

Fototerapia para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea

Phototherapy in treatment of cutaneous leishmaniasis

Viviana M. Taylor¹, David L. Cedeño², Sara M. Robledo¹

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad endémica en 98 países, con más de 350 millones de personas en riesgo de adquirir la infección y 12 millones de casos. Los antimonios pentavalentes, la anfotericina B y la miltefosina han sido el tratamiento de elección para todas las formas de leishmaniasis. Sin embargo, desventajas como el alto costo, la duración del tratamiento y los efectos tóxicos asociados, promueven la falta de cumplimiento del tratamiento o su abandono y la aparición de cepas resistentes o poco sensibles al medicamento. Estos factores han estimulado la búsqueda de alternativas terapéuticas que sean económicas, sin efectos adversos y con resultados cosméticos favorables. La fototerapia es un procedimiento en el cual un agente fotosensibilizador, al ser activado por luz da lugar a la producción de especies reactivas del oxígeno. Este tratamiento utilizado en varias formas de cáncer, herpes y otras enfermedades e infecciones localizadas, surge como una prometedora estrategia para la leishmaniasis cutánea, con amplias ventajas como bajo costo, fácil manejo y resolución total de la lesión, haciéndola favorable frente a otras alternativas de manejo de la enfermedad.

Palabras clave: fototerapia, *Leishmania* spp., agente fotosensibilizador, luz, especies reactivas de oxígeno.

Abstract

Leishmaniasis is an endemic disease in 98 countries around the world, with 12 million cases and more than 350 million people at risk of acquiring infection. Available drugs such as pentavalent antimony, amphotericin B and miltefosine, have been the treatment of choice for all clinical forms of leishmaniasis. However, disadvantages such as high cost, duration of treatment and toxicity, promote non-adherence or neglect of treatment and the emergence of resistant or less sensitive to medicine. These problems have stimulated the search of new therapeutic alternatives that are affordable, without adverse effects and favorable cosmetic results. Phototherapy is a procedure in which an agent photosensitizer when activated by light leads to production reactive oxygen species. This therapy used in the treatment of various forms of cancer, herpes and other and localized infectious diseases, is emerging as a promising strategy for the treatment of cutaneous leishmaniasis with large advantages such as low cost, easy handling and total resolution injury, becoming a very promising alternative compared to the traditional treatment approaches.

Key words: photodynamic therapy, *Leishmania* spp, agent photosensitizer, light, reactive oxygen species.

Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria endémica en 98 países, con más de 350 millones de personas en riesgo de infectarse, 12 millones de personas infectadas y 2 millones de personas enfermas ⁽¹⁾. En Colombia para el 2010 se registraron 13.804 casos de leishmaniasis cutánea ⁽²⁾, la forma clínica más prevalente y, para octubre de 2011, se habían reportado 5.848 nuevos casos ⁽³⁾. Los medicamentos disponibles, aunque efectivos, tienen desventajas que favorecen el abandono del tratamiento y la aparición de cepas con sensibilidad disminuida al medicamento, que hace prioritario trabajar en la búsqueda de alternativas terapéuticas, donde la fotote-

rapia dinámica, o terapia fotodinámica, surge como estrategia novedosa y prometedora.

Para el desarrollo de esta revisión, se hizo una búsqueda en las bases de datos Pubmed, Medline y Ovid, combinando los términos *Photodynamic therapy, Leishmania, dosimetry, fluence, immunity, infection y cancer*. Se incluyeron 58 artículos, entre revisiones e investigaciones originales.

Fototerapia

La fototerapia es un procedimiento utilizado desde comienzos del siglo XX en el tratamiento de diferentes tipos de cáncer, vitiligo, psoriasis, herpes y otras enfermedades e infecciones loca-

1 Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

2 Departamento de Química, Illinois State University, Normal, Illinois, USA

Recibido: 23/06/2011; Aceptado: 09/11/2011

Correspondencia: Sara María Robledo, PECET, Sede de Investigación Universitaria, Universidad de Antioquia, Calle 62 N° 52- 59, Laboratorio 632, Medellín, Colombia. Teléfono: (574) 219-6503.

Dirección electrónica: srobledo@guajiros.udea.edu

lizadas ⁽⁴⁾. Recientemente, ha tomado importancia en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea con amplios beneficios y bajos costos, sin efectos colaterales asociados y con resultados cosméticos favorables ⁽⁵⁾.

La fototerapia combina tres elementos fundamentales: agente fotosensibilizador, luz y oxígeno ⁽⁶⁾. Los agentes fotosensibilizadores son estructuras macrocíclicas que, al activarse con luz, a longitudes de onda entre 600 y 850 nm e intensidades de 150 mW/cm², interactúan con el oxígeno molecular originando fotoxidación ⁽⁷⁾ asociada a la producción directa o indirecta de especies reactivas del oxígeno, ya sea reaccionando con un agente de oxidorreducción para formar un ion radical, que reacciona con el oxígeno y forma radicales hidróxido y superóxido, o alcanzando un estado de triplete (*triplet*), que le permite reaccionar con el oxígeno y formar el oxígeno singulete (*singlet*), molécula muy citotóxica con un tiempo de vida media corto (<0,04 s) y un radio de acción pequeño (<0,02 mm) ⁽⁸⁾.

Los mecanismos fotofísicos y fotoquímicos que ocurren en la fototerapia asociados con la producción de especies reactivas del oxígeno durante las reacciones de fotoxidación, se pueden resumir de la siguiente manera:

- el agente fotosensibilizador en estado basal, al ser estimulado por la luz, pasa a un estado de singulete excitado por transición electrónica;
- una pequeña parte del agente fotosensibilizador produce fluorescencia al absorber energía y luego la libera en forma de luz;
- otra parte del agente fotosensibilizador, por conversión interna, se libera en forma de calor; en ambos procesos el agente fotosensibilizador permanece en estado de singulete, sin cambios de conformación o de espín;
- la mayor parte del agente fotosensibilizador, al ser excitado por luz, sufre cambios de espín y, por un cruce entre sistemas, este agente pasa a un estado de triplete (*triplet*) excitado el cual reacciona con radicales libres y oxígeno molecular (en estado base de triplete)

y forma las especies citotóxicas superóxido y oxígeno singulete, respectivamente;

- luego de este proceso, la molécula en estado de triplete retorna a su estado base de singulete con la producción de fosforescencia al liberar la energía en forma de radiación o luz ⁽⁴⁾.

Es importante anotar que, a diferencia de la fluorescencia, en la fosforescencia hay un retraso temporal entre la absorción y la reemisión de los fotones de energía, con continua emisión de luz durante un tiempo mucho más prolongado, aun después del corte del estímulo que la provoca, ya que la energía absorbida se libera lenta (incluso muchas horas después) y continuamente.

Las moléculas de especies reactivas del oxígeno reaccionan con organelos, proteínas y ADN celular, y causan apoptosis o necrosis de las células que contienen el agente fotosensibilizador. El proceso se manifiesta inicialmente con inflamación y necrosis, con la posterior curación y reepitelización del tejido tratado ⁽⁶⁾.

La fototerapia es un procedimiento seguro, ya que el agente fotosensibilizador no es tóxico o poco tóxico sin exposición a la luz; por lo que aun cuando el agente fotosensibilizador se incorpore a células sanas, sólo las áreas irradiadas se verían afectadas ⁽⁴⁾. La selectividad de la fototerapia se puede mejorar aumentando la concentración del agente fotosensibilizador en el tejido blanco y limitando la irradiación a un área específica o, también, incorporando los agentes fotosensibilizadores a sistemas de transporte con gran afinidad por el tejido blanco, como liposomas ⁽⁹⁾, polímeros sintéticos biodegradables ⁽¹⁰⁾, anticuerpos o nanopartículas ^(9,11).

Agentes fotosensibilizadores y mecanismo de acción

Los agentes fotosensibilizadores son piezas importantes en la fototerapia, ya que de ellos depende la generación de especies reactivas del oxígeno, que son las responsables de la muerte

de células tumorales o infectadas por parásitos, como *Leishmania* spp.

Algunas de las propiedades con que debe contar un buen agente fotosensibilizador son:

- ser químicamente puro y con composición conocida;
- ser citotóxico sólo en presencia de la luz o tener una toxicidad mínima en la oscuridad;
- que se almacene preferiblemente en el órgano o tejido blanco;
- que se excrete rápidamente para garantizar menor toxicidad sistémica;
- que genere gran producción de oxígeno singulete o superóxido; y
- que absorba luz entre los 600 y los 850 nm, lo que permite una máxima penetración de la luz al tejido y mayor producción de oxígeno en singulete ⁽¹²⁾.

Otras características importantes son: el peso molecular, la lipofilia, la carga iónica, el tipo de sustituyentes y la simetría, la solubilidad en compuestos fisiológicos y la naturaleza aniónica, catiónica o neutra, que afectan directamente la ruta de administración, el perfil de biodistribución y el perfil farmacocinético ^(13,14).

Los agentes fotosensibilizadores se clasifican en familias, según su estructura química y su naturaleza catiónica, aniónica o neutra (tabla 1). Además, por sus propiedades de distribución, selectividad y excreción, se pueden clasificar como de primera, de segunda o de tercera generación ^(13,14).

Los agentes fotosensibilizadores de primera generación, como el Fotofrin[®], que también es de naturaleza aniónica ⁽⁴⁾ y cuenta con aprobación de la *Food and Drug Administration* (FDA) ^(4,15), se han utilizado exitosamente en la fototerapia dinámica para cáncer; sin embargo, presentan pobre excreción que origina posible fotosensibilidad prolongada con pérdida de absorción de luz, producción de energía y poca penetración ⁽¹⁵⁾.

Los agentes fotosensibilizadores de segunda generación –benzoporfirinas, benzofenotiazinas, clorinas, ftalocianinas y porficine– tienen mayor absorción de luz y afinidad por el tejido blanco, selectividad por compartimentos celulares, como la mitocondria, y mayor excreción, lo que minimiza los efectos de fotosensibilidad prolongada. Sin embargo, presentan acumulación en órganos como el hígado, el riñón y el bazo ⁽¹⁵⁾.

Con el fin de mejorar la selectividad por el tejido blanco de los agentes fotosensibilizadores y minimizar su toxicidad, han surgido los de tercera generación, que son aquellos conjugados con anticuerpos dirigidos contra el antígeno tumoral, a moléculas de LDL o de folato, cuyos receptores se expresan en células tumorales ⁽¹²⁾ o están dirigidos a las vías metabólicas de los microorganismos ⁽¹⁶⁾.

El mecanismo de acción de los agentes fotosensibilizadores permanece aún en estudio. Algunos reportes indican que, al ser estimulados por la luz, inducen peroxidación de las membranas lipídicas, aumentan la actividad de la dismutasa de superóxido e incrementan los niveles de glutatión ⁽¹⁷⁾. La activación de la fosfolipasa C (PLC) y la fosfolipasa A2 (PLA2) es un efecto temprano en la apoptosis inducida por la fototerapia dinámica, debido a que el Ca²⁺ intracelular actúa como segundo mensajero en la señalización celular en respuesta a diferentes estímulos y puede convertirse en enlace de activación entre la PLA2 y la PLC que hidroliza el fosfatidil inositol-4,5-difosfato y produce inositol-3-fosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El DAG, a su vez, activa cinasa C de proteínas (PKC) y el IP3 promueve el aumento de Ca²⁺ intracelular ⁽⁷⁾, el cual se une a la calmodulina y la calcineurina, formando el complejo Ca²⁺/calmodulina/calcineurina que, a su vez, desfosforila el factor nuclear de las células T activadas, que regula la transcripción de p21, un marcador de diferenciación de queratinocitos y que actúa como coactivador de los factores de transcripción Sp1 y Sp3 ⁽¹⁸⁾.

Tabla 1. Clasificación por familias de los agentes fotosensibilizadores

Familia	Nombre	Presentación comercial	Utilización y uso común	Dosimetría, propiedades fotoquímicas y fotofísicas
Porfirinas	Hematoporfirina y derivados	Fotofrin® Fotosan® Fotocan®	Diferentes tipos de tumores	2 mg/kg a 150 J/cm ²
	Prodroga ALA	Levulan®	Tumores y lesiones cutáneas ^ψ	20% ALA a 150 J/cm ²
	Benzoporfirina	Visudine®	Trastornos neurovasculares, degeneración macular, coriorretinopatías y lesiones cutáneas ^ψ	Aplicaciones sencillas de una inyección de 6 mg/kg a 100 J/cm ²
	Texafirinas	Antrin®, Lutex o Optrin™	Algunas formas de cáncer, enfermedades oculares, coronarias y placa ateromatosa	Soluble en agua, se activa aproximadamente a 730 nm
Clorinas	Temoporfina	Foscan®	Diferentes tipos de tumores	0,15 mg/kg a 660 nm
	Purpurinas	Purlitina®	Cáncer de células escamosas y sarcoma de Kaposi	Activa a 660 nm
	El mono-L-aspartil-clorina o NPe6	—	Lesiones de tipo oftálmico	2,5 y 3,5 mg/kg a 100 J/cm ² o 664 nm
	Talaporfina de sodio	LS11	Cáncer, lesiones cutáneas	Amplio espectro de absorción (400-664 nm)
	Fotoclorina	Fotoclo®	Tratamiento de tumores en perros y gatos y cáncer de esófago en humanos	0,15 mg/kg con dosis de luz de 48 horas a 150 J/cm ²
Ftalocianinas	Ftalocianinas de aluminio y cinc	Fotosens®	Lesiones cutáneas ^ψ , tumores de cabeza y cuello	Activa entre 650-850 nm y a 100 J/cm ²

ψ AF utilizados en estudios *in vitro* e *in vivo* para fototerapia en leishmaniasis cutánea

La activación de PLA2 libera metabolitos del ácido araquidónico que, posteriormente, lleva a la liberación de prostaglandina E2 (PGE2) y a la inducción de la apoptosis celular, asociada con incremento de la expresión de proteína c-Myc (7,19). La activación de esfingomielinasas que promueven la producción de ceramida (molécula de segunda señal que regula los procesos de apoptosis, senescencia celular, ciclo y diferenciación celular) y la inactivación de la sintetasa de glucosilceramida y palmitoiltransferasa serina (enzima que cataliza el paso inicial en la biosíntesis de esfingolípidos), son también efectos sobre el metabolismo de los lípidos atribuidos a la fototerapia dinámica (7).

Algunos agentes fotosensibilizadores, como las ftalocianinas de aluminio y la hipericina, tienen acción directa sobre la cinasa de proteínas mitógeno activada (MAPK) que cumple un papel importante en la progresión del ciclo celular inducido por mi-

tógenos a través de G1, la regulación del desarrollo embriogénico, el movimiento celular y la apoptosis, ya que MAPK fosforila las proteínas inductoras de la necrosis, como la Bcl (*B-cell lymphoma*) que es una proteína proapoptótica (7).

La luz y su importancia en la fototerapia

La luz se dispersa o se absorbe cuando entra en el tejido, y el grado de intensidad de ambos procesos depende del tipo de luz y de la longitud de onda. La óptica en el tejido implica la medida de la distribución espacial y temporal, la distribución dimensional de las estructuras del tejido, la absorción y la dispersión. La absorción se debe en gran parte a cromóforos endógenos del tejido, como la hemoglobina, la mioglobina y los citocromos (20).

Para definir las características ópticas del tejido es necesario tener en cuenta: la dispersión, la absorción y la anisotropía.

La dispersión limita la penetración de la luz en la mayoría de los tejidos y se mide el coeficiente de dispersión μ_s ; para los tejidos blandos, éste se encuentra en el rango de 100 a 1.000 cm^{-1} .

La absorción consiste en la transformación de energía luminosa en otro tipo de energía al propagarse la luz en una sustancia cualquier y se mide por el coeficiente de dispersión m_s ; éste se encuentra entre 0,1 y 5 cm^{-1} para cualquiera de los tejidos, en el espectro de luz verde.

La anisotropía evalúa la dirección de la dispersión de la luz; se mide con acercamientos matemáticos tales como la "teoría de la difusión" o simulaciones Monte Carlo que predice cómo la luz viaja en el tejido y, con ello, los parámetros de iluminación (fluidez del blanco, índice de fluidez, longitud de onda y ángulo de incidencia) pueden ajustarse para maximizar la dosis baja ⁽²¹⁾.

La combinación de absorción de una longitud de onda más baja por cromóforos tisulares, como la oxihemoglobina, la deoxihemoglobina y la melanina, junto con la dispersión reducida de la luz en longitudes de onda más largas y la presencia de absorción de agua en longitudes de onda mayores de 1.300 nm, se conoce como "ventana óptica del tejido". En términos de fototerapia la profundidad eficaz de penetración media (intensidad reducida hasta 37 %) es alrededor de 1 a 3 mm para 630 nm, que es la longitud de onda usada para el tratamiento clínico con el Fotofrin[®], mientras que la penetración máxima es, aproximadamente, dos veces mayor (700 a 850 nm) ⁽⁸⁾.

Muchos agentes fotosensibilizadores tienden a la fotodestrucción durante la exposición a la luz; este proceso se denomina "fotoblanqueo" y sucede cuando una molécula de especies reactivas del oxígeno generada durante la iluminación reacciona con el agente fotosensibilizador, reduciendo su eficacia ⁽⁸⁾.

En general, la sensibilidad del láser de fibra óptica hace que la distribución de la luz a los sitios anatómicos sea más manejable; sin embargo, la

fluidez exacta sigue siendo compleja y difícil de alcanzar, por lo que actualmente se cuenta con diodos de emisión de luz (light-emitting diode, LED), cuya luz está disponible en longitudes de onda desde el ultravioleta visible hasta el infrarrojo ⁽²²⁾. Una diferencia significativa entre los láseres y los LED es la forma como ocurre la salida de la energía óptica. El poder de máxima liberación de energía en los LED se mide en milivatios, mientras que con el láser se mide en vatios. Los LED proporcionan una salida de energía más baja, se dispersan sobre una mayor superficie y se pueden utilizar en áreas más extensas, dando como resultado un tratamiento más rápido ⁽²²⁾, sin desarrollar una cantidad de energía suficiente para lesionar los tejidos, como lo hacen los láseres. Además, la tecnología de los LED tiene ventajas en eficacia clínica como: a) fotoactivación progresiva del agente fotosensibilizador, b) reducción del dolor durante el procedimiento y c) disponibilidad de múltiples longitudes de onda ⁽²²⁾.

Respuesta inmunitaria en fototerapia

La fototerapia tiene diferentes efectos sobre la respuesta inmunitaria. Favorece la activación del complemento por la vía alterna, modula la producción de citocinas, la activación de las células T CD8+ y la inducción de la apoptosis ⁽²³⁾. Sin embargo, el efecto de la fototerapia sobre la respuesta inmunitaria varía en función de la línea celular o del modelo animal y del agente fotosensibilizador utilizado ⁽⁷⁾. Los estudios *in vitro* han demostrado que, en células HeLa y EMT6 (células tumorales humanas y de ratón, respectivamente) tratadas con Fotofrin[®], se estimula la producción de IL-6, mientras que en las células de carcinoma hipofaríngeo y fibroblastos pulmonares tratados con ALA y Fotofrin[®], se disminuye la producción de IL-6 ⁽¹⁷⁾. En los queratinocitos de ratón y en las células LLC tratadas con clorina de monoaspartilo, se estimula la producción de IL-12, IL-6 y TNF- α , mientras que en las células mononucleares humanas y de ratón tratadas con PpIX, se induce proliferación de linfocitos y secreción de IL-2, IL-3, TNF- α e

IFN- γ ⁽¹⁷⁾. Por otro lado, los estudios en ratones han demostrado que el tratamiento de tumores mamarios con 2-(1-hexilometil)-2-devinil piroforbidae favorece el aumento de IL-6 en circulación. En los pacientes tratados con Foscan[®] se ha observado respuesta inflamatoria mediada por IL-1 β , IL-6, IL-8 e IL-10 ⁽¹⁷⁾.

Los agentes fotosensibilizadores se pueden localizar en varios compartimentos celulares, incluyendo la membrana plasmática, el retículo endoplásmico, la mitocondria, el lisosoma y el aparato de Golgi ⁽⁷⁾. Dependiendo de su localización, pueden inducir apoptosis cuando se concentran en mitocondrias, o pueden predisponer a la necrosis si se ubican en la membrana citoplásmica o en los lisosomas. Esta distribución puede atribuirse a sus características físicas y químicas, que incluyen la carga iónica, hidrofobia o hidrofilia y la simetría molecular ⁽⁸⁾.

El estrés por oxidación mediado por la fototerapia dinámica desencadena una variedad de vías de transferencia de señales que inducen respuestas, aparentemente de tipo protector, como son la expresión de proteínas de choque térmico y factores de transcripción como NF- κ B y AP-1. Además, la degradación de fotooxidación de los lípidos de membrana y la generación de metabolitos del ácido araquidónico, son potentes mediadores inflamatorios que desencadenan una reacción inflamatoria rápida y fuerte. Estos procesos, junto con la liberación de histamina y serotonina de los vasos lesionados, inducen la llegada secuencial de neutrófilos, mastocitos y monocitos o macrófagos, que activan la respuesta tumorigénica ⁽²⁴⁾.

La fototerapia induce una fuerte respuesta de fase aguda caracterizada por neutrofilia y liberación de C5a, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α y G-CSF, así como de tromboxanos, leucotrienos, histamina y prostaglandina E2, responsables del aumento de neutrófilos en sangre y que cumplen un papel importante en limitar el daño del estroma tumoral ⁽²⁴⁾. En los pacientes que responden a la fototerapia,

existe una significativa infiltración del tumor con las células T CD8⁺ después del tratamiento ⁽¹⁷⁾.

Mecanismos de muerte celular en la fototerapia

Las células pueden ser objeto de muerte celular de dos tipos: necrosis y apoptosis. La necrosis es una muerte celular accidental, causada por daño físico o químico, y se define como una forma violenta y rápida de degeneración con daño de los organelos y ruptura de la membrana plasmática que conduce a la liberación del contenido intracelular ⁽⁷⁾.

Por su parte, la apoptosis se define como muerte celular programada genéticamente. Puede ocurrir en células individuales, generalmente rodeadas de células vecinas sanas. Las membranas de las células apoptóticas están, por lo general, fragmentadas en múltiples vesículas esféricas cerradas que conforman cuerpos apoptóticos que son eliminados por las células fagocitarias ⁽⁷⁾. La apoptosis requiere activación de transcripción de genes específicos, incluyendo endonucleasas, fragmentación y degradación del ADN y activación de caspasas que son endopeptidasas intracelulares que utilizan cisteína en el sitio activo y reducen sus blancos a los residuos de ácido aspártico ⁽²⁵⁾.

En la fototerapia se ha investigado la incidencia de la apoptosis y la necrosis tanto *in vivo* como *in vitro* en las células metastásicas ⁽²⁵⁾. Se ha visto que los factores fundamentales que determinan el tipo de muerte celular luego de la fototerapia son: el tipo de célula, la localización celular del agente fotosensibilizador y la dosis de luz aplicada para activarlo a nivel local. Se cree que dosis bajas de este tipo de fototerapia dan lugar a más células apoptóticas, mientras que las dosis más altas originan células necróticas ⁽⁷⁾.

El objetivo más importante de la fototerapia en vías de señalización celular, es la activación de la familia de proteínas Bcl proapoptóticas, puesto que el daño por la luz de Bcl-2 induce apoptosis

en células cancerosas. La expresión de la Bcl-2 se ha asociado con una respuesta favorable a la fototerapia y puede utilizarse para predecir la respuesta del cáncer a la fototerapia ⁽²⁵⁾. También, se ha encontrado que un alto porcentaje de muerte celular se produce después de la fototerapia con presencia de caspasa 3 y 9 en el lisado celular, lo que indica que la fototerapia, posiblemente, activa el proceso de muerte celular por apoptosis, aunque se ha sugerido que la apoptosis y la necrosis son las vías de acción ordinaria de iniciación y que el resultado final está determinado por la presencia de una caspasa activa ⁽⁷⁾.

Fototerapia en el tratamiento del cáncer

Como se mencionó previamente, la fototerapia es un procedimiento utilizado desde hace muchos años en varias formas de cáncer ⁽⁶⁾ y es cada vez más aceptada por los beneficios que ofrece comparada con otros procedimientos estándar, como la quimioterapia y la radioterapia, ya que con la fototerapia se puede obtener una eficacia equivalente o mayor en muchos cánceres con reducción considerable en la morbilidad y en el efecto de desfiguración.

La técnica de la fototerapia es sencilla, generalmente puede llevarse a cabo en las clínicas de consulta externa y es bien tolerada por los pacientes. Este tratamiento está actualmente autorizado en la paliación de cánceres locales avanzados, y se están aprovechando su potencial y ventajas como tratamiento de primera línea en enfermedades premalignas y malignas tempranas, y como tratamiento complementario para cirugía y tratamiento intersticial de tumores profundos ⁽⁶⁾.

Actualmente, se ha venido trabajando también en el efecto de la fototerapia en la inmunidad antitumoral, precisamente, su efecto sobre poblaciones específicas de células T.

Se ha observado que en la fototerapia con disulfona de aluminio o con yodo-2-5-9-trietilamino-benzo-cloruro-fenotiácina, los linfocitos T CD8⁺ citotóxicos se asocian con curación, mientras que los linfocitos T CD4⁺ juegan un papel de soporte ^(26,27).

Por otro lado, los efectos inmunoestimulantes de la fototerapia también se han empleado en el diseño de antígenos tumorales o en la preparación de vacunas. En un estudio reciente se observó, por ejemplo, que la fototerapia en los tumores de sarcoma en ratones C3H/HeN condujeron a la desaparición inicial del tumor inicial, pero con recaída local. Sin embargo, cuando la fototerapia se aplicaba sobre los antígenos tumorales que expresan GFP (*Fluorescent Green Protein*), la curación era del 100 %, sin recaídas ⁽²⁸⁾.

Asimismo, al comparar los lisados de células EMT6 y P815 por la fototerapia contra los lisados generados por la acción de rayos ultravioleta o radiación ionizante, se observó que las vacunas producidas por la fototerapia dinámica eran específicas del tumor e inducían una respuesta citotóxica de células T y, a diferencia de los otros métodos, no requerían administración de un coadyuvante para ser eficaces. Además, los lisados generados por la fototerapia dinámica eran capaces de inducir la maduración fenotípica de las células dendríticas y la expresión de IL-12 ⁽²⁹⁾. Korbelik y Sun produjeron una vacuna para el tratamiento de células SCCVII mediante fototerapia con derivados de benzoporfirinas y una posterior dosis letal de rayos X, y demostraron que cuando se inyectaba la vacuna alrededor del tumor en ratones con tumores SCCVII se observaba el retraso del crecimiento del tumor, la regresión del mismo o la curación ⁽³⁰⁾.

Fototerapia en el tratamiento de las infecciones localizadas

La fototerapia se ha empleado en infecciones por levaduras y dermatofitos que pueden ser inactivados *in vitro* por irradiación con luz a longitudes de onda visible, en presencia de agen-

tes fotosensibilizadores, como acinas catiónicas, compuestos porfirínicos y ftalocianinas. También se ha observado eritema localizado, edema y descamación en un alto porcentaje de pacientes con infecciones fúngicas superficiales, 3 a 5 días después del tratamiento con fototerapia ⁽³¹⁾. Este efecto parece ser el resultado de la destrucción de la epidermis infectada y está asociado al proceso inflamatorio y a los cambios inmunológicos en la piel subyacente, que promueven la respuesta local inmunoestimulante y contribuyen con un efecto directo para eliminar el agente patógeno por daño fotoquímico ⁽³²⁾.

En las infecciones virales, con la fototerapia dinámica se ha observado que con ALA o meso-tetra (hidroxifenil) clorina e irradiación posterior con luz roja a 630 nm, se afectan diferentes partes del virus ⁽³¹⁾. Se demostró que durante la iluminación del herpes simple (*herpes simplex virus*, HSV) con luz roja, en presencia de bajas concentraciones de azul de metileno, se daña el ADN y se bloquea la replicación viral ⁽³³⁾. Igualmente, los derivados de las ftalocianinas demuestran notable actividad virucida al ser activados por la luz e inducen cambios estructurales en las proteínas del HSV.

También, se han encontrado buenos resultados en el tratamiento del virus del papiloma humano y se ha obtenido curación clínica en todos los pacientes tratados con cuatro sesiones y eficacia superior en comparación con la crioterapia ⁽³¹⁾. En la actualidad, ha habido interés en el uso de la fototerapia para inactivar el virus de la inmunodeficiencia humana en los productos de la sangre ⁽³³⁾, pero los resultados en este aspecto aún son muy preliminares.

Otra de las propiedades antimicrobianas beneficiosas de la fototerapia es su capacidad de destruir los factores de virulencia secretados. Esta capacidad se ha demostrado para lipopolisacáridos y proteasas de *Pseudomonas* spp. ⁽³⁴⁾. Se ha propuesto, por ejemplo, que la proteína disulfuro isomerasa y otros factores de virulencia secretados y destruidos, podrían explicar el hecho

de que las heridas infectadas por *P. aeruginosa* y tratadas con fototerapia dinámica cicatricen mejor al compararlas con aquellas heridas tratadas con nitrato de plata ⁽²²⁾.

A pesar de los hallazgos clínicos sobre los beneficios de la fototerapia, un cuello de botella en la aplicación masiva para el manejo de las infecciones, es la falta de agentes fotosensibilizadores muy efectivos y aprobados para uso clínico. Los tintes, como el azul de metileno y el azul de toluidina, y la PpIX inducida por ALA o MAL (metil-aminolevulinato) son los únicos agentes fotosensibilizadores que se han utilizados en pacientes con enfermedades infecciosas. Si bien estos tienen alguna eficacia en función del tipo de microorganismos y la localización anatómica de la infección, es claro que existen otros agentes fotosensibilizadores que tienen más potencial, pero no se han adelantado los estudios toxicológicos necesarios para aprobar su uso en humano ⁽³¹⁾.

Estudios preliminares de la fototerapia en las leishmaniasis

El tratamiento de las infecciones por patógenos intracelulares representa hoy un desafío médico y económico. Los microorganismos que permanecen dentro de las células son resistentes a muchos de los mecanismos de la respuesta inmunitaria y, debido a su localización intracelular, se encuentran menos expuestos a la acción de los agentes quimioterapéuticos y con esto, a su vez, promueven la selección de variantes resistentes.

Por este motivo, es importante el trabajo en otros enfoques terapéuticos, surgiendo la fototerapia dinámica como una buena opción para el manejo de este tipo de patógenos ⁽⁵⁾. Infecciones como la leishmaniasis cutánea, pueden representar un valioso modelo para estudiar la posible aplicación de la fototerapia en la dermatología infecciosa, no sólo por la localización periférica de las lesiones, sino también porque los tratamientos disponibles actualmente son inadecuados ⁽³⁵⁾.

En el tratamiento para la leishmaniasis cutánea se han realizado algunos estudios *in vitro* e *in vivo* con la fototerapia^(36,37). Se ha evaluado la actividad de varios agentes fotosensibilizadores, como el ácido delta-aminolevulínico⁽³⁸⁻⁴¹⁾, las ftalocianinas⁽⁴²⁻⁴⁴⁾, las porfirinas^(45,46) y las fenotiacinas^(47,48). Por otro lado, en los estudios en humanos se ha comparado la efectividad de este tipo de procedimiento frente a los tratamientos convencionales actuales aceptados por la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁽¹⁾, tales como el antimonio pentavalente, la paramomicina, la anfotericina B y la miltefosina⁽⁴⁹⁻⁵²⁾, y frente a otros procedimientos como la crioterapia, la pentamidina y la termoterapia⁽⁵³⁻⁵⁵⁾.

En los estudios *in vitro* se ha demostrado el efecto tóxico de la protoporfirina IX (PpIX), la deuteroporfirina y la mesoporfirina con efecto tóxico sobre *Leishmania amazonensis* en concentraciones mayores de 10 µg/ml⁽¹⁶⁾, así como la sensibilidad de los promastigotes de *Leishmania* spp. a los efectos de complejos xanthonas - HEMO⁽⁵⁶⁾. También, se ha visto que la ftalocianina de aluminio, al ser excitada por la luz, es efectiva *in vitro* contra *L. amazonensis*⁽⁴²⁾ y los promastigotes de dos cepas de las especies *Leishmania infantum* (*L. chagasi*) y *Leishmania panamensis* son sensibles a la fototerapia *in vitro* con ftalocianinas de aluminio y cinc⁽⁴³⁾. Además, el trabajo con modelos transgénicos de *Leishmania* spp. en los que se ha utilizado y aprovechado la deficiencia de enzimas necesarias para la síntesis del grupo HEMO en el parásito, han demostrado su potencial en la fototerapia⁽⁴¹⁾.

Dos compuestos de la familia de la benzofenoxazina fueron efectivos sobre promastigotes de *Leishmania* spp. y tienen potencial para la fototerapia dinámica de la leishmaniasis cutánea por *Leishmania major*⁽⁴⁷⁾ e, igualmente, las porfirinas de naturaleza catiónica (benzofenoxinas y porfirinas tetracatiónicas) presentan mayor efectividad sobre parásitos de *Leishmania* spp.^(5,45). En un estudio reciente se observó que el dimetil-ceto de carbaporfirina (CKOMe) es un potente inhibidor del crecimiento de *Leishmania tarentolae*⁽⁴⁶⁾.

Los estudios *in vivo* de ratones infectados con *L. major* en la oreja, han demostrado que el ALA tiene una buena efectividad sobre los amastigotes, pero que se requieren más de dos sesiones para lograr una eliminación completa de los parásitos, ya que el ALA no actúa directamente sobre el parásito y requiere de la célula huésped para la producción de PpIX, por lo cual su acción sobre *Leishmania* spp. es indirecta y mediada por la muerte de la célula huésped⁽³⁹⁾; en un estudio realizado por Kumari, *et al.*⁽⁵⁷⁾, se plantea la posibilidad de promover la inmunidad en la leishmaniasis visceral mediante la vacunación fotodinámica de hámsteres con mutantes suicidas de *L. amazonensis*.

Igualmente, como se anotó anteriormente, se han llevado a cabo algunos estudios piloto en humanos. En el estudio de 11 pacientes de origen israelí con 32 lesiones por *L. major* y tratados semanalmente con ALA, con exposición a cuatro horas de luz después de la aplicación tópica del agente fotosensibilizador, se informó que luego de tres a seis semanas de tratamiento, había reducción del 67 % del tamaño de la lesión en todos los pacientes y las lesiones se tornaron negativas para amastigotes, sin efectos adversos y con notable resultado cosmético⁽³⁸⁾. En otro estudio, cinco pacientes con leishmaniasis cutánea por *L. major* fueron tratados con ALA aplicado tópicamente una vez por semana, con iluminación durante 10 minutos por un mes, con curación total luego del tratamiento y excelente efecto cosmético, con sólo algo de inflamación local como efecto secundario y sin reportes de recaídas luego de cuatro meses de seguimiento⁽⁵⁸⁾.

En un paciente de 57 años con una lesión en el rostro por *L. tropica*, adquirida en la Toscana (Italia), con tratamiento previo con 15 % de paramomicina durante dos meses y cinco sesiones de crioterapia, no se observó curación total de la lesión ni buena cicatrización ocho semanas después del tratamiento. Sin embargo, después de dos sesiones semanales de fototerapia con la

solución tópica Metvix® más una sesión cuatro semanas después, se observó una rápida y total curación de la lesión, con cicatrización completa y notable atenuación de la marca dejada por los tratamientos previos ⁽⁵¹⁾.

Algunas investigaciones han comparado el efecto de la fototerapia dinámica con los resultados obtenidos en pacientes con leishmaniasis cutánea tratados con paramomicina. En un estudio en Irán, se evaluaron 60 pacientes con diagnóstico clínico y parasitológico de leishmaniasis por *L. major*, con los siguientes criterios de exclusión: tamaño de la lesión superior a 20mm, duración de la enfermedad mayor de dos meses, mujeres embarazadas y niños menores de cinco años. Los pacientes fueron distribuidos en tres grupos, cada uno de 20 personas, así: el grupo 1 o de fototerapia dinámica, fue tratado con ALA al 10 %, el grupo 2 recibió tratamiento con paramomicina al 15 %, y el tercer grupo recibió un placebo. Luego de cuatro semanas de aplicación de cada uno de los tratamientos y seguimiento durante dos meses, se observó que hubo mejoría completa del 93,5 % del grupo 1, seguido de 41,2 % del grupo 2 y sólo de 13,3 % del grupo 3. La curación parasitaria fue del 100 % para el grupo tratado con fototerapia, mientras que para el grupo 2 y 3 fue de 64,7 y 20 %, respectivamente ⁽⁵⁰⁾.

En un segundo estudio se evaluó la fototerapia dinámica con la paramomicina en un hombre de 34 años con 10 lesiones de leishmaniasis cutánea por *L. major*. En este paciente, cinco lesiones fueron tratadas con la solución tópica Metvix® durante dos semanas, una vez cada semana y una vez luego de 12 semanas, y las otras cinco lesiones se trataron con paramomicina al 15 %. Las cinco lesiones tratadas con fototerapia estaban libres de *Leishmania* spp. histopatológicamente, mientras que sólo dos de las lesiones tratadas con paramomicina se resolvieron adecuadamente. Sin embargo, las tres lesiones que no curaron con paramomicina mejoraron satisfactoriamente con fototerapia, lo cual sugiere que este tratamiento puede ser una alternativa efectiva en la leishmaniasis cutánea ⁽⁴⁹⁾.

Finalmente, en un estudio se evaluó la eficacia de la fototerapia contra la crioterapia en un hombre de 39 años. Después de una sesión semanal durante un mes, tanto de fototerapia como de crioterapia, se logró una curación completa en todas las lesiones, pero el efecto estético de las tratadas con fototerapia fue muy superior frente a las lesiones tratadas con crioterapia ⁽⁵⁵⁾.

En conclusión, aunque sí se ha estudiado el efecto de la fototerapia sobre *Leishmania* spp., como se expuso anteriormente, en ninguno de estos estudios se ha evaluado el efecto *in vitro* e *in vivo* de la fototerapia concomitantemente, ni se han establecido posibles mecanismos de acción, y no se ha evaluado su efecto cicatrizante. Tampoco se han realizado estudios de toxicidad dérmica asociados al uso de agentes fotosensibilizadores. Por otro lado, pocos estudios se han hecho con fotosensibilizadores en formulación liposómica y en cultivos primarios.

Así, pues, es necesario llevar a cabo estudios *in vitro* e *in vivo* sobre los mecanismos de acción, los efectos, los beneficios y las complicaciones de la fototerapia en la leishmaniasis cutánea y es, sobre todo, en estos aspectos que el presente trabajo pretende aportar más información.

Conclusiones y perspectivas

La fototerapia es una alternativa terapéutica innovadora en diversas enfermedades, incluyendo las infecciones localizadas como la leishmaniasis cutánea. Aunque es claro que el trabajo con agentes fotosensibilizadores ha sido arduo y se conocen las características y las propiedades importantes de muchos de ellos, es necesario continuar con la optimización y desarrollo de mejores agentes para garantizar máximos beneficios y pocos efectos secundarios.

En el caso de la leishmaniasis cutánea los estudios aún son incompletos, razón por la cual es necesario hacer estudios que brinden una visión más integral de este tipo de tratamientos, y que

permitan obtener un conocimiento sólido de su eficacia y posibles beneficios en la leishmaniasis cutánea. Por ejemplo, se necesitan estudios en los que se evalúen la eficacia y la toxicidad de nuevos agentes fotosensibilizadores y sistemas de transporte y liberación, con identificación del mecanismo de acción, y determinar el efecto antiinflamatorio y cicatrizante relacionado con un efecto cosmético favorable.

Agradecimientos

Al CODI, Universidad de Antioquia (5189), Colciencias (1115-40820503) y CIDEPRO, por su financiación.

Conflicto de intereses

Los autores manifiestan no tener conflicto de intereses.

Bibliografía

- WHO. Control of the leishmaniasis. Reports of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. Geneva: WHO; 2010.
- Vigilancia epidemiológica de las enfermedades transmitidas por vectores, 2010. Fecha de consulta: 9 de Febrero de 2011. Disponible en: <http://www.medellin.gov.co/rij/go/km/docs/wpcccontent/Sites/Subportal%20del%20Ciudadano/Salud/Secciones/Publicaciones/Documentos/2010/Boletin%2001-2010/Anexo03.pdf>.
- Instituto Nacional de Salud: Subdirección de Vigilancia y Control de Salud Pública. Boletín epidemiológico semanal. Semana epidemiológica número 39 de 2011 (25 de septiembre al 1 de octubre de 2011). Fecha de consulta: 24 de Noviembre de 2011. Disponible en <http://www.minproteccion-social.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/Boletin%20epidemiologico%20C3%B3gico%20SE%2039.pdf>
- Hasan T, Ortel B, Moor ACE, Pogue BW. Photodynamic therapy of cancer. *Oncology*, 2003;6:605-22.
- Akilov OE, O'Riordan K, Kosaka S, Hasan T. Photodynamic therapy against intracellular pathogens: Problems and potentials. *Med Laser Appl*. 2006;21:251-60.
- Hooper C. Photodynamic therapy: A clinical reality in the treatment of cancer. *Lancet Oncol*. 2000;1:212-9.
- Robertson CA, Hawkins D, Abrahamse H. Photodynamic therapy (PDT): A short review on cellular mechanisms and cancer research applications for PDT. *Photochem Photobiol B*. 2009;96:1-8.
- Castano AP, Demidova TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy. Part one. Photosensitizers, photochemistry and cellular localization. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2004;1:279-93.
- Derycke AL, de Witte PA. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv Drug Deliver Rev*. 2004;56:17-30.
- Négre CM, Hanboula SY, Monsigny M, Roche AC, Mayer RM, Hommel M. Antileishmanial drug targeting through glycosylated polymers specifically internalized by macrophage membrane lectins. *Antimicrob Agents Chemother*. 1992;36:2228-32.
- Chen K, Preuß A, Hackbarth S, Wacker M, Langer K, Röder B. Novel photosensitizer-protein nanoparticles for photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol*. 2009;96:66-74.
- Detty M, Gibson SL, Wagner SJ. Current clinical and preclinical photosensitizers for use in photodynamic therapy. *J Med Chem*. 2004;47:3897-915.
- Allison R, Downie G, Cuenca R, Hua Hu X, Childs C, Sibata CP. Photosensitizers in clinical PDT. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2004;1:27-42.
- Josefsen L, Boyle RW. Photodynamic therapy: novel third-generation photosensitizer's one step closer? *Brit J Clin Pharmacol*. 2008;154:1-3.
- Dougherty TJ, Gomer CJ, Henderson BW. Photodynamic therapy. *J Natl Cancer Inst*. 1998;90:889-905.
- Chang CS, Chang, KP. Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitology*. 1985;16:267-76.
- Castano AP, Demidovaa TN, Hamblin MR. Mechanisms in photodynamic therapy: part two cellular signaling, cell metabolism, modes of cell death. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2005;2:1-23.
- Santini MP, Talora C, Seki T, Bolgan L, Dotto GP. Cross talk among calcineurin, Sp1/Sp3, and NFAT in control of p21 (WAF1/CIP1) expression in keratinocyte differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:9575-80.
- Almeida RD, Manadas BJ, Carvalho AP, Duarte CB. Intracellular signaling mechanism in photodynamic therapy. *Biochem Biophys*. 2004;1704:59-86.
- Svaasand LO, Wyss P, Wyss Mt, Tadir Y, Tromberg BJ, Berns MW. Dosimetry model for photodynamic therapy with topically administered photosensitizers. *Lasers Surg Med*. 1996;18:139-49.
- Wilson BC, Jeeves WP, Lowe DM. *In vivo* and post mortem measurements of the attenuation spectra of light in mammalian tissues. *Photochem Photobiol*. 1985;42:153-62.
- Hamblin MR, Zahra T, Contag CH, McManus AT, Hasan T. Optical monitoring and treatment of potentially lethal wound infections *in vivo*. *J Infect Dis*. 2003;187:1717-25.
- Cecic I, Korbelik M. Mediators of peripheral blood neutrophilia induced by photodynamic therapy of solid tumors. *Cancer Lett*. 2002;183:43-51.
- Nowis D, Stoktosa T, Legar M, Issat T, Jakóbsiak M, Galab J. The influence of photodynamic therapy on the immune response. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2005;2:283-98.
- Juarranz A, Jaén B, Sanz-Rodríguez F, Cuevas J, González S. Photodynamic therapy of cancer: Basic principles and applications. *Clin Trans Oncol*. 2009;10:148-54.
- Canti G, Lattuada D, Nicolini A, Taroni P, Valentini G, Cubeddu R. Immunopharmacology studies on photosensitizers used in photodynamic therapy (PDT). *Photodyn Ther Cancer*. 1994;2078:268-75.
- Gollnick SO, Brackett CM. Enhancement of anti-tumor immunity by photodynamic therapy. *Immunol Res*. 2010;46:216-26.
- Castano AP, Mroz P, Hamblin MR. Photodynamic therapy and anti-tumor immunity. *Nat Rev Cancer*. 2006;6:535-45.
- Castano A, Mroz P, Wu MX, Hamblin MR. Photodynamic therapy plus low-dose cyclophosphamide generates antitumor immunity in a mouse model. *PNA*. 2008;15:5495-500.
- Korbelik M, Sun J. Photodynamic therapy generated vaccine for cancer therapy. *Cancer Immunol Immunother*. 2005;55:900-9.
- O'Riordan K, Akilov OE, Hasan T. The potential for photodynamic therapy in the treatment of localized infections. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2005;2:247-62.
- Teichert MC, Jones JW, Usacheva MN, Biel MA. Treatment of oral candidiasis with methylene blue-mediated photodynamic therapy in an immunodeficient murine model. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;93:155-60.
- Muller-Breitkreutz K, Mohr H. Infection cycle of herpes viruses after photodynamic treatment with methylene blue and light. *Beitr Infusion Transfusions Med*. 1997;34:37-42.
- Dai T, Huang YY, Hamblin MR. Photodynamic therapy for localized infections. State of the art. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2009;6:170-88.
- Hepburn NC. Cutaneous leishmaniasis: Current and future management. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2003;1:563-70.
- González U, Pinart M, Rengifo-Pardo M, Macaya A, Alvar J, Tweed JA. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Cochrane Collaboration*. 2009;1-145.
- Mahreen M. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Emerging therapies and progress in disease management. *Expert Opin Pharmacother*. 2010;11: 557-69.

38. Enk CD, Fritsch C, Jonas F, Nasereddin A, Ingber A, Jaffe CL, *et al*. Treatment of cutaneous leishmaniasis with photodynamic therapy. *Arch Dermatol*. 2003;139:432-4.
39. Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Hasan T. 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*. 2007;16:651-60.
40. Kosaka S, Akilov OE, O'Riordan K, Hasan T. A mechanistic study of delta-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis. *J Invest Dermatol*. 2007;127:1546-9.
41. Dutta S, Kolli BK, Tang A, Sassa S, Chang KP. Transgenic *Leishmania* model for delta-aminolevulinic acid-inducible monospecific uroporphyrin: Cytolytic phototoxicity initiated by singlet oxygen-mediated inactivation of proteins and its ablation by endosomal mobilization of cytosolic uroporphyrin. *Eukaryot Cell*. 2008;7:1146-57.
42. Dutta S, Ray D, Kolli BK, Chang KP. Photodynamic sensitization of *Leishmania amazonensis* in both extracellular and intracellular stages with aluminum phthalocyanine chloride for photolysis *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2005;49:4474-84.
43. Escobar P, Hernández IP, Rueda CM, Martínez F, Páez E. Photodynamic activity of aluminum (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania promastigotes*. *Biomédica*. 2006;26:49-56.
44. Sazgarnia A, Bahreyni -Toosi MH, Layegh P, Rajabi O. Liposomal zinc phthalocyanine as a potential agent for photodynamic therapy of leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol*. 2010;76:417-8.
45. Bristow CA, Hudson R, Paget TA, Boyle RW. Potential of cationic porphyrins for treatment of cutaneous Leishmaniasis. *Photodiagn Photodyn Ther*. 2006;3:162-7.
46. Morgenthaler JB, Peters SJ, Cedeno DL, Constantino MH, Edwards KA, Kamowski EM, *et al*. Carbaporphyrin ketals as potential agents for a new photodynamic therapy treatment of leishmaniasis. *Bioorg Med Chem*. 2008;16:7033-8.
47. Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Song X, Sherwood M, Flotte TJ, *et al*. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against *Leishmania* parasites. *Chem Bio*. 2006;13:839-47.
48. Akilov OE, Yousaf W, Lukjan SX, Verma S, Hasan T. Optimization of topical photodynamic therapy with 3,7-bis(din-butylamino) phenothiazin-5-ium bromide for cutaneous leishmaniasis. *Lasers Surg Med*. 2009;41:358-65.
49. Gardlo K, Horská Z, Enk CD, Rauch L, Megahed M, Ruzicka T, *et al*. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol*. 2003;48:893-6.
50. Asilian A, Davami M. 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*. 2006;31:634-7.
51. Sohl S, Kauer F, Paasch U, Simon JC, Wetzig T. Photodynamic treatment of cutaneous leishmaniasis. *JDDG*. 2007;5:128-30.
52. van der Snoek EM, Robinson DJ, van Hellemond JJ, Neumann HA. A review of photodynamic therapy in cutaneous leishmaniasis. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008;22:918-22.
53. Willard RJ, Jeffcoat AM, Benson PM, Walsh DS. Cutaneous leishmaniasis in soldiers from Fort Campbell, Kentucky, returning from Operation Iraqi Freedom highlights diagnostic and therapeutic options. *J Am Acad Dermatol*. 2005;52:977-87.
54. Lobo IM, Soares MB, Correia TM, De Freitas LA, Oliveira MI, Nakatani M, *et al*. Heat therapy for cutaneous leishmaniasis elicits a systemic cytokine response similar to that of antimonial (Glucantime) therapy. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2006;100:642-9.
55. Fukamachi S, Nakamura M, Tokura Y. Successful treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy and cryotherapy. *EJD*. 2009;19:172-3.
56. Kelly JX, Ignatushchenko MV, Bouwer HG, Peyton DH, Hinrichs DJ, Winter RW, Riscoe M. Antileishmanial drug development: Exploitation of parasite heme dependency. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;126:43-9.
57. Kumari S, Samant M, Khare P, Misra P, Dutta S, Kolli BK, *et al*. Photodynamic vaccination of hamsters with inducible suicidal mutants of *Leishmania amazonensis* elicits immunity against visceral leishmaniasis. *Eur J Immunol*. 2009;39:178-91.
58. Ghaffarifar F, Jorjani O, Mirshams M, Miranbaygi MH, Hosseini ZK. Photodynamic therapy as a new treatment of cutaneous leishmaniasis. *East Mediterr Health J*. 2006;12:902-8.