

## Transferosomas conteniendo ftalocianina de aluminio clorada como alternativa terapéutica en leishmaniasis cutánea: permeabilidad y biodistribución en ratas Wistar

### Transferosomes loaded with chloroaluminum phthalocyanine as cutaneous leishmaniasis therapeutic alternative: permeability and biodistribution in Wistar rats

Yonathan Rueda Paez<sup>1</sup>, Mario Santos Chacon<sup>1</sup>, David Mantilla Ojeda<sup>1</sup>, Aracely Pinilla Plata<sup>1</sup>, María Alejandra Díaz Peñuela<sup>1</sup>, Angélica María Vera Arias<sup>2</sup>, Heider Carreño Garcia<sup>2</sup>, Julio César Mantilla Hernández<sup>3</sup>, Patricia Escobar Rivero<sup>2</sup>

#### Resumen

**Objetivo:** Evaluar la permeabilidad, retención y biodistribución de los LUD-PcAlCl *in vivo*. **Metodología:** Los transferosomas fueron obtenidos mediante rehidratación de película lipídica. Ratas Wistar fueron tratadas tópicamente e intraperitonealmente con los transferosomas por 5 días. La penetración *ex vivo* fue determinada mediante el ensayo en celdas de Franz y la retención por el método de la cinta adhesiva. Cinco y treinta días postratamiento se obtuvo la piel y órganos para determinar la retención del compuesto y realizar estudios histopatológicos. La PcAlCl fue extraída con solventes y cuantificada por fluorimetría. Los resultados se expresaron en nM PcAlCl/mg órgano.

**Resultados:** La PcAlCl no penetró la piel en los ensayos *ex vivo*, reteniéndose principalmente en el estrato córneo. Cinco días post-tratamiento tópico la PcAlCl fue retenida en estrato córneo ( $41,76 \pm 0,02$ ), mostrando concentraciones mínimas en bazo ( $0,09 \pm 0,02$ ), epidermis-dermis ( $0,06 \pm 0,17$ ), hígado ( $0,03 \pm 0,02$ ) y pulmón ( $0,02 \pm 0,01$  nM). Por vía intraperitoneal se encontró PcAlCl en bazo ( $0,58 \pm 0,4$ ), cerebro ( $0,07 \pm 0,07$ ), corazón ( $0,07 \pm 0,12$ ), pulmón ( $0,012 \pm 0,01$ ) y

<sup>1</sup> Semillero de investigación SINAT, Facultad de Salud, Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia).

<sup>2</sup> CINTROP-UIS, Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas, Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia).

<sup>3</sup> PAT-UIS, Escuela de Medicina, Departamento de Patología, Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia).

**Correspondencia** Patricia Escobar, CINTROP, Universidad Industrial de Santander (Bucaramanga, Colombia). Km2 vía Refugio Piedecuesta sede UIS Guatiguará. Tel. 6344000, extensión 3565. [pescobarwww@yahoo.co.uk](mailto:pescobarwww@yahoo.co.uk).

piel ( $0,021 \pm 0,02$  nM). Treinta días postratamiento no se encontró PcAlCl en ningún órgano. Los estudios histopatológicos fueron negativos.

**Conclusión:** La PcAlCl contenida en transferosomas fue retenida principalmente en estrato córneo, mostrando bajas concentraciones en la dermis, sitio donde se aloja el parásito. Se sugiere modificar los componentes vesiculares del sistema para aumentar la permeación del compuesto.

**Palabras clave:** transferosomas, liposomas ultradeformables, ratas Wistar, leishmaniasis cutánea, sistemas transdérmicos de liberación, ftalocianina.

### Abstract

**Objective:** To assess the UDL-ClAlPc permeability, retention and biodistribution *in vivo*.

**Methods:** Transferosomas were obtained by lipid film re-hydration method. Wistar rats were treated topically and intraperitoneally with UDL-ClAlPc for 5 days. Skin and organs were collected five and thirty days after-treatment to determine ClAlPc retention and histopathological studies. The ClAlPc was extracted with solvents and quantified by fluorometry. The results were expressed in nM PcAlCl/mg organ. The permeation was tested *ex vivo* using Franz-diffusion cells and the retention in stratum corneum and epidermis-dermis by tape stripping.

**Results:** In the *ex vivo* experiments ClAlPc-UDL was not able to penetrate rat skin and was retained mainly in the stratum corneum. In rat, five days after topical treatment ClAlPc was retained mainly in the stratum corneum ( $41.76 \pm 0.02$ ) with minimum concentrations in spleen ( $0.09 \pm 0.02$ ), epidermis-dermis ( $0.06 \pm 0.17$ ), liver ( $0.03 \pm 0.02$ ) and lung ( $0.02 \pm 0.01$  nM). After intra peritoneal treatment, ClAlPc was found in spleen ( $0.58 \pm 0.4$ ), brain ( $0.07 \pm 0.07$ ), heart ( $0.07 \pm 0.12$ ), lung ( $0.01 \pm 0.012$ ) and skin ( $0.021 \pm 0.02$  nM). Thirty days post-treatment ClAlPc was not found in any organ. Histopathological studies were negative.

**Conclusion:** The ClAlPc contained in transferosomes was retained mainly in the stratum corneum. Low concentration was detected in dermis a place where the parasite survives. This vehicle needs to be improved to increase skin penetration.

**Keywords:** transferosomes, liposomes, Wistar rats, cutaneous leishmaniasis, transdermic drug release system, phthalocyanine.

## INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es una enfermedad causada por protozoarios flagelados del género *Leishmania*, los cuales son transmitidos al hombre por la picadura de insectos flebótomos (1-3). El ciclo de vida del parásito alterna entre los promastigotes del vector y los amastigotes que infectan los macrófagos del hospedero mamífero. Exhibe diversas formas clínicas dependiendo de la especie de *Leishmania* y la inmunidad del hospedero que van desde cutáneas, mucocutáneas y viscerales. En Colombia

la LC constituye un problema de salud pública, se reporta un promedio anual de 12 380 casos, de los cuales el 98,5 % corresponden a leishmaniasis cutánea (LC), 1,3 % a mucosa y 0,2 % a visceral (1-4).

El tratamiento se basa en el uso de antimoniales pentavalentes (Glucantime®), que cursa con efectos adversos como dolor intenso en el sitio de aplicación, vómito, cefalea, nefrotoxicidad, hepatotoxicidad y alteraciones electrocardiográficas. Como segunda opción se utiliza anfotericina B

(y sus formas liposomales), pentamidina y miltefosina (5).

Los tratamientos tópicos y/o transdérmicos en LC constituyen una opción en casos de lesiones tempranas y no diseminadas.

Se han utilizado tratamientos físicos (termoterapia, electroterapia, terapia fotodinámica, TFD), formulaciones tópicas en forma de cremas, ungüentos que contienen fármacos como la paromomicina y aplicaciones intralesionales de medicamentos (5).

La TFD se basa en la activación de fotosensibilizadores (FS) con una luz específica que en presencia de oxígeno genera especies radicales de oxígeno (ERO), produciendo fotooxidación y destrucción de células y tejidos enfermos (6). Es utilizada en afecciones de la piel como carcinomas basocelulares, queratosis actínicas, enfermedades infecciosas y en leishmaniasis (6).

La PcAlCl es un FS hidrofóbico con alta eficiencia para producir ERO, habilidad de absorber luz visible (640-680 nm) y actividad contra diferentes especies de *Leishmania* (7-8).

La piel es el órgano más extenso del cuerpo con funciones de protección, absorción y permeación. Está formada por la epidermis, que dependiendo del grado de diferenciación se divide en estrato: córneo (EC), lúcido, granuloso, espinoso y basal o germinativo. Inmediatamente debajo se encuentra la dermis, formada por una matriz densa de tejido conectivo, fibras de colágeno y elastina, por fibroblastos, macrófagos, mastocitos, terminaciones nerviosas y capilares sanguíneos. En la dermis se encuentran las glándulas sudoríparas y sebáceas (9). El EC actúa como una barrera formada por corneocitos envueltos en filamentos de queratina y una envoltura

cornificada rodeada de lípidos (colesterol, ceramidas y ácidos grasos libres) que previenen la pérdida excesiva de agua y permiten la entrada de medicamentos lipofílicos de bajo peso molecular (10).

Los tratamientos transdérmicos se basan en el uso de sistemas terapéuticos que permiten la difusión del fármaco (aplicado en piel) hacia algunas de las capas internas de la piel, consiguiendo una acción localizada o accediendo al torrente sanguíneo alcanzando actividad sistémica (10-11). Se basan en la utilización de medicamentos incluidos en diversas formas farmacológicas, las cuales aseguran el transporte controlado al tejido diana, garantizando su mecanismo de acción y concentraciones terapéuticas mínimas sin inducir toxicidad y/o reacciones de hipersensibilidad (10-11).

Los fármacos pueden acceder ya sea pasivamente (útil en el caso de fármacos lipofílicos, de bajo peso molecular, dosis bajas) o utilizando potenciadores químicos (agua, solventes, surfactantes, liposomas) y métodos físicos tales como iontoforesis, ultrasonido, electroporación o microagujas (10).

El uso de vesículas lipídicas como sistemas transdérmicos de fármacos es una alternativa. Se han diseñado liposomas, transferosomas, niosomas, etosomas, los cuales presentan baja toxicidad, son biodegradables capaces de encapsular y liberar controladamente moléculas hidrofóbicas y lipofílicas, reduciendo la toxicidad y aumentando la biodisponibilidad de los mismos. Sirven como vehículos del fármaco (atravesando la piel), pueden ser potenciadores de la penetración por su composición e inducir una liberación sostenida en las formulaciones tópica que los contiene (12).

Los liposomas ultradeformables (LUD) o transferosomas son vesículas elásticas compuestas por fosfolípidos, surfactantes (colato de sodio, Tween 80, Span 80) y agua capaz de encapsular fármacos y difundirse a través de la piel intacta (13).

Nosotros diseñamos LUD con una bicapa compuesta de fosfolípidos y colato de sodio (Col-Na) que contiene PcAlCl (14) y miltefosina (15), los cuales mostraron actividad *in vitro* contra *L. (L.) infantum* y *L. (Viannia) panamensis* y *L. (V.) braziliensis*. Continuando con los ensayos preclínicos de este sistema vesicular, el objetivo de este estudio fue determinar la permeabilidad, retención y la biodistribución de PcAlCl en ratas Wistar para valorar la capacidad de estos de penetrar el EC y acumularse en la dermis de la piel de las ratas Wistar.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Preparación y caracterización de LUD-PcAlCl

Se prepararon siguiendo el protocolo descrito por Hernández et al. 2013 (14). Brevemente, fosfatidilcolina (PL90, Phospholipid, Alemania) y Col-Na (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) en relación 6:1 fueron colocados en una mezcla de metanol: cloroformo (1:1) con una solución de PcAlCl (Sigma). Se rotoevaporaron los solventes y posteriormente la película lipídica fue suspendida en buffer Tris pH 7,2. Para obtener liposomas unilamelares se pasó la preparación a través del extrusor de lípidos. Los liposomas fueron filtrados y guardados a 4°C. El tamaño promedio de partícula, el potencial Z y el índice de polidispersión (PDI) se determinaron utilizando un Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Ltd. Malvern. Worcestershire. RU). La concentración de PcAlCl

se determinó por espectrofluorometría utilizando el fluorómetro LS 55 PerkinElmer, UK (excitación 670 nm emisión 682. nm).

### Animales, grupos experimentales y tratamiento

Se utilizaron ratas Wistar hembras (200-250 gramos de peso, 2 meses de edad), obtenidas en el Bioterio de la Universidad Industrial de Santander (UIS), teniendo en cuenta la normativa establecida en la Ley 84 del 27 de diciembre de 1989. Esta investigación fue avalada por el Comité de Ética de la UIS, código CB12006.

En el experimento 1 los animales fueron tratados tópicamente con LUD-PcAlCl (número de animales, n=8) y LUD-vacíos (n=2). En el experimento 2 los animales fueron tratados por vía intraperitoneal (i.p) con LUD-PcAlCl (n=6) y con LUD-vacíos (n=2). Los animales recibieron 100 µL de LUD-PcAlCl (100 µM) o LUD-vacíos aplicados diariamente en una dosis por 5 días. Los animales fueron sacrificados 5 o 30 días después de la última dosis.

### Extracción y cuantificación de PcAlCl de piel y otros órganos

Después del sacrificio se extrajeron los órganos: piel, hígado, pulmón, riñón, corazón, cerebro y bazo. La retención de la PcAlCl en el EC se determinó por el método de la cinta adhesiva (15). Se adhirió un trozo de cinta en la parte central de la piel tratada, aplicando presión durante 30 segundos, posteriormente se retiró la cinta y se colocó en tubos ámbar con el solvente extractor. Este procedimiento se realizó 15 veces. La retención del fármaco en la epidermis más dermis (E+D) se determinó cortando la piel en pequeñas porciones y maceando. La retención en los órganos internos se

determinó pesando 30-50 mg de cada órgano y macerando con pistilo y mortero. La PcAlCl se extrajo incubando con el solvente extractor (etanol: DMSO: ácido acético) bajo agitación constante y posterior centrifugación a 10 000 rpm por 15 min. La concentración de PcAlCl fue determinada en los sobrenadantes por fluorometría.

### Pruebas histológicas

Muestras de piel y órganos fueron fijadas con formol taponado al 10 %, procesadas e incluidas en bloques de parafina. Se realizaron cortes histológicos, los cuales fueron coloreados con hematoxilina y eosina. Se observaron microscópicamente y se tomaron registros fotográficos.

### Ensayos de difusión

La piel dorsal de las ratas se procesó y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$ . Se utilizaron celdas de Franz siguiendo el protocolo descrito por Rico et al. 2012 (16). En el compartimento donador se colocaron los LUD y en el receptor PBS pH 7,2. Sobre el compartimento receptor se colocó la piel. Las celdas se dejaron a  $32^{\circ}\text{C}$ , con agitación constante por 24 h. Se determinó la concentración de PcAlCl del EC y de la E+D y la del compartimento receptor por fluorometría.

### Análisis estadístico

Las diferencias entre los LUDs (vacíos y con PcAlCl) y en la distribución de la PcAlCl después de los tratamientos utilizados fueron determinadas utilizando la prueba de t de Student. Un valor de  $P < 0,05$  fue considerado estadísticamente significativo.

## RESULTADOS

### Características fisicoquímicas

Los LUD-PcAlCl mostraron un tamaño de  $133,20 \pm 3,27$  nm, potencial zeta de  $-36,45 \pm 1,23$  mV y PDI de 0,15. Los LUD-vacíos fueron estadísticamente más pequeños que los LUD-PcAlCl, mostrando un tamaño de vesícula  $110,24 \pm 8,32$  nm. El potencial zeta fue similar, con un valor de  $-37,20 \pm 8,86$  y el PDI fue de 0,15.

### Biodistribución de PcAlCl (aplicación vía tópica)

Después de 5 días de finalizar el tratamiento se encontraron concentraciones de PcAlCl en bazo  $0,09 \pm 0,02$ , piel (E+D)  $0,06 \pm 0,02$ , hígado  $0,03 \pm 0,02$  y pulmón  $0,02 \pm 0,01$  nM/mg de órgano. Después de 30 días se detectaron en bazo  $0,04 \pm 0,01$  e hígado  $0,02 \pm 0,02$  nM/mg (figura 1). En el sitio de la aplicación, la PcAlCl se retuvo en el EC; a los 5 días los valores fueron: cintas 1-5:  $26,4 \pm 0,01$ , cintas 6-10:  $11,8 \pm 0,01$  y cintas 11-15:  $3,56 \pm 0,06$  nM PcAlCl/mg. A los 30 días no se encontraron concentraciones de PcAlCl en el sitio de aplicación (figura 1). La aplicación de LUD-vacíos por vía tópica no mostró concentraciones de PcAlCl en los órganos.

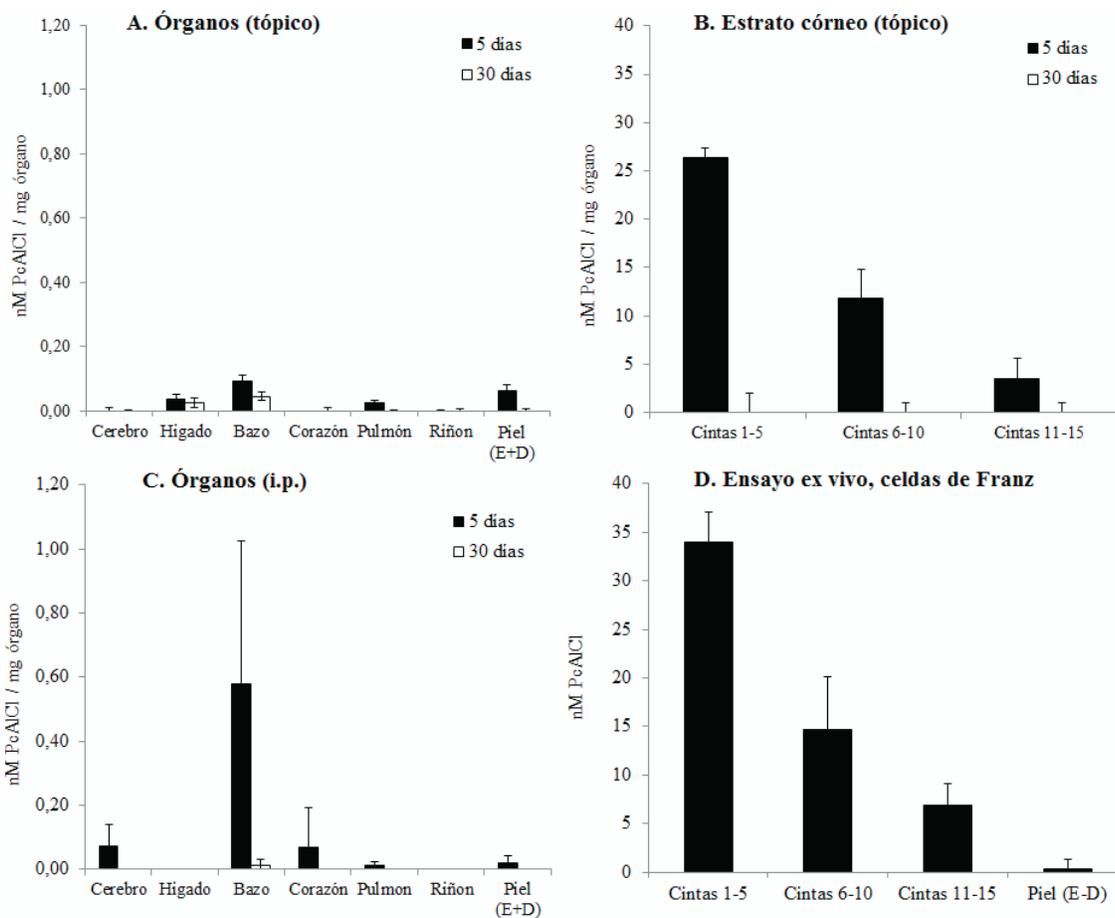
### Biodistribución de PcAlCl (aplicación vía i.p)

Después de 5 días los valores de PcAlCl fueron: bazo  $0,58 \pm 0,4$ , cerebro  $0,07 \pm 0,07$ , corazón  $0,07 \pm 0,12$ , pulmón  $0,012 \pm 0,01$  y piel  $0,021 \pm 0,02$  nM PcAlCl/mg de órgano. Después de 30 días los valores en bazo fueron  $0,01 \pm 0,02$  nM PcAlCl/mg (figura 1). No se hallaron concentraciones de PcAlCl después de la aplicación i.p de LUD-vacíos.

Entre los dos tratamientos utilizados (tópico e i.p) no se encontraron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de PcAlCl en bazo y pulmón. Sin embargo, concentraciones del compuesto fueron detectadas en el cerebro y corazón de algunos de los animales tratados por vía i.p. Este experimento fue repetido tres veces.

### Ensayos de difusión en celdas de Franz

No se detectaron concentraciones de PcAlCl en el compartimiento receptor después de 24 h. La PcAlCl presente en los liposomas se retuvo en el EC con valores de: cintas 1-5:  $34,01 \pm 0$ , cintas 6-10:  $14,6 \pm 5,44$ , cintas 11-15:  $6,9 \pm 2,1$  nM. En piel (E+D) se encontraron valores de  $0,27 \pm 0$  nM (figura 1).



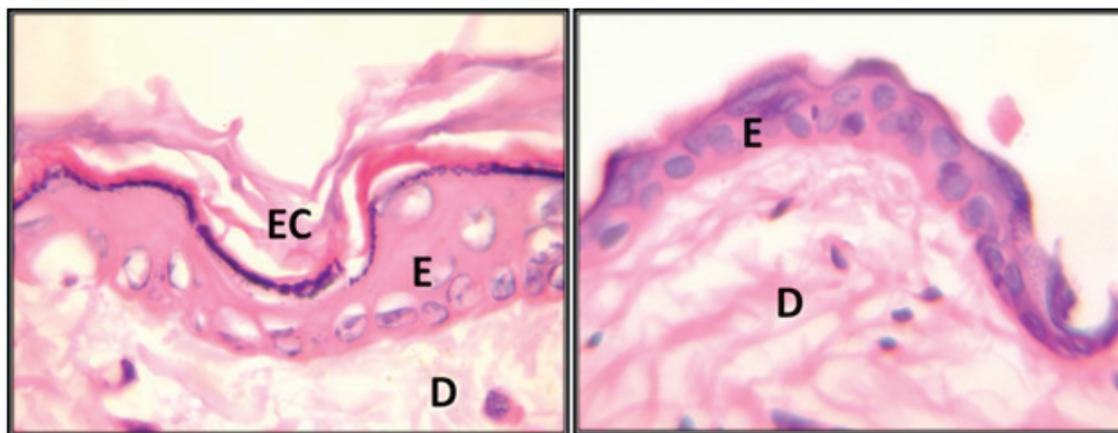
Las ratas Wistar fueron tratadas con LUD-PcAlCl (100  $\mu$ M) por 5 días. Los diagramas de barras muestran la retención de PcAlCl 5 o 30 días después del tratamiento tópico en órganos (A) y estrato córneo (B). La retención después del tratamiento intraperitoneal (i.p) se muestra en el Panel C y los resultados de la prueba de permeación en celdas de Franz en el panel D.

**Figura 1.** Retención en órganos y penetración en piel de la PcAlCl contenida en liposomas ultradeformables(LUD)

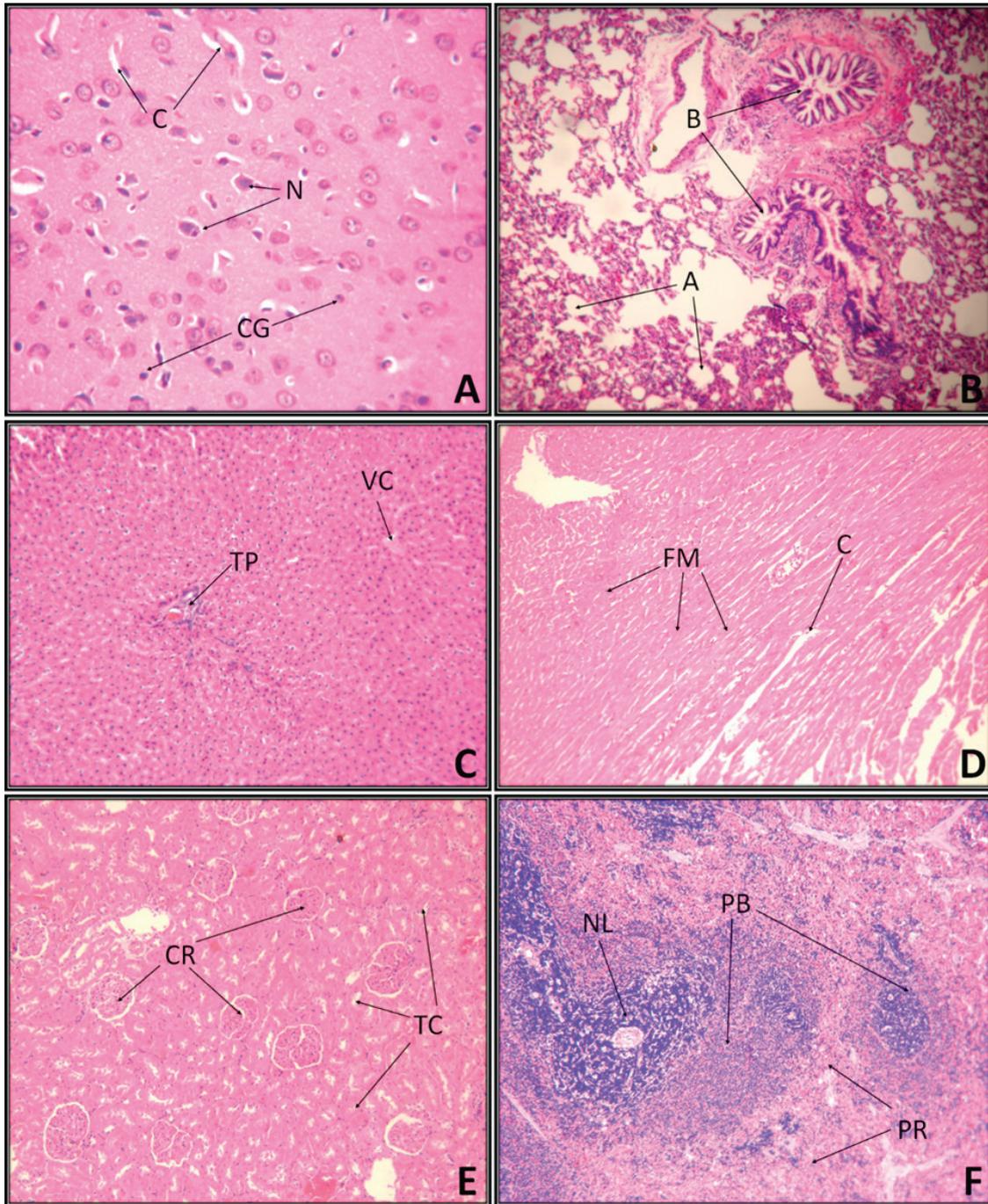
### Características histopatológicas de piel y órganos

En los cortes de piel se identificó la epidermis compuesta por el epitelio plano estratificado queratinizado. Después del método de la cinta-adhesiva el EC fue removido (figura 2), identificándose en la dermis fibras colágenas y elásticas. En la corteza cerebral se destacaron las células piramidales, también los capilares que conformaban la barrera hematoencefálica; no se apreciaron cambios que sugirieran daño neuronal (figura 3A). En el pulmón se identificaron los bronquios y alveolos con paredes ligeramente gruesas

por el aumento del número de linfocitos en su estroma; este hallazgo fue similar en los animales no tratados (figura 3B). El hígado conservó su estructura normal, los hepatocitos en forma de cordones convergieron en la vena centrolobulillar, al igual que las sinusoides (figura 3C). En el corazón se identificaron las fibras musculares cardíacas rodeadas de endomisio (figura 3D). En la corteza renal se reconocieron los corpúsculos renales y a su alrededor los túbulos contorneados (figura 3E). El bazo configurado por la pulpa blanca y la pulpa roja se encontró hiper celular con gran número de hemosiderofagos, igual que en el control (figura 3F).



**Figura 2.** Microfotografía 100X, piel de rata Wistar; piel sana (izquierda) y piel sometida al método de la cinta-adhesiva (derecha). EC: estrato córneo, E: epidermis, D: dermis



**Figura 3.** A) Microfotografía 40X, corteza cerebral, N: neurona, CG: célula glial, C: capilar. B) Microfotografía 10X, pulmón, B: bronquíolo, A: alvéolo. C) Microfotografía 10X, hígado, TP: triada portal, VC: vena centrolobulillar. D) Microfotografía 10X, corazón, FM: fibra muscular, C: capilar. E) Microfotografía 10X, corteza renal, CR: corpúsculo renal, TC: túbulos contorneados. F) Microfotografía 10X, bazo, PB: pulpa blanca, PR: pulpa roja, NL: nódulo linfoide.

## DISCUSIÓN

Se prepararon transferosomas compuestos por una bicapa lipídica de fosfatidilcolina, Col-Na y PcAlCl, presentando características fisicoquímicas similares a las descritas previamente por Hernández et al. (14). Este tipo de sistema vesicular conformado por lípidos asociados a disolventes orgánicos, *edge activators* (Col-Na) o terpenos ha sido utilizado en tratamientos transdérmicos debido a su capacidad de contener diferentes tipos de compuestos y a su elasticidad y flexibilidad, mejorando la penetración de los compuestos a través de la piel (13), (17), (19). Algunos autores han demostrado su capacidad de penetrar la piel intacta, atravesando la capa lipofílica del EC y luego la hidrofílica de la epidermis (13). Sin embargo, otros no han podido demostrar esta hipótesis, adjudicándoles solo una actividad como potenciadores de la penetración de los compuestos, permaneciendo confinados en el EC (17), (19). En este trabajo la mayor concentración de PcAlCl se encontró en las capas externas de la piel, encontrándose una mínima o nula penetración del compuesto. Diferente a esto, un estudio utilizando LUD similares, pero conteniendo miltefosina (LUD-MIL), mostró la retención de MIL en E+D (776 ng/cm<sup>2</sup>) y la penetración (179 ng/cm<sup>2</sup>) en piel humana (15). Diferencias intrínsecas en las características de las membranas utilizadas en los ensayos *ex vivo*, al igual que las características fisicoquímicas de los compuestos (MIL versus PcAlCl), podrían justificar estas diferencias. Una formulación tipo nanoemulsión que contenía PcAlCl y ácido oleico-Tween20 como surfactantes también fue evaluada anteriormente por nosotros, encontrándose valores mayores de retención en E+D (8,48 nM) utilizando piel humana (21) y de 62,49 nM/cm<sup>2</sup> en piel de ratas Wistar (16). Liposomas preparados con

diferentes proporciones fosfolípidos:Col-Na o que contienen otros surfactantes están siendo diseñados para aumentar la permeación del compuesto a la dermis.

En las ratas Wistar, la aplicación tópica 5 días postratamiento mostró una baja permeación del compuesto en piel acumulándose la mayor parte en EC. Treinta días postratamiento no se encontraron concentraciones de PcAlCl en el sitio de aplicación, lo cual podría deberse en parte a la descamación cíclica de la piel (19). Sin embargo, bajas concentraciones de PcAlCl lograron penetrar la piel, ya que se encontraron concentraciones mínimas del FS en bazo, hígado y pulmón (22). La baja permeación de la PcAlCl y su limitación a EC y E+D podría constituir una ventaja, reduciendo efectos sistémicos; sin embargo, se esperaba una mayor concentración del compuesto en dermis, que es el sitio donde se aloja el macrófago parasitado con *Leishmania*.

Aunque no se pudieron encontrar diferencias en las concentraciones de la PcAlCl en bazo y pulmón después de su aplicación tópica o i.p., esta última vía logró concentraciones detectables del compuesto en órganos como el cerebro y corazón, debido posiblemente a una mejor disponibilidad del compuesto al torrente sanguíneo (22). Dada la fototoxicidad de la PcAlCl, es necesario que este FS se deposite específicamente en los tejidos enfermos y no sistémicamente. Después de 30 días del tratamiento i.p. no se encontraron concentraciones de PcAlCl (con excepción de muy bajas concentraciones en bazo), indicando la excreción del FS.

El estudio histopatológico no reveló cambios estructurales ni sugirió reacciones alérgicas o inflamatorias, como lo son el aumento del calibre vascular y la migración de leucocitos

a la zona. Los resultados en las ratas tratadas con LUD-PcAlCl fueron similares a las tratadas con LUD-vacios.

## CONCLUSIÓN

Se requiere perfeccionar el vehículo de PcAlCl, ya que la mayor parte del compuesto se retuvo en EC.

**Financiación** Este trabajo fue financiado por Colciencias, contrato 2010-3600125183, y la Vicerrectoría de Investigaciones y Extensión de la UIS, proyecto código 1388.

**Conflicto de intereses:** Ninguno.

## REFERENCIAS

1. Romero M, Sanchez JA. Una mirada a la epidemiología y al control de la leishmaniasis zoonótica en Colombia. *Biosalud*. 2007; 6:99-111.
2. Organización Mundial de la Salud. Leishmaniasis; 2015. Disponible en: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/es/>.
3. Echeverry M, Gaona J, Gualtero, S, Agudelo C, Pardo R, Gaitan H. Guía de atención de la Leishmaniasis; 2007. Disponible en: <https://www.minsalud.gov.co/Documentos%20y%20Publicaciones/GUIAS%20DE%20ATENCIÓN%20-TOMO%20DOS.pdf>
4. Ferro C, López M, Fuya P, Lugo L, Cordovez JM, González C. Spatial distribution of sand fly vectors and eco-epidemiology of cutaneous leishmaniasis transmission in Colombia. *PLoS One*. 2015; 2:10(10):e0139391. doi: 10.1371/journal.pone.0139391.
5. Kevric I, Cappel MA, Keeling JH. New World and Old World *Leishmania* Infections: A practical review. *Dermatol Clin*. 2015; 33(3):579-593. doi: 10.1016/j.det.2015.03.018.
6. Lee Y, Baron ED. Photodynamic therapy: current evidence and applications in dermatology. *Semin Cutan Med Surg*. 2011; 30(4):199-209. doi: 10.1016/j.sder.2011.08.001. Review.
7. Ben-Hur E, Rosenthal I. The phthalocyanines: a new class of mammalian cells photosensitizers with a potential for cancer phototherapy. *Int J Radiat Biol Relat Stud Phys Chem Med*. 1985; 47(2):145-147.
8. Escobar P, Hernández IP, Rueda CM, Martínez F, Páez E. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. *Biomedica*. 2006; 26 (Supl 1):49-56.
9. Kierszenbaum, Abraham. *Histología y biología celular*. 2ª edición. Barcelona: Elsevier; 2008. p 327-349
10. Prausnitz MR, Elias PM, Franz TJ, Schmuth M, Tsai JC, Menon GK et al. Skin barrier and transdermal drug delivery. *Dermatology*. 2012; 124:2065-2073.
11. Martínez B, Della Torre A, Nacucchio M. Nuevos sistemas para la administración de activos a la dermis. *Rev Argent Dermatol*. 2010; 91(3):00-00.
12. Singh D, Pradhan M, Nag M, Singh MR. Vesicular system: Versatile carrier for transdermal delivery of bioactives. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*. 2015; 43(4):282-290. doi: 10.3109/21691401.2014.883401
13. Cevc G, Blume G. Lipid vesicles penetrate into intact skin owing to the transdermal osmotic gradients and hydration force. *Biochim Biophys Acta*. 1992; 17:1104(1):226-232.
14. Hernández IP, Montanari J, Valdivieso W, Morilla MJ, Romero EL, Escobar P. *In vitro* phototoxicity of ultradeformable liposomes containing chloroaluminum phthalocyanine against New World *Leishmania* species. *J Photochem Photobiol B*. 2012; 5:117:157-163. doi: 10.1016/j.jphotobiol.2012.09.018
15. Hernández IP, Montanari J, Escobar P. Actividad *in vitro* contra *Leishmania* y permeación en piel humana de liposomas ultradeformables de miltefosina. *Rev Cubana Med Trop*. 2014; 66(3):370-385. Disponible en: [http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci\\_](http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_)

- arttext&pid=S0375-07602014000300006&lng=es&nrm=iso
16. Rico CI, Rodríguez J, Conde CA, Mantilla JC, Escobar P. Permeación en piel y biodistribución de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) aplicada tópicamente en ratas Wistar. *Rev Argent Dermatol.* 2013; 94(2). Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-300X2013000200002](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-300X2013000200002)
  17. Subongkot T, Pamornpathomkul B, Rojanarata T, Opanasopit P, Ngawhirunpat T. Investigation of the mechanism of enhanced skin penetration by ultradeformable liposomes. *Int J Nanomedicine.* 2014; 25;9:3539-3550. doi: 10.2147/IJN.S65287. eCollection.
  18. Duangjit S, Obata Y, Sano H, Kikuchi S, Onuki Y, Opanasopit P, Ngawhirunpat T, Maitani Y, Takayama K. Mentosomes, novel ultradeformable vesicles for transdermal drug delivery: optimization and characterization. *Biol Pharm Bull.* 2012; 35(10):1720-1738.
  19. El Maghraby GM, Barry BW, Williams AC. Liposomes and skin: from drug delivery to model membranes. *Eur J Pharm Sci.* 2008; 7;34(4-5):203-222. doi: 10.1016/j.ejps.2008.05.002.
  20. Marks J, Miller J. Capítulo 2: Structure and Function of the Skin. En *Principles of Dermatology.* 5ª ed. London: Elsevier; 2013. p. 2-10.
  21. Ospina VE, Mantilla JC, Conde CA, Escobar P. Permeación en piel humana de una nanoemulsión de ftalocianina de aluminio clorada para la optimización de tratamientos tópicos de leishmaniasis cutánea. *Rev Cienc Salud.* 2014; 12(2):195-211. doi: dx.doi.org/10.12804/revsalud12.2.2014.05
  22. Lorenzo P, Moreno A, Leza J, Lizasoain I, Moro M, Portolés A. Velásquez, Capítulo 1: Absorción y Distribución de los fármacos. En *Aleixandre A. y Puerro M. Farmacología Básica y Clínica.* 18ª edición. Buenos Aires-Madrid: Panamericana; 2008. p. 1