubación y máxima para 24hs). La actividad de las incubaciones de 2 h en conjunto con los promastigotes correspondería a la actividad basal anti-amastigote. Es importante apreciar que en las incubaciones conjuntas de LUD-ZnPc y promastigotes, los parásitos estuvieron expuestos a los LUD-ZnPc desde el comienzo, cuando aún se hallaban como promastigotes libres infectivos. Dado que LUD-ZnPc y LUD habían mostrado previamente actividad leishmanicida sobre promastigotes libres, podría suponerse que parte del 80% de la actividad anti-amastigote resultante contuviera pues una contribución atribuible a promastigotes afectados por LUD/LUD-ZnPc antes de llegar a infectar a las células. Si este hubiera sido el caso, la infección real hubiera ocurrido con una

cantidad menor de parásitos libres infectivos. Sin embargo, los datos experimentales con que contamos al momento, no nos permiten elucidar si este ha sido o no el caso.

Si bien al momento no ha sido posible ajustar las condiciones de irradiación para demostrar el efecto tóxico de la luz solar sobre los amastigotes, debe destacarse en particular el siguiente resultado: en tanto la ZnPc libre produjo únicamente un 35 % de actividad anti-amastigote luego de la irradiación, LUD-ZnPc produjo un 80 %.

En conclusión, más allá de las modificaciones que requiera esta propuesta para poder revelar fehacientemente el efecto de la irradiación solar, estos resultados deben ser interpretados como una prueba conceptual que muestra la posibilidad de cambiar rotundamente un tráfico intracelular de una ftalocianina de modo de inducir toxicidad sobre un parásito intracelular como la Leishmania.

Nunca hasta el momento se había empleado exitosamente la luz del sol como fuente de energía para activar fotosensibilizadores incorporados a liposomas con el fin de eliminar parásitos de leishmania. Los trabajos publicados o en vías de publicación acerca de terapia fotodinámica (formulaciones libres) activada por luz natural para el tratamiento de la LC son contemporáneos con este trabajo. Estos resultados, además de originales, podrían generar un profundo avance en términos de terapéutica antiparasitaria eficaz y de fácil aplicación para una endemia que afecta tanto a América como a África y Europa mediterránea.

CAPÍTULO 7

CONCLUSIONES FINALES

Este trabajo comenzó con la propuesta de un tratamiento novedoso que pudiese combatir la leishmaniasis cutánea (LC) desde un enfoque nanomedicinal. Como en toda investigación, el estudio de las cuestiones que se plantearon a lo largo del camino principal llevó a diversos hallazgos cuyas aplicaciones extienden su utilidad más allá de la finalidad original del trabajo. En primer lugar, durante el capítulo introductorio, el análisis del estado del arte en cada uno de los campos del Conocimiento y de la Técnica que se combinaron en este trabajo, aportó una visión del problema a resolver y de las potencialidades de las tecnologías que se pretendían. Así, se puso en relevancia el aspecto de atraso y de poca disponibilidad de alternativas para el tratamiento de esta “enfermedad descuidada”, pése al creciente interés que suscitan las enfermedades emergentes y reemergentes. La preocupación respecto de ésta y otras enfermedades similares excede hoy día las áreas endémicas (entre las que se incluye parte de nuestro país) y se extiende a todo el Mundo, debido a la Globalización y sus consecuencias sobre los movimientos migratorios.

El tratamiento convencional para la LC no resulta completamente efectivo, y está acompañado de numerosos efectos colaterales que afectan la salud del paciente. Es costoso, de aplicación dolorosa y de una implementación tan ineficaz que lleva a altas tasas de abandono o directamente de un no comienzo del mismo. Se señaló asimismo la falta de consolidación hasta el momento de un tratamiento alternativo.

La Nanomedicina provee un reenfoque de los tratamientos en general, a niveles celulares, subcelulares y moleculares. Particularmente, los sistemas de entrega de drogas (SED) permiten el control de la farmacocinética y la biodistribución de drogas en el cuerpo, incluso a nivel subcelular. Dado que las enfermedades de etiología parasitaria involucran el establecimiento del organismo exógeno en el cuerpo, con un preciso mecanismo de ingreso celular y una adaptación al metabolismo del hospedador, existen numerosos eventos del ciclo infectivo que pueden ser el blanco de la acción nanomedicinal. Ante el desafío de la LC, dado que el parásito *Leishmania* se establece intracelularmente adaptándose al interior de una vacuola fagocítica en macrófagos cutáneos y de Langerhans, se buscó diseñar un SED que lograra el acceso a ese mismo tipo y compartimiento intracelular, portando un principio activo que produjese toxicidad sobre el patógeno.

La necesidad de acceso a la población celular de macrófagos cutáneos y de Langerhans de modo masivo y selectivo junto con la de evitar la vía endovenosa debido a la

practicidad que supondría el prescindir de personal especializado para la aplicación del tratamiento (cuyos pacientes frecuentemente viven alejados de centros sanitarios), llevó a la elección de la vía tópica. Para sortear el estrato córneo (SC) se eligieron liposomas ultradeformables (LUD), para aprovechar sus propiedades elásticas diferenciales que le permitirían atravesar el SC transportando el activo. Asimismo, la modalidad de captura y el tráfico intracelular es dependiente - entre otras cosas- del tamaño: en este caso se trabajó con liposomas de 100 nm que pueden ser fagocitados. La fagocitosis únicamente puede ser llevada a cabo x macrófagos y mediante este mecanismo el material capturado finaliza en el mismo compartimiento intracelular colonizado por el parásito (el fagolisosoma). Como principio activo se escogió una ftalocianina (PC) de zinc como fotosensibilizador para terapia fotodinámica.

En el capítulo 2, se trató acerca del diseño y caracterización de los LUD cargados con PC de zinc. Los LUD se prepararon por resuspensión en buffer de una película lipídica de fosfatidilcolina de soja (SPC) y colato de sodio (ColNa) 6:1 (p/p). La síntesis de la PC fue dirigida de modo tal de obtener dos variantes de la misma: una hidrofílica y una lipofílica. Ambas PC fueron incorporadas a los LUD durante su preparación, esperándose que la primera permaneciera soluble en el espacio acuoso interno de los LUD y la segunda se asociara a la bicapa lipídica que los limita.

Estas formulaciones de LUD-PC pudieron ser caracterizadas determinándose su relación ftalocianina/fosfolípido y eficiencia de encapsulación por cuantificaciones de fosfolípidos y ftalocianinas, tamaño por dispersión de luz dinámica, estabilidad coloidal por potencial zeta y control de tamaño a lo largo del tiempo, morfología por microscopía electrónica de transmisión, asociación de ftalocianinas a la bicapa lipídica por calorimetría diferencial de barrido, análisis espectroscópico, rendimiento cuántico de fluorescencia y de oxígeno singlete, ultradeformabilidad y retención de contenido acuoso. Se verificó así la obtención de sendas suspensiones liposomales unilamelares con PC lipofílica (LUD-ZnPC) o hidrofílica (LUD-ZnPcMet) incorporada, de 99.9 ± 1.2 y 112.7 ± 1.4 nm de diámetro respectivamente, con una distribución unimodal y un bajo índice de polidispersión, cuyas relaciones ftalocianina/fosfolípido fueron de 1.73 ± 0.53 y 0.95 ± 0.36 y sus eficiencias de encapsulación del 85.55 ± 14.92 y 53.06 ± 4.78 %, con potenciales zeta de -36.7 ± 3.8 y -26.3 ± 3.1 –ambos índices de una muy baja tendencia a la agregación-. Asimismo, la incorporación de la PC lipofílica provocó una fuerte caída en la entalpía de transición de fase de los LUD, siendo esta interacción un posible indicio de su ubicación en la membrana, mientras que la incorporación de la hidrofílica afectó mucho menos este parámetro, lo que indicaría su confinamiento al espacio acuoso interno.

Ambas preparaciones liposomales conteniendo PC se comportaron como ultradeformables, presentando el mismo módulo elástico que LUD vacíos, resultando éste 28 veces mayor que el obtenido para liposomas convencionales. Asimismo, se observó

una retención del contenido acuoso interno del 76% luego de extrusión a través de 2 filtros apilados de 50 nm de poro con una presión de 0,8 MPa, en comparación a sólo un 7,5% para liposomas convencionales. El análisis espectroscópico y de los rendimientos cuánticos sugirió la incorporación de las PC en los LUD en estado monomérico, además de confirmar que se retuvo su capacidad de generar oxígeno singlete una vez incorporadas a LUD cuando se incorporan a los liposomas.

Estos resultados constituyeron una primera línea de indicios de la potencialidad del SED elegido como vehículo de entrega de drogas fotoactivables por la vía tópica. Además, este trabajo fue pionero en la incorporación de fotosensibilizadores a liposomas ultradeformables.

En el capítulo 3 se desarrolló un modelo matemático que permite obtener por medio de unos pocos cálculos sencillos una aproximación al número de vesículas liposomales que se formarán como resultado de un proceso de formación de liposomas unilamelares, a partir de variables conocidas o fácilmente mensurables como el peso molar de los fosfolípidos constituyentes y el tamaño promedio de vesícula obtenida.

Se encontró una alta correlación entre los resultados de los cálculos teóricos y la cantidad real de liposomas unilamelares de fosfatidilcolina de soja cargados con una sonda fluorescente contados en una cámara de Neubauer, proveyendo así un método de predecir el número de vesículas integrantes de una suspensión liposomal de ese tipo, método mucho más simple y de exactitud similar o superior a otros previamente descritos.

Dado que la droga incorporada a un SED no se halla distribuida homogéneamente en el medio líquido en que se encuentran los LUD, el valor de su concentración no es un dato suficiente para describir adecuadamente el sistema droga-suspensión. El modelo obtenido permitiría complementar la interpretación de ensayos liposomales *in vitro*, aportando el número de liposomas que se ponen en juego, y no solamente la cantidad de droga por unidad de volumen de suspensión contenida en conjunto por ellas.

Asimismo, se observó que pequeños cambios en el tamaño promedio de los liposomas inciden en cambios altos de la cantidad de liposomas formados, lo cual abriría la puerta a reinterpretar situaciones de estudios *in vitro* aparentemente similares donde en realidad se habrían expuesto cultivos celulares a cantidades sustancialmente diferentes de liposomas.

En el capítulo 4, con objeto de estudiar el efecto de diferentes métodos de deshidratación en presencia de azúcares aplicados a LUD para su preservación por largo plazo, se observó que la reconstitución únicamente fue exitosa para el secado al vacío en presencia de 20% (p/v) de sacarosa.

Se observó en primer término que la liofilización en presencia de sacarosa 10% (p/v) –método de secado usual para la preservación exitosa de formulaciones convencionales– fracasaba cuando se querían someter a LUD al mismo proceso ya que ocurría agregación

al reconstituir la suspensión. En base a esa observación, se diseñó una serie de ensayos para combinar tres métodos de secado distintos sobre LUD y liposomas convencionales: liofilización, secado al vacío, y secado por "speed-vac", bajo tres concentraciones de sacarosa como protector: 0, 10 y 20 % (p/v). El agua removida de las suspensiones por la liofilización, secado por "speed-vac", y secado al vacío, fue respectivamente el 99,39, 96,22 y 94,27%, rindiendo muestras de 0,05, 0,14 y 0,22 gramos de agua residual por gramo de peso seco, también respectivamente.

La turbidez (como índice de la lamelaridad), el tamaño y su índice de polidispersión, la retención de contenido acuoso, y la ultradeformabilidad de los liposomas fueron ensayadas antes y después de los eventos de secado seguido de reconstitución, considerándose una reconstitución exitosa en el caso de obtener valores similares en estos ensayos antes y después del proceso. Tras liofilización, mientras que liposomas convencionales en 10 % (p/v) de sacarosa pudieron ser reconstituidos exitosamente, los LUD en igual condición de preservante se agregaron inmediatamente al reconstituirse. Ello también ocurrió para LUD en sacarosa al 20% (p/v). Tras el secado por "speed-vac", los liposomas convencionales en 10 y 20 % (p/v) de sacarosa fueron reconstituidos exitosamente, mientras que los LUD secados en iguales condiciones presentaron tras rehidratación un incremento en su turbidez, tamaño y polidispersión. Para los secados al vacío, se observó una reconstitución exitosa para los liposomas convencionales en 10 y 20 % (p/v) de sacarosa según las medidas de turbidez y tamaño. Los LUD en 10% (p/v) de sacarosa sufrieron un aumento de turbidez, tamaño y polidispersión, pero finalmente los LUD secados al vacío en 20 % (p/v) de sacarosa rindieron tras reconstitución una suspensión translúcida con parámetros similares a los iniciales.

Debido a trabajos previos que reportaban pérdida de contenido aún en ausencia de fusión durante eventos de secado/reconstitución, se determinó la pérdida de contenido acuoso tras dicho proceso, verificándose la retención de un 85 % de ftalocianina hidrofílica incorporada a LUDs secados al vacío en presencia de sacarosa 20 % (p/v), cuantificada espectroscópicamente.

Con el fin de elucidar las causas de los resultados observados, se estudiaron por calorimetría diferencial de barrido las transiciones de fase de suspensiones de LUD en sacarosa 20 % (p/v), secadas por los tres métodos propuestos. Muestras similares fueron analizadas por microscopía electrónica de barrido. Todos los perfiles termotrópicos presentaron dos transiciones de fase: una alrededor de -28 °C probablemente asociada con la transición de fase de los lípidos y otra alrededor de 2.5 °C por la fusión del agua residual. Estos resultados indicarían que las matrices de azúcares pudieron interactuar eficientemente con las cabezas de los fosfolípidos evitando la transición al estado de gel a lo largo del proceso de secado, que a su vez se reveló incompleto. Las microscopías de barrido evidenciaron la presencia de gran cantidad de vesículas esféricas intactas sobre la

matriz de azúcares en el caso de los LUD secados al vacío. Algunas pocas estructuras esféricas intactas también pudieron verse en la muestra secada por “speed-vac”, mientras que en las muestras liofilizadas el campo estaba dominado por sacarosa amorfa, sin presencia de vesículas.

Finalmente, se realizaron estudios por FTIR, obteniéndose espectros de reflectancia total atenuada y de transmisión, que fueron deconvolucionados y ajustados a curvas gaussianas o lorentzianas. Se estudió la sub-banda de asociación de agua a ColNa, de 2000 a 2400 cm^{-1} , el estiramiento vibracional de OH de 3600 a 3000 cm^{-1} , y el estiramiento asimétrico de carbonilos (CO) en 1740 cm^{-1} y 1728 cm^{-1} .

El espectro de transmisión de LUD secados al vacío en 0, 10 y 20 % (p/v) de sacarosa reveló la presencia de una sub-banda en 2025 cm^{-1} , reportada como debida a asociación de agua con el ColNa inserto en la matriz lipídica. Esta sub-banda fue también detectada en los espectros de LUD secados al 20% (p/v) de sacarosa por “speed-vac” y por liofilización, pero estuvo ausente en los espectros de liposomas convencionales y liposomas convencionales con ColNa agregado externamente, ambos secados al vacío en 20 % (p/v) de sacarosa. Ello significaría que el estrés de secado producido por el secado al vacío de LUD en 20% (p/v) de sacarosa no incrementó la inestabilidad de la bicapa producida por la presencia del ColNa, y a su vez que el ColNa permaneció unido a la membrana durante el proceso.

En segundo lugar, los espectros de FTIR permitieron evaluar el grado de deshidratación de la matriz de azúcar tras el secado al vacío. Los UDL y liposomas convencionales secados al vacío en 20% (p/v) de sacarosa presentaron un pico correspondiente al estiramiento de OH de la matriz de azúcar en 3288 cm^{-1} . El corrimiento respecto del valor normal de ese pico (3370 cm^{-1}) significó la existencia de interacciones por puente de hidrógeno entre azúcar y agua, lo que indicaría una deshidratación incompleta y probablemente un estado gomoso de la matriz sacárida.

En tercer lugar, se estudió la relación de áreas –proporcionales a la cantidad de cada confórmero- de las dos contribuciones a la banda de estiramiento asimétrico de CO correspondientes a los CO unidos por puentes de hidrógeno (1728 cm^{-1}) y CO libres (1740-1742 cm^{-1}). Se encontraron relaciones muy elevadas en todas las muestras secadas al vacío estudiadas: liposomas convencionales en 0 y 20 % (p/v) de sacarosa con colato de sodio agregado externamente, y LUD en 0 y 20 % (p/v) de sacarosa (relaciones de área de CO unido / CO libre de 2,63, 1,48, 2,20 y 1,93 respectivamente, con resultados similares para muestras secadas por “speed-vac”). Ello también estaría relacionado a un secado incompleto y una probable ausencia de estado vítreo, ya que la alta contribución de CO unido indicaría una cantidad apreciable de agua retenida en el sistema (de no ser así, las relaciones deberían haber tendido a 0,9).

En suma, se demostró que los LUD se comportaron de manera radicalmente diferente a los liposomas convencionales frente al secado, siendo dicha conducta fuertemente dependiente del método de secado y de la proporción azúcar/lípido empleada. Se observó asimismo que las matrices vítreas de sacarosa que anteriormente se creían suficiente protección para los liposomas, no lograban proteger a los LUD sometidos a la liofilización. También se encontró que ni el secado por "speed-vac" ni el secado al vacío produjeron matrices vítreas a temperatura ambiente, y que probablemente se habrían producido matrices gomosas. Estos estados gomosos en la matriz más viscosa (20 % p/v) protegieron efectivamente a los LUD secados al vacío. Probablemente el estrés de centrifugación presente en el secado por "speed-vac" habría impedido un éxito similar con este método. Las reconstituciones exitosas mantuvieron sus características intactas por 15 días almacenadas a 4 °C, pero debido a la presencia de una cantidad no despreciable de agua residual, se necesitarían estudios de almacenamiento a más largo plazo para conocer el período en que estas gomas logran preservar a las muestras en buenas condiciones.

Este es el primer reporte acerca de la imposibilidad de secar y reconstituir exitosamente LUD por el método habitualmente usado en liposomas, a la vez que provee un método alternativo que consigue ese objetivo.

En el capítulo 5 se estudió la capacidad de penetración de los LUD en el SC de explantos de piel humana. Se utilizó el Modelo de Penetración de Saarbrücken (MPS) con una modificación *ad-hoc* para realizar ensayos no oclusivos, dejando descubiertos los explantos para permitir la evaporación del agua de las suspensiones ensayadas. Las mismas fueron aplicadas a razón de 0,12 mg de lípidos/cm² piel, e incubadas a 35 °C por espacio de 1 o 5 hs a partir de verificarse sequedad en su superficie. El análisis de la penetración tras cumplirse los tiempos de incubación se realizó por remoción de las capas del SC (*tape stripping*) seguido de extracción y cuantificación por fluorometría; fluoromicrografía de cortes transversales en microscopio confocal de fluorescencia y seccionamiento óptico en microscopio confocal de fluorescencia

En primer lugar, se registró una mayor cantidad de la sonda hidrofílica (HPTS) incorporada en LUD respecto de la incorporada en liposomas convencionales en cada porción de SC removido en el *tape stripping*, tras 1 h de incubación, acumulándose a lo largo de las 20 cintas 6,8 veces más sonda fluorescente de LUD que de liposomas convencionales.

Los estudios de fluoromicrografía tras incubaciones de 1 h a 35 °C con liposomas con doble marca (Rodamina-PE en la matriz liposomal y HPTS en el espacio acuoso interno) mostraron que los liposomas convencionales no pudieron ingresar al SC, apareciendo sólo una débil marca de rodamina por fuera del estrato más superficial. Por el contrario, tras incubar con LUD se detectó la presencia de rodamina distribuida por todo el SC hasta una profundidad de 14m en promedio, y la presencia de HPTS llegando hasta

la epidermis viable, con una profundidad de 24 μ m en promedio. La presencia de la rodamina confinada al SC podría deberse a la finalización del gradiente de humedad que impulsa a los LUD hacia el interior, existiendo reportes de una acumulación de LUD hacia el final del SC en una primera instancia. Este destino diferente de la matriz y de su contenido acuoso no había sido reportado anteriormente, siendo éste el primer trabajo en emplear una doble marca fluorescente con esta finalidad. A su vez, esta deslocalización podría indicar la pérdida de contenido liposomal debida al estrés de la penetración a través de los nanocanales.

Posteriormente, se determinó la influencia del tiempo de incubación sobre la penetración de LUD-HPTS. No se hallaron diferencias significativas en la cantidad de sonda detectada en cada porción de SC así como en la suma total, luego de incubarse la suspensión durante 1 o 5 horas. La cuantificación de la fluorescencia en las imágenes obtenidas por seccionamiento óptico (desde la superficie hasta 60 μ m de profundidad) corroboró la ausencia de diferencias significativas en la penetración de la sonda fluorescente en las incubaciones de 1 y 5 horas. Asimismo, las imágenes obtenidas por este método que en el que la piel no es sometida al estrés de congelado y corte (criofractura), revelaron la distribución de la sonda a lo largo de una red tridimensional de nanocanales.

Posteriormente, también se estudió el destino de Quantum Dots (QD) incorporados a liposomas ultradeformables (LUD-QD). En primer lugar la suspensión de LUD-QD fue caracterizada respecto de su tamaño promedio por dispersión de luz dinámica, encontrándose un tamaño de 102 nm con una polidispersión de 0,128. Las imágenes de microscopía electrónica de transmisión revelaron la presencia de LUD-QD, pudiendo observarse QD incorporados a vesículas. Cuando se estudió la penetración de la suspensión de LUD-QD, la marca de los LUD-QD se encontró distribuida por todo el SC, mientras que la de los QD libres apareció tanto en el SC como en el resto de la epidermis viable. Este último dato coincide con observaciones de trabajos recientes que mostraron la penetración de QD libres en piel de cerdo, en contraposición a reportes anteriores que describían al SC como impermeable para los nanomateriales. Por otra parte, los LUD pese a su ultradeformabilidad no pudieron transportar a los QD hacia la epidermis, quedando confinados en el SC. La elevada relación entre radio hidrodinámico QD y radio liposomal (50 vs 100 nm) resultaría en un impedimento estérico a la penetración. Adicionalmente, éste sería el primer reporte de QD incorporados a LUD obtenidos por el método de rehidratación de película lipídica.

En suma, se verificó la capacidad diferencial de los LUD de penetrar en el SC, aunque se observó que durante el proceso podrían existir pérdidas de contenido interno acuoso, así como que la ultradeformabilidad puede no ser condición suficiente para asegurar el transporte de cualquier material incorporado a LUD a través del SC.

En el capítulo 6 finalmente se estudió la acción de LUD y LUD-ftalocianinas con células de mamífero (macrófagos y fibroblastos), promastigotes y amastigotes intracelulares de *Leishmania braziliensis* y la incidencia de la irradiación por exposición a la luz solar.

En primer lugar se estudió la citotoxicidad de LUD-ftalocianinas y de las ftalocianinas libres sobre cultivos celulares de fibroblastos (células Vero) y macrófagos (células J-774), en oscuridad y luego de 15 min de irradiación solar (15 J/cm^2 de densidad de energía), mediante la medición de actividad de enzimas mitocondriales (ensayo de MTT). La viabilidad de ambos tipos celulares no fue afectada por LUD vacíos. Similarmente, las células Vero no fueron afectadas por las ftalocianinas libres ni por las liposomales hasta una concentración de $10 \mu\text{M}$ (de ftalocianina) en la oscuridad o tras irradiación. Por otro lado, las células J-774 tampoco fueron afectadas por ftalocianinas libres; sin embargo, LUD-ZnPc en una concentración de ZnPc $10 \mu\text{M}$ redujeron la viabilidad al 25%, tanto en oscuridad como tras la irradiación.

La determinación del nivel de glutatión reducido confirmó que en la condición en que se registró citotoxicidad en células J-774, se produce un alto estrés oxidativo cuando el cultivo es expuesto a la luz, lo que indicaría que la generación de oxígeno singlete contribuyó a la toxicidad registrada en el ensayo de MTT.

Por otro lado, se determinó el grado de liberación de la enzima citosólica lactato deshidrogenada (LDH) con el objeto de evidenciar la existencia de citotoxicidad en oscuridad debida a disrupción de la membrana celular, en razón de la presencia de un 30 % en mol de tensioactivo colato de sodio de la matriz LUD. Los resultados mostraron la liberación de hasta un 80% de LDH en células J-774 expuestas a la concentración más alta de LUD ensayada.

En su conjunto, estos ensayos indicaron que existen diferentes procesos responsables de la citotoxicidad que no pueden ser registrados mediante un único método. MTT mostró la citotoxicidad global de todos los agentes en función del daño de deshidrogenasa mitocondrial, en tanto que LDH mostró un daño más temprano, mediado por liberación de enzima citosólica, específicamente atribuible a la matriz LUD vacía. Por último, la depleción de GSH reveló un estrés oxidativo que en el ensayo de MTT quedaba enmascarado por la citotoxicidad química de LUD-ZnPc. No puede descartarse que la citotoxicidad medida por LDH no muestre un daño basal latente que *in vivo* culminaría en daños mayores, tal vez horas más tarde. En términos generales, las dosis de irradiación ensayadas no causaron un daño importante sobre células de mamíferos.

La diferencia en la actividad metabólica intrínseca y la velocidad de captura de material particulado entre células J-774 y Vero pudo apreciarse a través de los patrones de fluorescencia del HPTS observados tras la captura de LUD-HPTS/DPX. En oscuridad, las células J-774 capturaron más rápidamente y en mayor cantidad que Vero los LUD. Luego de irradiar a las células con una densidad de energía de 15 J/cm^2 , se encontró que ninguna de las ftalocianinas -libre o liposomal- pudo inducir cambios intracelulares en la señal de HPTS en ambas líneas celulares, que permaneció confinado dentro de vesículas ácidas.

Podría esperarse que la existencia intacta de la estructura endo-lisosomal – sugerida por la ausencia de internalización fotoquímica tras irradiación- permitiese que tanto los amastigotes de *Leishmania* como el fotosensibilizador permaneciesen confinados dentro del sistema endo-lisosomal, incrementando así el efecto tóxico sobre los parásitos. Aunque se requieren estudios posteriores *in vivo* para confirmar estos resultados *in vitro* para diseñar una herramienta estratégica capaz de cruzar barreras estructurales, estos primeros resultados permitirían proponer el uso de fotosensibilizadores hidrofobitos incorporados a LUD como agentes tópicos potenciales para terapia fotodinámica contra etapas tempranas de LC.

Con los datos de internalización y citotoxicidad, se llevo a cabo una prueba de concepto de la actividad de LUD-ZnPc sobre promastigotes y amastigotes de *L. braziliensis*.

En este trabajo se halló que los LUD, al cabo de solamente 5 min de incubación a 25°C , eran capaces de producir un importante descenso en la motilidad -y por ende la viabilidad de promastigotes. Dicho efecto estaría mediado por la captura de estos liposomas ultradeformables, ya que se reveló la co-localizaron de ZnPc y HPTS incorporados en LUD en el interior de los parásitos, un evento que hasta el momento no ha sido descrito. Remarcablemente, los liposomas convencionales no fueron capturados por los parásitos, ni tampoco se observo pérdida importante de motilidad. La perdida de motilidad estaría asociada a la captura de LUD y probablemente el colato de sodio sería un componente clave responsable de la inmovilización y por ende de la actividad anti- promastigote.

Por otro lado, luego de tan solo 30 min de incubación y 15 min de irradiación solar, se halló una importante actividad leishmanicida de LUD-ZnPc (99 %). Asimismo, se halló una actividad leishmanicida basal mediada por LUD-ZnPc en oscuridad y por LUD. En efecto, tanto LUD-ZnPc en oscuridad como LUD también produjeron importante toxicidad sobre los parásitos (73,9 y 85,89 % de actividad anti-promastigote respectivamente a las 24 hs). Si bien nuevamente la toxicidad química de LUD-ZnPc, así como la de LUD se superpone con el efecto fotoquímico post-irradiación, del mismo modo que se observó previamente con cultivos de J-774, esta vez los parásitos de leishmania han mostrado ser sustancialmente más susceptibles, a juzgar por la casi totalidad de su muerte únicamente luego de la irradiación, que las células de mamífero en cultivo.

Esta fue la primera vez que se demostró una actividad leishmanicida contra los promastigotes gatillada por la luz del sol, a la vez que se comprobó la actividad leishmanicida basal contra promastigotes mediada por LUD y LUD-ZnPc en oscuridad.

La última determinación de actividad leishmanicida se llevo a cabo sobre amastigotes intracelulares en macrófagos RAW. Si bien la misma mostró una importante actividad anti-leishmánica de los LUD-ZnPc, dicha actividad no fue mediada por un efecto fotoquímico post-irradiación, ya que se halló la misma toxicidad tanto para los cultivos irradiados como sobre los que fueron incubados en oscuridad. Notoriamente sin embargo, la misma solo ocurrió para LUD-ZnPc y no para LUD ni ZnPc libre y fue dependiente del tiempo de incubación (mínima para 2 hs de incubación y máxima para 24hs), llegando a un máximo de 80%.

En conclusión, más allá de los ajustes que requiera este experimento para poder demostrar fehacientemente el efecto de la luz, la prueba conceptual sirvió como primera muestra de la posibilidad de cambiar rotundamente un tráfico intracelular de una ftalocianina de modo de inducir toxicidad sobre un parásito intracelular como la Leishmania

Los resultados de estos experimentos de actividad anti-leishmanica involucrando la luz del sol, en conjunto con los demás hallazgos presentados en este trabajo, constituyen una novedad y podrían ser la base para la construcción de un camino hacia un tratamiento anti-leishmánico eficaz y de fácil aplicación, con una probable disminución de los efectos colaterales y un ámbito de aplicación regional y global de alto impacto.

REFERENCIAS

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

Abraham, W., Downing, D.T., 1990. Interaction between corneocytes and stratum corneum lipid liposomes in vitro. *Biochim. Biophys. Acta* 1021,119–125.

Aguiella, V., K. Kontturi, L. Murtomäki, and P. Ramírez. 1994. Estimation of the pore size and charge density in human cadaver skin. *J. Contr. Rel.* 32:249–257.

Akilov, O.E., Kosaka, S., O'Riordan, K., Hasan, T., 2007a. Parasiticidal effect of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis is indirect and mediated through the killing of the host cells. *Exp Dermatol.* (8), 651-60

Akilov, O.E., Kosaka, S., O'Riordan, K., Hasan, T., 2007b. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci.* 6(10),1067-75.

Alivisatos, P., 2004. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat Biotechnol.* 22, 47–52.

Allison, R.R., Mota, H.C., Bagnato, V.S., Sibata, C.H., 2008. Bio-nanotechnology and photodynamic therapy—State of the art review. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 5(1), 19-28

Almgren, M., 2000. Mixed micelles and other structures in the solubilization of bilayer lipid membranes by surfactants. *Biochim. Biophys. Acta* 1508,146–163.

Alvarez, R., Román, A., Naik, Y., Kalia, N., Fessi, H., Guy, R.H., 2004. Visualization of skin penetration using confocal laser scanning microscopy. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics.* 58(2)301-316.

Alving, C.R.; Steck, E.A.; Chapman, W.L.; Waits, V.B.; Hendricks, L.D.; Swartz, G.M.; Hanson, W.L., 1978. Therapy of leishmaniasis: superior efficacies of liposome-encapsulated drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 75, 2959-2963

Ampuero J. Leishmaniasis. Ministerio de Salud del Perú, INS, 2000; 39-50

Ashutosh, Sundar S., Goyal N., 2007. Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol.* 56(Pt 2):143-53

Asilian A., Davami M., 2006. Comparison between the efficacy of photodynamic therapy and topical paromomycin in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: a placebo-controlled, randomized clinical trial. *Clin Exp Dermatol.* 31(5),634-7.

Badaro R, Johnson WD., Jr. 1993. The role of interferon-gamma in the treatment of visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis. *J Infect Dis.* 167 Suppl 1:S13–S17

Barbosa-Barros, L., Barba, C., Rodríguez, G., Cócera, M., Coderch, L., López-Iglesias, C., de la Maza, A., López, O., 2009. Lipid Nanostructures: Self-Assembly and Effect on Skin Properties. *Mol Pharm.* En prensa.

Barolet, D., 2008. Light-Emitting Diodes (LEDs) in Dermatology. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery.* 27(4), 227-238

Barry, B.W., 2001. Novel mechanisms and devices to enable successful transdermal drug delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 14, 101–114.

Bashir, S.J., Chew, A.L., Anigbogu, A., Dreher, F., Maibach, H.I., 2001. Physical and physiological effects of stratum corneum tape stripping. *Skin Res Technol.* 7(1), 40-8.

Bedu-Addo, F.K., 2004. Understanding lyophilization formulation development. *Pharmaceut. Technol.* 28, 10–19.

Ben-Hur, E., Horowitz, B., 1995. Advances in Photochemical Approaches for Blood Sterilization. *Photochem. Photobiol.* 62, 383-388.

Ben-Hur, E., Rosenthal, I., 1985. The phthalocyanines: a new class of mammalian cells photosensitizers with a potential for cancer phototherapy. *Int. J. Radiat. Biol. Relat. Stud. Phys. Chem. Med.* 47, 145–147.

Berg, K., Moan, J., 1994. Lysosomes as photochemical targets. *Int. J. Cancer* 59, 814–822.

Berman J.D., 1996. Treatment of New World cutaneous and mucosal leishmaniasis. *Clin Dermatol.* 14(5):519-22

Berman, J.D., 1997. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. *Clin. Infect. Dis.*, 24, 684-703

Blank, I.H., Scheuplein, R.J., 1969. Transport into and within the skin. *Br. J. Dermatol.*, 4–10.

Blum, J., Desjeux, P., Schwartz, E., Beck, B., Hatz, C., 2004. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travelers. *J. Antimicrob. Chemother.* 53, 158–166.

Bötcher, C.J.F., Van Gent, C.M., Pries, C., 1961. A rapid and sensitive sub-micro phosphorus determination. *Anal. Chim. Acta* 24, 203–204.

Bothun, G.D., Rabideau, A.E., Stoner, M.A., 2009. Hepatoma cell uptake of cationic multifluorescent quantum dot liposomes. *J Phys Chem B.* 113(22), 7725-8.

Bristow, C.A., Hudson, R., Paget, T.A., Boyle, R.W., 2006. Potential of cationic porphyrins for photodynamic treatment of cutaneous Leishmaniasis. *Photodiagnosis and photodynamic therapy.* 3, 62-167.

Bruchez, M. Jr., Moronne, M., Gin, P., Weiss, S., Alivisatos, A.P., 1998. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science.* 281(5385), 2013–2016.

Buitink, J., Van Den Dries, I.J., Hoekstra, F.A., Alberda, M., Hemminga, M.A., 2000. High critical temperature above T(g) may contribute to the stability of biological systems. *Biophys. J.* 79, 1119–1128.

Byrne, C.J., Marshallsay, L.V., 1990. The Composition of Photofrin II. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 6, 13-27.

Cacela, C., Hinch, D.K., 2006. Low amounts of sucrose are sufficient to depress the phase transition temperature of dry phosphatidylcholine, but not for lyoprotection of liposomes. *Biophys. J.* 90, 2831–2842.

Calzavara-Pinton, P.G., Venturini, M., Sala, R., 2005. A comprehensive overview of photodynamic therapy in the treatment of superficial fungal infections of the skin. *J. Photochem. Photobiol. B* 78, 1–6.

Casas, A., Batlle, A., 2002. Rational design of 5-aminolevulinic acid derivatives aimed at improving photodynamic therapy. *Curr Med Chem Anticancer Agents.* 4, 465-75.

Cather, J.C., Cather, J.C., Abramovits, W., 2003. Investigational therapies for psoriasis. *J Am Acad Dermatol.* 49(2), 133-8.

Cevc G. 1995. Material transport across permeability barriers by means of lipid vesicles. In: *Handbook of Biological Physics*, Eds. R. Lipowsky and E. Sackmann, Vol. 1, Chapter 9, pp 465-490.

Cevc, G., 1996. Transfersomes, liposomes and other lipid suspensions on the skin: permeation enhancement, vesicle penetration, and transdermal drug delivery. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* 13, 257–388.

Cevc, G., 2004. Lipid vesicles and other colloids as drug carriers on the skin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56, 675–711.

Cevc, G., Blume, G., 1992. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim. Biophys. Acta* 1104, 226–232.

Cevc, G., Blume, G., 2001. New, highly efficient formulation of diclofenac for the topical, transdermal administration in ultradeformable drug carriers, transfersomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1514, 191–205.

Cevc, G., Blume, G., 2003. Biological activity and characteristics of triamcinolone-acetonide formulated with the self-regulating drug carriers, transfersomes. *Biochim. Biophys. Acta* 1614, 156–164.

Cevc, G., Blume, G., 2004. Hydrocortisone and dexamethasone in very deformable drug carriers have increased biological potency, prolonged effect, and reduced therapeutic dosage. *Biochim. Biophys. Acta* 1663, 61–73.

Cevc, G., Gebauer, D., 2003. Hydration-driven transport of deformable lipid vesicles through fine pores and the skin barrier. *Biophys. J.* 84, 1010–1024.

Cevc, G., Gebauer, D., Stieber, J., Schatzlein, A., Blume, G., 1998. Ultraflexible vesicles, transfersomes, have an extremely low pore penetration resistance and transport therapeutic amounts of insulin across the intact mammalian skin. *Biochim. Biophys. Acta* 1368, 201–215.

Cevc, G., Schätzlein, A., Gebauer, D., Blume, G., 1993. In: Bain, K.R., Hadgraft, J., James, W.J., Water, K.A. (Eds.), *Prediction of Percutaneous Penetration*, vol. 3b. STS Publishing, Cardiff, pp. 226–234.

Chamberlain, A.J., Kurwa, H.A., 2003. Photodynamic therapy: is it a valuable treatment option for actinic keratoses? *Am J Clin Dermatol.* 4(3),149-55.

Chan, W.C.W., Maxwell, D.J., Gao, X., Bailey, R.E., Han, M., Nie, S., 2002. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr Opin Biotechnol.* 13(1), 40–46.

Chartoff, R.P., 2008. Thermal analysis of polymers. In: *Characterization and Analysis of Polymers*. John Wiley & Sons, pp. 817–818.

Chatterjee, D.K., Fong, L.S., Zhang, Y., 2008. Nanoparticles in photodynamic therapy: An emerging paradigm. *Advanced Drug Delivery Reviews.* 60(15), 1627-163.

Chen, C.S, Yao, J., Durst, R.A., 2006. Liposome encapsulation of fluorescent nanoparticles: Quantum dots and silica nanoparticles. *Journal of Nanoparticle Research*, 8(6): 1033-1038

Chiantia, S., Giannola, L.I., Cordone, L., 2005. Lipid phase transition in saccharidecoated cholate-containing liposomes: coupling to the surrounding matrix. *Langmuir* 21, 4108–4116.

Coleman HR, Chan CC, Ferris FL 3rd, Chew EY.(2008) Age-related macular degeneration. *Lancet*. 372(9652):1835-45.

Conner, S.D., Schmid, S.L., 2003. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 422, 37–44.

Convit, J., Castellanos, P.L., Rondon, A., Pinaridi, M.E., Ulrich, M., Castes, M., Bloom, B., Garcia L., 1987. Immunotherapy versus chemotherapy in localised cutaneous leishmaniasis. *Lancet*. 1(8530):401-5

Cox, D., Lee, D.J., Dale, B.M., Calafat, J., Greenberg, S., 2000. A Rab11-containing rapidly recycling compartment in macrophages that promotes phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 680–685.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., 1988. Factors affecting the stability of dry liposomes. *Biochim. Biophys. Acta* 939, 327–334.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., 1993. Preservation of liposomes by freeze-drying. In: Gregoriadis, G. (Ed.), *Liposome Technology: Liposome Preparation and Related Techniques*. CRC Press, Boca Raton, FL.

Crowe, J.H., Crowe, L.M., Chapman, D., 1984. Preservation of membranes in anhydrobiotic organisms: the role of trehalose. *Science* 223, 701–703.

Crowe, J.H., Hoekstra, F.A., Crowe, L.M., 1989. Membrane phase transitions are responsible for imbibitional damage in dry pollen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 520–523.

Crowe, J.H., Leslie, S.B., Crowe, L.M., 1994. Is vitrification sufficient to preserve liposomes during freeze-drying? *Cryobiology* 31, 355–366.

- Dabbousi, B.O., RodriguezViejo, J., Mikulec, F.V., Heine, J.R., Mattoussi, H., Ober, R., 1997. (CdSe)ZnS core-shell quantum dots: synthesis and characterization of a size series of highly luminescent nanocrystallites. *J Phys Chem B*. 101(46), 9463–9475.
- Das, K., Dube, A., Gupta, P.K., 2005. A spectroscopy study of photobleaching of chlorin p6 in different environments. *Dyes Pigments*, 201–205.
- De Filippis, M.P., Fantetti, D.D., Roncucci, L., 2000. Synthesis of a new watersoluble octa-cationic phthalocyanine derivative for PDT. *Tetrahedron Lett.* 41, 9143–9147.
- De Gopugui MR, Ruiz R., 2003. Leishmaniasis: a re-emerging zoonosis. *Int J Dermatol* 37:801-14.
- Decreau, R., Richard, M.J., Verrando, P., Chanon, M., Julliard, M., 1999. Photodynamic activities of silicon phthalocyanines against achromic M6 melanoma cells and healthy human melanocytes and keratinocytes. *J. Photochem.Photobiol. B* 48, 48–56.
- Demicheli, C.; Ochoa, R.; Silva, J.B.B.; de Melo, A.L.; Falcão, C.A.M.; Rossi-Bergmann, B.; Sinisterra, R.D.; Frézard, F., 2004. Oral delivery of meglumine antimoniate-beta-cyclodextrin complex for treatment of leishmaniasis. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004, 48, 100-103.
- Derfus, A.M., Chan, W.C.W., Bhatia, S., 2004. Probing the cytotoxicity of semiconductor nanocrystals. *Nano Lett.* 4, 11–8.
- Docampo R., 1990. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemico-biological interactions* 73(1):1-27.
- Donovan, C. 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br. Med. J.* ii: 79.
- Dragicevic-Curic, N., Winter, S., Stupar, M., Milic, J., Krajišnik, D., Gitter, B., Fahr, A., 2009. Temoporphin-loaded liposomal gels: Viscoelastic properties and *in vitro* skin penetration. *International Journal of Pharmaceutics.* 373(1), 77-84.
- Dutta, S., Ray, D., Kolli, B.K., Chang, K.P., 2005. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis *in vitro*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49, 4474–4484.

Eisenberg, D.K.W., 1969. *The Structure and Properties of Water*. Oxford University Press, London.

El Maghraby, G.M., Williams, A.C., Barry, B.W., 2000. Oestradiol skin delivery from ultradeformable liposomes: refinement of surfactant concentration. *Int. J. Pharm.* 196, 63–74.

el-On J, Halevy S, Grunwald MH, Weinrauch L. Topical treatment of Old World cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania major*: a double-blind control study. *J Am Acad Dermatol* 1992;27:227-231

el-Shoura S.M., Sheikha A.K., Bahamdan K.A., Tallab T.M, Hassounah O.A. 1995. Visceral and cutaneous leishmaniasis comparative ultrastructure of host-parasite interactions. *J. Egypt. Soc. Parasitol.* 25 (83), 861-876.

Enk, C.D., Fritsch, C., Jonas, F., Nasereddin, A., Ingber, A., Jaffe, C.L., Ruzicka, T., 2003. Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. *Arch. Dermatol.* 139, 432–434.

Ephros M; Waldman E; Zilberstein D. **1997**. Pentostam induces resistance to antimony and the preservative chlorocresol in *Leishmania donovani* promastigotes and axenically grown amastigotes. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 1997;41(5):1064-8.

Epstein, H., Afergan, E., Moise, T., Richter, Y., Rudich, Y. y Golomb, G. (2006) Number concentration of nanoparticles in liposomal and polymeric multiparticulate preparations: empirical and calculation methods. *Biomaterials*, 27, 651-9.

Escobar, P., Hernández, I.P., Rueda, C.M., Martínez, F., Páez, E., 2006. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. *Biomedica.* 1, 49-56.

Escudero Villanueva, A., Guillén Barona, C., Nagore Enguídanos, E., Sevilla Linares, A., Sanmartín Jiménez, O., Botella Estrada, R., 2001. Topical photodynamic therapy in the management of actinic keratosis. *Revista Internacional de Dermatología y Dermocosmética Clínica.* 3, 190-194.

Essa, E.A., Bonner, M.C., Barry, B.W., 2002. Iontophoretic estradiol skin delivery and tritium exchange in ultradeformable liposomes. *Int. J. Pharm.* 240, 55–66.

Evans T, Reis M de F, de Alencar JE, Naidu TG, de Jesus JA, McAuliffe JF, Pearson RD.

American visceral leishmaniasis (kala-azar). *West J Med.* 1985 Jun;142(6):777–781.

Fang, J.Y., Hwang, T.L., Huang, Y.L., Fang, C.L., 2006. Enhancement of the transdermal delivery of catechins by liposomes incorporating anionic surfactants and ethanol. *Int. J. Pharm.* 310, 131–138.

Farah, F., Klaus N, Frankeburgs, et al., 1999. Infecciones por Protozoarios y Helminthos. En: Fitzpatrick T. *Dermatología en Medicina General.* Buenos Aires: Ed. Med. Panamericana. 3:2767-2777

Feng, L., Kong, X., Chao, K., Sun, Y., Zeng, Q., Zhang, Y., 2005. Efficient phase transfer of hydrophobic CdSe quantum dots : From nonpolar organic solvent to biocompatible water buffer . *Materials chemistry and physics* . vol. 93,(2-3), 310-313.

Fennema, O.R., 1996. *Food Chemistry.* Marcel-Dekker, Basel.

Fernandez, D.A., Dicelio, L.E., Awruch, J., 1995. Synthesis of two new N-alkyl substituted phthalocyanines. *J. Heterocycl. Chem.* 32, 519–522.

Fernandez, D.A.,Awruch, J., Dicelio, L.E., 1996. Photophysical and aggregation studies of t-butyl substituted Zn phthalocyanines. *Photochem. Photobiol.* 63, 784–792.

Fernández-Guarino, M., García-Morales, I., Harto, A., Montull, C., Pérez-García, B., Jaén P., 2007. Photodynamic therapy: new indications. *Actas Demosifiliogr.* 98(6), 377-95.

Ferreira, L.S., Ramaldes, G.A., Nunan, E.A., Ferreira, L.A., 2004. In vitro skin permeation and retention of paromomycin from liposomes for topical treatment of the cutaneous leishmaniasis. *Drug Dev Ind Pharm.* 30(3):289-96

Fesq, H., Lehmann, J., Kontny, A., Erdmann, I., Theiling, K., Rother, M., Ring, J., Cevc, G., Abeck, D., 2003. Improved risk-benefit ratio for topical triamcinolone acetonide in transfersome in comparison with equipotent cream and ointment: a randomized controlled trial. *Br. J. Dermatol.* 149, 611–619.

Fransen, G.J., Salemink, P.J.M., Crommelin, D.J.A., 1986. Critical parameters in freezing of liposomes. *Int. J. Pharm.* 33, 27–35.

Freitas, R.A. Jr., 1999. *Nanomedicine, Volume I: Basic Capabilities*, Landes Bioscience, Georgetown, TX

Frézard, F., Demicheli, C., Ribeiro, R.R., 2009. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules* 14(7), 2317-2336

Fry, D.W., White, J.C., Goldman, I.D., 1978. Rapid separation of low molecular weight solutes from liposomes without dilution. *Anal. Biochem.* 90, 809–815.

Galvão de Lima, R., Tedesco, A. C., Santana da Silva, R., Lawrence, M. J., 2008. P.102 Development of ultradeformable liposome entrapped with nitrosyl ruthenium complex for PDT application. *Nitric Oxide.* 19(1), 67.

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

Ghaffarifar, F., Jorjani, O., Mirshams, M., Miranbaygi, M.H., Hosseini, Z.K., 2006. Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J.* (6), 902-8.

Gilaberte, Y., Serra-Guillén, C., de las Heras, M.E., Ruiz-Rodríguez, R., Fernández-Lorente, M., Benvenuto-Andrade, C., González-Rodríguez, S., Guillén-Barona, C., 2006. Photodynamic therapy in dermatology. *Actas Dermosifiliogr.* 97(2), 83-102.

Gilbert, 2007. *Dermatologic Clinics. Photodynamic Therapy.* 25(1), 111-118.

Ginevra, F., Biffanti, S., Pagnan, A., Biolo, R., Reddi, E., Jori, G., 1990. Delivery of the Tumour Photosensitizer Zinc(II)-Phtalocyanine to Serum Proteins by Different Liposomes: Studies In Vitro and In Vivo. *Cancer Lett.* 49, 59-65

Giuffrida, S., Cottone, G., Cordone, L., 2006. Role of solvent on protein–matrix coupling in MbCO embedded in water–saccharide systems: a Fourier transform infrared spectroscopy study. *Biophys. J.* 91, 968–980.

Glavas-Dodov, M., Fredro-Kumbaradzi, E., Goracinova, K., Simonoska, M., Calis, S., Trajkovic-Jolevska, S., Hincal, A.A., 2005. The effects of lyophilization on the stability of liposomes containing 5-FU. *Int. J. Pharm.* 291, 79–86.

González, U., Pinart, M., Reveiz, L., Alvar, J., 2008. Interventions for Old World cutaneous leishmaniasis. *Cochrane Database Syst Rev.* 8(4):CD005067.

Grimaldi Jr G, Tesh RB, McMahon-Pratt D 1989. A review of the geographic distribution and epidemiology of *Leishmaniasis* in the New World. *Am J Trop Med Hyg* 41: 687-725

Hackam, D.J., Rotstein, O.D., Sjolín, C., Schreiber, A.D., Trimble, W.S., Grinstein, S., 1998. v-SNARE-dependent secretion is required for phagocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 11691–11696.

Hall LR, Titus RG., 1995 Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* 155:3501-6.

Hammarton, T.C., Mottram, J.C., Doerig, C., 2003. The cell cycle of parasitic protozoa: potential for chemotherapeutic exploitation. *Progress in Cell Cycle Research* (Meijer, L., Jézéquel, A., and Roberge, M., eds). 5, 91-101.

Handman, E., Noormohammadi, A.H., Curtis, J.M., Baldwin, T., Sjölander, A., 2000. Therapy of murine cutaneous leishmaniasis by DNA vaccination. *Vaccine.* 18(26):3011-7.

Hardman, R., 2006. A Toxicologic Review of Quantum Dots: Toxicity Depends on Physicochemical and Environmental Factors. *Environ Health Perspect.* 114,165–172.

Harrison SM, Barry BW, Dugard PH., 1984. Effects of freezing on human skin permeability. *J Pharm Pharmacol.*36(4):261-2

Hartmann, T., 1998. *The Last Hours of Ancient Sunlight*. London: Hodder and Stoughton. ISBN 0-340-82243-0.

Hausman, W., 1911. Die Sensibilisierende Wirkung des Hematoporphyrins. *Biochem. Z.* 30, 276.

Heimburg, T., Ryba, N.J., Wurz, U., Marsh, D., 1990. Phase transition from a gel to a fluid phase of cubic symmetry in dimyristoylphosphatidylcholine/ myristic acid (1:2, mol/mol) bilayers. *Biochim. Biophys. Acta* 1025, 77–81.

Henning A, Neumann D, Kostka KH, Lehr CM, Schaefer UF. 2008. Influence of human

skin specimens consisting of different skin layers on the result of in vitro permeation experiments. *Skin Pharmacol Physiol*. 2008;21(2):81-8

Henning, A., Schaefer, U.F., Neumann, D., 2009. Potential pitfalls in skin permeation experiments: Influence of experimental factors and subsequent data evaluation. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 72(2), 324-33.

Herr, H., Cho, H.J., Yu, S. 2007. Burns caused by accidental overdose of photochemotherapy (PUVA) *Burns*, 33 (3) 372-375

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999; 354 : 1191 -9

Herwaldt, B.L., Neva FA, Berman JD., 1992. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med*. 327(7):498-9

Hofer, C., Gobel, R., Deering, P., Lehmer, A., Breul, J., 1999. Formulation of interleukin-2 and interferon-alpha containing ultradeformable carriers for potential transdermal application. *Anticancer Res*. 19, 1505–1507.

Hofland, H.E., Bouwstra, J.A., Bodde, H.E., Spies, F., Junginger, H.E., 1995. Interactions between liposomes and human stratum corneum in vitro: freeze fracture electron microscopical visualization and small angle X-ray scattering studies. *Br. J. Dermatol*. 132, 853–866.

Høgset, A., Prasmickaite, L., Selbo, P.K., Hellum, M., Engesaeter, B.O., Bonsted, A., Berg, K., (2004). Photochemical internalisation in drug and gene delivery. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004 Jan 13;56(1):95-115.

Honeywell-Nguyen, P.L., Bouwstra, J.A., 2005. Vesicles as tool for transdermal and dermal delivery. *Drug Discovery Today: Technol*. 2, 67–74.

Honeywell-Nguyen, P.L., de Graaff, A.M., Groenink, H.W., Bouwstra, J.A., 2002. The in vivo and in vitro interactions of elastic and rigid vesicles with human skin. *Biochim Biophys Acta*. 1573(2), 130-40.

Honeywell-Nguyen, P.L., Gooris, G.S., Bouwstra, J.A., 2004. Quantitative assessment of the transport of elastic and rigid vesicle components and a model drug from these vesicle formulations into human skin in vivo. *J Invest Dermatol*. 123(5), 902-10.

Honeywell-Nguyen, P.L., Wouter Groenink, H.W., de Graaff, A.M., Bouwstra ,J.A., 2003. The in vivo transport of elastic vesicles into human skin: effects of occlusion, volume and duration of application. *J Control Release*. 90(2):243-55.

Hongcharu,W., Taylor, C.R., Chang, Y., Aghassi, D., Suthamjariya, K., Anderson, R.R., 2000. Topical ALA-photodynamic therapy for the treatment of acne vulgaris. J. Invest. Dermatol. 115, 183–192.

Huang, C. y Mason, J. T. (1978) Geometric packing constraints in egg phosphatidylcholine vesicles. Proc Natl Acad Sci U S A, 75, 308-10.

Israelachvili, J. N. y Mitchell, D. J. (1975) A model for the packing of lipids in bilayer membranes. Biochim Biophys Acta, 389, 13-19.

Israelachvili, J. N. (1977) Refinement of the fluid-mosaic model of membrane structure. Biochim Biophys Acta, 469, 221-5.

Israelachvili, J. N., Mitchell, D. J. y Ninham, B. W. (1977) Theory of self-assembly of lipid bilayers and vesicles. Biochim Biophys Acta, 470, 185-201.

Itoh,T., Takenawa, T., 2009. Mechanisms of Membrane Deformation by Lipid-Binding Domains. Prog Lipid Res. En prensa.

J.F. Rijcken, C., Hofman, J.W., van Zeeland, F., Hennink, W.E., van Nostrum, C.F., 2007. Photosensitizer-loaded biodegradable polymeric micelles: Preparation, characterisation and *in vitro* PDT efficacy. Journal of Controlled Release.124 (3), 144-153.

Jacobi U, Taube H, Schäfer UF, Sterry W, Lademann J. 2005. Comparison of four different *in vitro* systems to study the reservoir capacity of the stratum corneum. J Control Release. 2005 Mar 2;103(1):61-71.

Jain, M.P., Choi, A.O., Neibert, K.D., Maysinger D., 2009. Probing and preventing quantum dot-induced cytotoxicity with multimodal alpha-lipoic acid in multiple dimensions of the peripheral nervous system. Nanomed. 4(3), 277-90.

Janshoff, A. y Steinem, C. (2001) Scanning force microscopy of artificial membranes. Chembiochem, 2, 798-808.

Jeronimo SM, Oliveira RM, Mackay S, Costa RM, Sweet J, Nascimento ET, Luz KG, Fernandes MZ, Jernigan J, Pearson RD., 1994. An urban outbreak of visceral leishmaniasis in Natal, Brazil. Trans R Soc Trop Med Hyg. Jul-Aug; 88(4):386-8.

Jiménez-Banzo, A., Sagristà, M.L., Mora, M., Nonell, S., 2008. Kinetics of singlet oxygen photosensitization in human skin fibroblasts. Free Radic Biol Med. 44(11):1926-34.

Jui-Chen, T., Cappel, M.J., Weiner, N.D., Flynn, G.L., Ferry, J., 1991. Solvent effects on

the harvesting of stratum corneum from hairless mouse skin through adhesive tape stripping in vitro. *International Journal of Pharmaceutics*. 68(1), 127-133.

Juzenas, P., Chen, W., Sun, Y.P., Neto Coelho, M.A., Generalov, R., Generalova, N., Christensen, I.L., 2008. Quantum dots and nanoparticles for photodynamic and radiation therapies of cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews*. 60(15), 1600-1614.

Karrer, S., Szeimies, R.M., 2007. Photodynamic therapy: non-oncologic indications. *Hautarzt*. 58(7), 585-96.

Khatami, A., Firooz, A., Gorouhi, F., Dowlati, Y., 2007. Treatment of acute Old World cutaneous leishmaniasis: a systematic review of the randomized controlled trials. *J Am Acad Dermatol*. 57(2), 335.e1-29.

Klauda, J. B., Kucerka, N., Brooks, B. R., Pastor, R. W. y Nagle, J. F. (2006) Simulation-based methods for interpreting x-ray data from lipid bilayers. *Biophys J*, 90, 2796-807.

Klayshchitsky, B.A., Nechaeva, I.S., Ponomaryov, G.V.1994. Approaches to Targetted Photodynamic Tumor Therapy. *J. Controlled Release*. 29, 1-16.

Klein, A., Babilas, P., Karrer, S., Landthaler, M., Szeimies, R.M., 2008. Photodynamic therapy in dermatology--an update 2008. *J Dtsch Dermatol Ges*. 6(10):839-45, 839-46.

Kligman y Christophers (1963) Preparation of isolated sheets of human stratum corneum. *Arch. Dermatol*

Kolárová, H., Mosinger, J., Lenobel, R., Kejlová, K., Jírová, D., Strnad, M., 2003. In vitro toxicity testing of supramolecular sensitizers for photodynamic therapy. *Toxicol In Vitro*. 17(5), 775-8.

Konan, Y.N., Gurny, R., Allémann, E., 2002. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B*. 66(2):89-106.

Koo, O.M., Rubinstein, I., Onyuksel, H., 2005. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine*. 1(3):193-212.

Kraljic, I., El Mohsni, S., 1978. A new method for the detection of singlet oxygen in aqueous solutions. *Photochem. Photobiol*. 28, 577-581.

Krieg, R.C., Messmann, H., Schlottmann, K., Endlicher, E., Seeger, S., Scholmerich, J., Knuechel, R., 2003. Intracellular localization is a cofactor for the phototoxicity of protoporphyrin IX in the gastrointestinal tract: in vitro study. *Photochem. Photobiol*. 78,

393–399.

Kriwet, K., Christel C., Müller-Goymann, 1995. Diclofenac release from phospholipid drug systems and permeation through excised human stratum corneum. *International Journal of Pharmaceutics*. 125(2), 231-242.

Lagorio, M.G., Dixelio, L.E., San Román, E., 1993. Visible and near-IR spectroscopic and photochemical characterization of substituted metallophthalocyanines. *J. Photochem. Photobiol. A* 72, 153–161

Lainson R, Shaw J 1987. Evolution, classification and geographical distribution, p. 1-120 In W Peters y R Killick-Kendrick (eds) *The leishmaniasis in biology and medicine*, Vol. 1. *Biology and Epidemiology*. Academic Press, London

Lainson R, Shaw J, Silveira F, De Souza A, Braga R, Ishikawa E., 1994. The dermal leishmaniasis of Brazil, with special reference to the eco-epidemiology of the disease in Amazonia. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro. 89: 435-43

Lang, K., Lehmann, P., Bolsen, K., Ruzicka, T., Fritsch, C., 2001. Aminolevulinic acid: pharmacological profile and clinical indication. *Expert Opin. Investig. Drugs* 10, 1139–1156.

Leishman, W. B. 1903. On the possibility of the occurrence of trypanosomiasis in India. *Br. Med. J.* i: 1252-1254.

Lewis, D.J. y Ward, R.D. - Transmission and vectors. In: PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R., ed. *The leishmaniasis in biology and medicine*. London, Academic Press, 1987. v.1, p. 235-26

Liebmann JE, Hahn SM, Cook JA, Lipschultz C, Mitchell JB, Kaufman DC. 1993. Glutathione depletion by L-buthionine sulfoximine antagonizes taxol cytotoxicity. *Cancer Res* 1993; 53:2066-2070.

Lipson, R. L., Blades, E.J., Olson, A.M., 1961. The use of hematoporphyrin in tumour destruction. *J. Natl. Cancer Inst.* 26,1–11.

Liu, W., Jensen, T.J., Fronczek, F.R., Hammer, R.P., Smith, K.M., Vicente, M.G., 2005. Synthesis and cellular studies of nonaggregated water-soluble phthalocyanines. *J. Med. Chem.* 48, 1033–1041.

Liu, W., Lee, C., Chen, H., Mak, T.C.W., Ng, D.K.P., 2004. Synthesis, spectroscopic properties, and structure of tetrakis (24-dimethyl-3-pentyloxy)-phthalocyaninato metal

complexes. *Eur. J. Inorg. Chem.*, 286–292.

Lovric, J., Cho, S.J., Winnik, F.M., Maysinger, D., 2005. Unmodified cadmium telluride quantum dots induce reactive oxygen species formation leading to multiple organelle damage and cell death. *Chem Biol.* 12, 1227–34.

Luengo, J., Weiss, B., Schneider, M.; Ehlers, A., Stracke, F., König, K., Kostka, K-H., Lehr C-M., Schaefer, U. F., 2006. Influence of nanoencapsulation on human skin transport of flufenamic acid. *Skin pharmacology and physiology.* 19(4), 190-7.

MacCormack, M.A., 2008. Photodynamic therapy in dermatology: an update on applications and outcomes. *Semin Cutan Med Surg.* 27(1), 52-62.

Magaraggia, M., Visona, A., Furlan, A., Pagnan, A., Miotto, G., Tognon, G., Jori, G., 2006. Inactivation of vascular smooth muscle cells photosensitized by liposome-delivered Zn(II)-phthalocyanine. *J. Photochem. Photobiol. B* 82, 53–58.

Mahmoud, B.H., Hexsel, C.L., Hamzavi, I.H., 2008. Effects of visible light on the skin. *Lim HW.Photochem Photobiol.* 84(2), 450-62.

Makar, J.M., Chan, G.W., Esseghaier, K.Y., 2007. A peak in the hydration reaction at the end of the cement induction period. *J. Mater. Sci.* 42, 1388–1392.

Mang, T.S., 2008. Dosimetric concepts for PDT. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 5(3), 217-223.

Menon, G.K., 2002. New insights into skin structure: scratching the surface. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54, S3–S17.

Meyerhoff, A., 1999. U.S. Food and Drug Administration approval of AmBisome liposomal amphotericin B) for treatment of visceral leishmaniasis. *Clin. Infect. Dis.*, 28, 42-48.

Milla, L.N., Yslas, E.I., Cabral, A., Durantini, E.N., Romanini, S., Rivarola, V., Bertuzzi, M., 2009. Pharmacokinetic, toxicological and phototherapeutic studies of phthalocyanine ZnPcCF₃. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* (3), 209-215.

Minodier, P., Parola, P., 2007. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis.* 2007 May;5(3):150-8.

Mishra, D., Dubey, V., Asthana, A., Saraf, D.K., Jain, N.K., 2006. Elastic liposomes mediated transcutaneous immunization against Hepatitis B. *Vaccine.* 24(22), 4847-55.

Mitra, A., Stables G.I., 2006. Topical photodynamic therapy for non-cancerous skin conditions. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 3(2), 116-127.

Moan, J., 1990. On The Diffusion Length of Singlet Oxygen in Cells and Tissues. *J. Photochem. Photobiol. B. Biol.* 6, 343-347.

Moan, J., Berg, K., 1991. The photodegradation of porphyrins in cells can be used to estimate the lifetime of singlet oxygen. *Photochem. Photobiol.* 53, 549–553.

Moan, J., Berg, K., Anholt, H., Madslie, K., 1994. Sulfonated aluminium phthalocyanines as sensitizers for photochemotherapy. Effects of small light doses on localization, dye fluorescence and photosensitivity in V79 cells. *Int. J. Cancer* 58, 865–870.

Mohammed, A.R., Bramwell, V.W., Coombes, A.G., Perrie, Y., 2006. Lyophilisation and sterilisation of liposomal vaccines to produce stable and sterile products. *Methods* 40, 30–38.

Moll H., Flohe S. and Rollinghoff M. 1995. Dendritic cells in *Leishmania major*-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cells immune response. *Eur J. Immunol* 25 (3), 696-699

Montanari, J., Perez, A.P., Di Salvo, F., Diz, V., Barnadas, R., Dicelio, L., Doctorovich, F., Morilla, M.J., Romero, E.L., 2007. Photodynamic ultradeformable liposomes: design and characterization. *Int. J. Pharm.* 330, 183–194

Morgenthaler, J.B., Peters, S.J., Cedeño, D.L., Constantino, M.H., Edwards, K.A., Kamowski, E.M., Passini, J.C., Butkus, B.E., Young, A.M., Lash, T.D., Jones, M.A., 2008. Carbaporphyrin ketals as potential agents for a new photodynamic therapy treatment of leishmaniasis. *Bioorg Med Chem.* 16(14), 7033-8.

Morilla, M.J., Montanari, J., Frank, F., Malchiodi, E., Corral, R., Petray, P., Romero, E.L., 2005. Etanidazole in pH-sensitive liposomes: design, characterization and in vitro/in vivo anti-*Trypanosoma cruzi* activity. *J control Rel*, 103(3):599-607.

Moser, J.G., 1997. *Photodynamic Tumor Therapy: 2nd and 3rd Generation Photosensitizers.* Netherlands: Harwood Academic Publishers.

Munavalli, G.S., Weiss, R.A., 2008. Evidence for Laser- and Light-Based Treatment of Acne Vulgaris. *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery.* 27(3), 207-211

Namiki, Y., Namiki, T., Date, M., Yanagihara, K., Yashiro, M., Takahashi, H., 2004. Enhanced photodynamic antitumor effect on gastric cancer by a novel photosensitive stealth liposome. *Pharmacol. Res.* 50, 65–76.

Navin TR, Arana BA, Arana FE, de Mérida AM, Castillo AL, Pozuelos JL., 1990. Placebo-controlled clinical trial of meglumine antimonate (glucantime) vs. localized controlled heat in the treatment of cutaneous leishmaniasis in Guatemala. *Am J Trop Med Hyg.* 42(1):43-50

New RR, Chance ML., 1980. Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis by liposome-entrapped Pentostam. *Acta Trop*, 37: 253 -6

New, R.R.; Chance, M.L.; Thomas, S.C.; Peters, W., 1978. Antileishmanial activity of antimonials entrapped in liposomes. *Nature*, 272, 55-56.

Nitzan, Y., Wexler, H.M., Finegold, S.M., 1994. Inactivation of anaerobic bacteria by various photosensitized porphyrins or by hemin. *Curr. Microbiol.* 29, 125–131.

O’Riordan, K., Akilov, O.E., Hasan, T., 2005. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy.* 2, 247-262.

Oberdorster, G., Oberdorster, E., Oberdorster, J., 2005. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.* 113,823–39.

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

Oliveira, C.A., Machado, A.E., Pessine, F.B., 2005. Preparation of 100 nm diameter unilamellar vesicles containing zinc phthalocyanine and cholesterol for use in photodynamic therapy. *Chem. Phys. Lipids* 133, 69–78.

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

Panosian CB, Barza M, Szoka F, Wyler DJ, et al., 1984. Treatment of experimental cutaneous leishmaniasis with liposome-intercalated amphotericin B. *Antimicrob Agents Chemother*; 25: 655 -6

Papagiannaros, A., Bories, C., Demetzos, C., Loiseau, P.M., 2005. Antileishmanial and trypanocidal activities of new miltefosine liposomal formulations. *Biomed Pharmacother.* 59(10), 545-50.

Paquette, B., van Lier, J.E., 1992. In: Dougherty, B.W.H.A.T.J. (Ed.), *Photodynamic Therapy*. Marcel Dekker, New York, p. 195.

Paredes R, Laguna F, Clotet B., 1997. Leishmaniasis in HIV-infected persons: a review. *J Int Assoc Physicians AIDS Care.* 3(6):22-39

Pastrana Fundora, F., 2005. Propedéutica farmacológica. En: Manzur Kabrib J, Diaz Almeida J, Cortés Hernández M; *Dermatología Cap 1 ECIMED, C. Habana;* 262-284

Pearson, R.D., Jeronimo, S.M.Bb, Sousa, A.Q., 2001. Leishmaniasis. In: Stephen H. Gillespie; Richar D. Pearson. (Org.). *Principles and Practice of Clinical Parasitology.* 1 ed. Chichester: John Wiley & Sons, v. 1, p. 287-313.

Pedroso, A., 1913. Leishmaniose local do cao. *Ann Paulista Med & Cir;* 1: 33-9.

Pesce H. *Tropicales: Leishmaniasis tegumentaria. Separatas.*1995; 1-13.

Pick, F.J., Asahi, K., 1904. Zur Eosinlicht-Behandlung. Berlin. *kiln. Wochenschr.* Nr. 37. 984.

Pidgeon, C. & Hunt, C. A. (1981) Calculating number and surface area of liposomes in any suspension. *J Pharm Sci,* 70, 173-6.

Pizinger, K., Cetkovska, P., Kacerovska, D., Kumpova, M., 2009. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy and cryotherapy. *Eur J Dermatol.* 19(2), 172-3.

Plotkin S. A. (2005) Vaccines: past, present and future. *Nature Medicine* 11, S5 - S11

Postigo, F., Mora, M., De Madariaga, M.A., Nonell, S., Sagrista, M.L., 2004. Incorporation of hydrophobic porphyrins into liposomes: characterization and structural requirements. *Int. J. Pharm.* 278, 239–254.

Prasmickaite, L., Høgset, A., Berg, K., 2001. Evaluation of different photosensitizers for use in photochemical gene transfection. *Photochem. Photobiol.* 73, 388–395.

Raab, O. (1900) «Über die Wirkung Fluoreszierender Stoffe auf Infusorien». *Z. Biol.* 1900, 39, 524-546.

Rama Krishna, Y.V., Marsh, D., 1990. Spin label ESR and ³¹P NMR studies of the cubic and inverted hexagonal phases of dimyristoylphosphatidylcholine/ myristic acid (1:2, mol/mol) mixtures. *Biochim. Biophys. Acta* 1024, 89–94.

Rancan, F., Wiehe, A., Nobel, M., Senge, M.O., Omari, S.A., Bohm, F., John, M., Roder, B., 2005. Influence of substitutions on asymmetric dihydroxychlorins with regard to

intracellular uptake, subcellular localization and photosensitization of Jurkat cells. *J. Photochem. Photobiol. B* 78, 17–28.

Rangel E F; Barbosa A F; Andrade C A; Sousa N A; Wermelinger E D, 1992. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* vianna, 1911 in *Lutzomyia intermedia* (Lutz & Neiva, 1912) (Diptera:Psychodidae: Phlebotominae) under experimental conditions. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 1992;87(2):235-8.

Razum, N., Balchum, O.J., Profio, A.E., Carstens, F., 1987. Skin photosensitivity: duration and intensity following intravenous hematoporphyrin derivatives, HpD and DHE., *Photochem Photobiol.* 46(5), 925-8.

Reda, S.M., 2007. Stability and photodegradation of phthalocyanines and hematoporphyrin doped PMMA as solar concentrators. *Solar Energy.* 81(6), 755-760.

Ridley, R.G., 2003. Product R&D for neglected diseases. Twenty-seven years of WHO/TDR experiences with public-private partnerships. *EMBO Rep. Spec No:* S43-6.

Rijcken, C.F., Hofman, F.van Zeeland, W.E. Hennink, C.F. van Nostrum (2007) Photosensitizer-loaded biodegradable polymeric micelles: Preparation, characterisation and *in vitro* PDT efficacy. *Journal of Controlled Release, Volume 124, Issue 3, 20 December 2007, Pages 144-153*

Rodriguez, M.E., Moran, F., Bonansea, A., Monetti, M., Fernandez, D.A., Strassert, C.A., Rivarola, V., Awruch, J., Dicelio, L.E., 2003. A comparative study of the photophysical and phototoxic properties of octakis (decyloxy)phthalocyaninato zinc(II), incorporated in a hydrophilic polymer, in liposomes and in non-ionic micelles. *Photochem. Photobiol. Sci.* 2, 988–994.

Rogers L 1904. On the development of flagellated organism (trypanosomes) from the spleen protozoic parasites of cachexial fevers and kala-azar. *Q J Microsc Sci* 48: 367-377

Romero, E.L., Morilla, M.J., 2008. Drug delivery systems against leishmaniasis? Still an open question. *Expert Opin. Drug Deliv.* 5(7), 805-823.

Rowe, E.S., 1982. The effects of ethanol on the thermotropic properties of dipalmitoylphosphatidylcholine. *Mol. Pharmacol.* 22, 133–139.

Ryman-Rasmussen, J.P., Riviere, J.E., Monteiro-Riviere, N.A., 2006. Penetration of intact skin by quantum dots with diverse physicochemical properties. *Toxicol Sci.* (91), 159-165.

Ryman-Rasmussen, J.P., Riviere, J.E., Monteiro-Riviere, N.A., 2007. Surface coatings determine cytotoxicity and irritation potential of quantum dot nanoparticles in epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol.* (127), 143-153.

Ryman-Rasmussen, J.P., Riviere, J.E., Monteiro-Riviere, N.A., 2007. Variables influencing interactions of untargeted quantum dot nanoparticles with skin cells and identification of biochemical modulators. *Nano Lett.* (7), 1344-1348.

Sadzuka, Y., Tokutomi, K., Iwasaki, F., Sugiyama, I., Hirano, T., Konno, H., Oku, N., Sonobe, T., 2005. The phototoxicity of photofrin was enhanced by PEGylated liposome in vitro. *Cancer Lett.*

Sánchez-Delgado, R. A., A. Anzellotti, and L. Suárez. 2004. Metal complexes as chemotherapeutic agents against tropical diseases: malaria, trypanosomiasis and leishmaniasis. *Met. Ions Biol. Syst.* 41:379-419

Sanchez-Saldana, L., Saenz-Anduaga, E., Pancorbo-Mendoza, J., 2004. Leishmaniasis. *Dermatol.* 14(2), 82-98.

Savolainen, J., van der Linden, D., Dijkhuizen, N., Herek, J.L., 2008. Characterizing the functional dynamics of zinc phthalocyanine from femtoseconds to nanoseconds. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry.* 196(1), 99-105.

Schaefer y Loth (1996) An ex-vivo model for the study of drug penetration into human skin. *Pharm Res*

Schatzlein, A., Cevc, G., 1998. Non-uniform cellular packing of the stratum corneum and permeability barrier function of intact skin: a high-resolution confocal laser scanning microscopy study using highly deformable vesicles (transfersomes). *Br. J. Dermatol.* 138, 583–592.

Schettini, D.A.; Ribeiro, R.R.; Demicheli, C.; Rocha, O.G.F.; Melo, M.N.; Michalick, M.S.M.; Frézard, F., 2006. Improved targeting of antimony to the bone marrow of dogs using liposomes of reduced size. *Int. J. Pharm.*, 315,140-147.

Scheuplein, R.J., Blank, I.H., 1971. Permeability of the skin. *Physiol. Rev.* 51, 702–747.

Schneider, L.A., Hinrichs, R., Scharffetter-Kochanek, K., 2008. Phototherapy and photochemotherapy. *Clinics in Dermatology.* 26(5), 464-476.

Schneider-Yin, X., Kurmanaviciene, A., Roth, M., Roos, M., Fedier, A., Minder, E.I., Walt,

H., 2009. Hypericin and 5-aminolevulinic acid-induced protoporphyrin IX induce enhanced phototoxicity in human endometrial cancer cells with non-coherent white light. *Photodiagnosis and Photodynamic Therapy*. 6(1),12-18.

Schubert, R., Beyer, K., Wolburg, H., Schmidt, K.H., 1986. Structural changes in membranes of large unilamellar vesicles after binding of sodium cholate. *Biochemistry* 25, 5263–5269.

Seddon, J.M., Hogan, J.L., Warrender, N.A., Pebay-Peyroula, E., 1990. Structural studies of phospholipid cubic phases. *Progr. Colloid Polym. Sci.*, 189–197.

Sellard, A.W., 1918. Investigations of tropical sunlight, with special reference to photodynamic action. *Journal of Medical Research*. 38 (3), 293-334.

Shigeo, F.Y.K., Toshihiro, M., Hiroyuki, S., Junichi, T., 1997. JP 9077731, Japan.

Shotton, D., White, N., 1989. Confocal scanning microscopy: three-dimensional biological imaging. *Trends Biochem Sci*. 14(11), 435-9.

Shoura, S.M., Sheikha, A.K., Bahamdan, K.A., Tallab, T.M, Hassounah, O.A., 1995. Visceral and cutaneous leishmaniasis comparative ultrastructure of host-parasite interactions. *J. Egypt. Soc. Parasitol*. 25 (83), 861-876.

Simoes, S., Moreira, J.N., Fonseca, C., Duzgunes, N., de Lima, M.C., 2004. On the formulation of pH-sensitive liposomes with long circulation times. *Adv. Drug Deliv. Rev*. 56, 947–965.

Siow, L.F., Rades, T., Lim, M.H., 2007. Characterizing the freezing behavior of liposomes as a tool to understand the cryopreservation procedures. *Cryobiology* 55, 210–221.

Sircar, A.K., Chartoff, R.P., 1994. Measurement of the glass transition temperature of elastomer systems. In: Seyler, R.J. (Ed.), *Assignment of the Glass Transition*. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, pp. 226–238.

Small, D. M. (1967) Phase equilibria and structure of dry and hydrated egg lecithin. *J Lipid Res*, 8, 551-7.

Sohl, S., Kauer, F., Paasch, U., Simon, J.C., 2009. Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 5(2), 128-30.

Spikes, J.D.: «Historical Review - Photodynamic Action: from Paramecium to photochemotherapy». *Photochem. Photobiol*. 1997, 65, 142-147.

- Stojiljkovic, I., Evavold, B.D., Kumar, V., 2001. Antimicrobial properties of porphyrins. *Expert Opin. Investig. Drugs* 10, 309–320.
- Strassert, C.A., Rodriguez, M.E., Fernandez, D.A., Dicelio, L.E., Awruch, J., 2003. Synthesis and properties of N-alkylsubstituted zinc(II) phthalocyaninates as potential agents for photodynamic therapy. *Curr. Top. Med. Chem.* 3, 165–173.
- Straubinger, R.M., 1993. pH-sensitive liposomes for delivery of macromolecules into cytoplasm of cultured cells. *Methods Enzymol.* 221, 361–376.
- Sun,W.Q., Leopold, A.C., Crowe, L.M., Crowe, J.H., 1996. Stability of dry liposomes in sugar glasses. *Biophys. J.* 70, 1769–1776.
- Sundar, S.; Jha, T.K.; Thakur, C.P.; Engel. J.; Sindermann, H.; Fischer, C.; Junge, K.; Bryceson, A.; Berman, J., 2002. Oral Miltefosine for Indian Visceral Leishmaniasis. *N. Engl. J. Med.*, 347, 1739-1746.
- Takeuchi, Y., Ichikawa, K., Yonezawa, S., Kurohane, K., Koishi, T., Nango, M., Namba, Y., Oku, N., 2004. Intracellular target for photosensitization in cancer antiangiogenic photodynamic therapy mediated by polycation liposome. *J. Control. Release* 97, 231–240.
- Taniguchi, N., 1974. On the Basic Concept of 'Nano-Technology', *Proc. Intl. Conf. Prod.* London, Part II, [British Society of Precision Engineering](#).
- Teegarden, J.G., Hinderliter, P.M., Orr, G., Thrall, B.D., Pounds, J.G., 2007. Particokinetics in vitro: dosimetry considerations for in vitro nanoparticle toxicity assessments. *Toxicol Sci.* 95(2):300-12. 97(2):614.
- Thakur CP, Sinha GP, Barat D, Singh RK., 1994. Are incremental doses of amphotericin B required for the treatment of visceral leishmaniasis? *Ann Trop Med Parasitol.* 88(4):365-70.
- Tietze F.1969. Enzymatic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* 1969; 27:502-522
- Tremblay M, Oliver M, Bernier R., 1996. Leishmania and the pathogenesis of HIV infection. *Parasitol Today*; 12:257-61.
- Uriarte Cantolla, A., 2003 *Historia del Clima de la Tierra*. Servicio Central de Publicaciones del Gobierno Vasco.
- van den Bergh, B.A., Wertz, P.W., Junginger, H.E., Bouwstra, J.A., 2001. Elasticity of

vesicles assessed by electron spin resonance, electron microscopy and extrusion measurements. *Int. J. Pharm.* 217, 13–24.

van der Snoek, E. M., Robinson, D. J., van Hellemond, J. J., Neumann, H. A. M., 2008. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV.* 22(8), 918-22.

Van Kuijk-Meuwissen, M.E., Junginger, H.E., Bouwstra, J.A., 1998. Interactions between liposomes and human skin in vitro, a confocal laser scanning microscopy study. *Biochim Biophys Acta.* 1371(1), 31-9.

Van Lier, R.A., Brouwer, M., De Groot, E.D., Kramer, I., Aarden, L.A., Verhoeven, A.J., 1991. T cell receptor/CD3 and CD28 use distinct intracellular signaling pathways. *Eur J Immunol.* 21(7), 1775-8.

Van Winden, E.C., Crommelin, D.J., 1999. Short term stability of freeze-dried, lyoprotected liposomes. *J. Control. Release* 58, 69–86.

Verma, D.D., Verma, S., Blume, G., Fahr, A. 2003. Liposomes increase skin penetration of entrapped and non-entrapped hydrophilic substances into human skin: a skin penetration and confocal laser scanning microscopy study. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 55, 271-277.

Vianna, G. O. 1912. Tratamento da leishmaniose tegumentar por injeções intravenosas de tártaro emético. *Arch. Brasil. Med.* 3:1171.

Vlassoff C., 1993. Estado actual de la investigación social y económica sobre las enfermedades tropicales. In: Briceño-León, R., Pinto Dias, J. *Las Enfermedades Tropicales en la Sociedad Contemporánea.* Caracas: Fondo Editorial Acta Científica de Venezuela y Consorcio de Ediciones Capriles, p. 15-28.

Von Tappeiner, H., Jesionek, A., 1903. Therapeutische Versuche mit Fluoreszierenden Stoffen. *Muench Med. Wochenschr.*1, 2042-2044.

Wagner, H., Kostka, K.H., Adelhardt, W., Schaefer, U.F., 2004. . Effects of various vehicles on the penetration of flufenamic acid into human skin. *Eur J Pharm Biopharm.* 58(1):121-9.

Wagner, H., Kostka, K.H., Lehr, C.M., Schaefer, U.F., 2000. Drug distribution in human skin using two different in vitro test systems: comparison with in vivo data. *Pharm Res.* 17(12), 1475-81.

- Wandelow, M.R., 1995. Farmacología dermatológica. En: Malgor LA, Valsecia ME. Farmacología médica. 2a ed. Corrientes: Ediciones Donato/FARM, vol 3: 107-117.
- Wang, H., Wang, W.X., Yang, Y., Cai, W.M., 2008. Visible Light Induced Photodegradation and Phototoxicity of Phloxine B and Uranine. *Biomedical and Environmental Sciences*. 21(5), 438-441.
- Weiner, N., Lieb, L., 1998. In: Papahadjopoulos (Ed.), *Medical Applications of Liposomes*. Elsevier Science B.V., pp. 493–510.
- Wiegell, S.R., Hædersdal, M., Philipsen, P.A., Eriksen, P., Enk, C.D., Wulf, H.C., 2008. Continuous activation of PpIX by daylight is as effective as and less painful than conventional photodynamic therapy for actinic keratoses; a randomized, controlled, single-blinded study. *British Journal of Dermatology*. 158 (4), 740-746(7).
- Wiegell, S.R., Hædersdal, M., Eriksen, P., Wulf, H.C., 2009. Photodynamic therapy of actinic keratoses with 8% and 16% methyl aminolaevulinate and home-based daylight exposure: a double-blinded randomized clinical trial. *British Journal of Dermatology*. 160(6), 1308-1314(7).
- Wilkinson, F., Helman, W.P., Rose, A.D., 1995. Rate constant for the decay and reactions of the lowest electronically excited singlet state of molecular oxygen in solution. An expanded and revised compilation. *J. Phys. Chem. Ref. Data* 24, 663–1021.
- Williams, R.J., Leopold, A.C., 1989. The glassy state in corn embryos. *Plant Physiol*. 89, 977–981.
- Wolfe y Bryant, 1999. Freezing, drying and/or vitrification of membrana –solute-water systems. *Cryobiology*, 39, 103-129
- Yarmush, M.L., Thorpe, W.P., Strong, L., Rakestraw, S.L., Toner, M., Tompkins, R.G., 1993. Antibody targeted photolysis. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*. 10, 197–252.
- Yarosh, D., Bucana, C., Cox, P., Alas, L., Kibitel, J., Kripke, M., 1994. Localization of liposomes containing a DNA repair enzyme in murine skin. *J Invest Dermatol*. (4), 461-8.
- Yeagle, P. L., Hutton, W. C. y Martin, R. B. (1976) Transmembrane asymmetry of vesicle lipids. *J Biol Chem*, 251, 2110-12.
- Yu, C., Chen, S., Zhang, M., Shen, T., 2001. Spectroscopic studies and photodynamic actions of hypocrellin B in liposomes. *Photochem. Photobiol*. 73, 482–488.

Zhang, L.W., Monteiro-Riviere, N.A., 2008. Assessment of quantum dot penetration into intact, tape-stripped, abraded and flexed rat skin. *Skin Pharmacol Physiol.* 21(3), 166-80.

Zhang, L.W., Monteiro-Riviere, N.A., 2009. Mechanisms of quantum dot nanoparticle cellular uptake. *Toxicol Sci.* 110(1), 138-55.

Zhu, Z., Tang, Z., Phillips, J.A., Yang, R., Wang, H., Tan, W., 2008. Regulation of singlet oxygen generation using single-walled carbon nanotubes. *J Am Chem Soc.* 130(33):10856-7.

Para citar este documento

Martinetti Montanari, Jorge A. (2015) Aplicación Tópica de Liposomas UltraDeformables para Terapia Fotodinámica contra Leishmaniasis Cutánea (Tesis de posgrado). Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Argentina: Repositorio Institucional Digital de Acceso Abierto. Disponible en: <http://ridaa.demo.unq.edu.ar>