

Efecto fototóxico de la terapia fotodinámica en promastigotes de *Leishmania amazonensis*

Wilfredo Valdivieso¹, Indira Paola Hernández¹, Fernando Martínez², Edgar Páez², Patricia Escobar¹

RESUMEN

Introducción: La terapia fotodinámica utiliza un compuesto fotosensibilizador que en presencia de luz y oxígeno molecular se activa produciendo especies reactivas de oxígeno induciendo la muerte de la célula blanco por apoptosis o necrosis. Estudios in vitro han mostrado que la ftalocianina de aluminio es fototóxica para *Leishmania* spp. **Objetivo:** El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto del tratamiento con ftalocianina de aluminio clorada en los cambios morfológicos y de la actividad mitocondrial en promastigotes de *Leishmania amazonensis*. **Materiales y métodos:** Promastigotes de *L. amazonensis* fueron incubados con ftalocianina de aluminio clorada y posteriormente irradiados con una fluencia de 17 Julios/cm². De 0, 12 y 24 horas post irradiación los parásitos fueron contados microscópicamente para determinar la inhibición del crecimiento, fueron coloreados con Giemsa para determinar el efecto en los cambios morfológicos y fueron tratados con la sonda fluorescente JC-1 para determinar los cambios en la actividad mitocondrial. **Resultados:** El tratamiento fotodinámico inhibió el número de promastigotes hasta en un 96,37 %. Se observó reducción del tamaño, fragmentación nuclear y pérdida de núcleo y/o kinetoplasto y pérdida de la actividad mitocondrial. **Conclusiones:** La terapia fotodinámica es efectiva para la eliminación de promastigotes de *L. amazonensis* posiblemente por un mecanismo similar a la apoptosis. *Salud UIS 2008; 40: 13-19*

Palabras clave: *Leishmania*, apoptosis, terapia fotodinámica, ftalocianina de aluminio clorada

SUMMARY

Introduction: Photodynamic therapy uses a photosensitizer compound that in presence of light and molecular oxygen is activated producing reactive oxygen species and target cell death by apoptosis or necrosis. In vitro studies have demonstrated the phototoxic effect of aluminium phthalocyanine on *Leishmania* spp. **Objective:** The purpose of this study was to determine the effect of chloroaluminum phthalocyanine in the morphological and mitochondrial activity changes of *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Materials and methods:** Parasites incubated with chloroaluminum phthalocyanine were irradiated with a fluency of 2.5 Julios/cm². After 0, 12 and 24 hours post irradiation, they were counted microscopically to determine the percentage of inhibition; stained with Giemsa to determine the morphological changes; and treated with the fluorescent probe JC-1 to determine changes in activity mitochondrial. **Results:** Photodynamic treatment inhibited the number of promastigotes reaching values of 96.37 %. There was observed downsizing, nuclear fragmentation and loss of nuclear core and / or kinetoplast and loss of mitochondrial activity immediately after irradiation. **Conclusions:** Photodynamic therapy is effective in eliminating promastigotes of *L. amazonensis* probably by an apoptosis like mechanism. *Salud UIS 2008; 40: 13-19*

Keywords: *Leishmania*, photodynamic therapy, apoptosis, chloroaluminum phthalocyanine

1. Centro de Investigación en Enfermedades Tropicales (CINTROP-UIS), Escuela de Medicina, Departamento de Ciencias Básicas, Facultad de Salud, Sede UIS Guatiguará.

2. Centro de Investigación en Catálisis (CICAT), Escuela de Química, Facultad de Ciencias, Universidad Industrial de Santander, Sede UIS Guatiguará.

Correspondencia: Wilfredo Valdivieso Quintero, Bacteriólogo y Laboratorista clínico, Estudiante de maestría en Ciencias Básicas biomédicas, E-mail: w_valdiv@hotmail.com, wvaldivie@gmail.com; Teléfono/fax: 00 57 76 56 3971.

Recibido: Abril 28 de 2008 - **Aceptado:** Julio 7 de 2008

INTRODUCCIÓN

La leishmaniasis es un grupo de enfermedades causadas por diferentes especies del género *Leishmania* transmitida al humano por insectos pertenecientes a la subfamilia *Phlebotominae*¹. Esta enfermedad afecta alrededor de 12 millones de personas en 88 países diferentes². Las formas clínicas van desde ulceraciones en piel y mucosas hasta el compromiso de órganos internos. En Colombia se estima que 10 millones de personas están en riesgo de adquirir la enfermedad; se reportan alrededor de 6000 casos anuales de los cuales el 95% obedece a manifestaciones de tipo cutáneo, siendo *L. panamensis* el agente etiológico más prevalente^{3,4}. Los tratamientos actuales se basan en la utilización de antimoniales pentavalentes^{5,6} como el antimoniató de meglumina (Glucantime®). En caso que este medicamento falle, se utilizan otros como el isotianato de pentamidina (Pentacarinat®)⁷, y en países del viejo mundo la anfotericina B (Fungizone®), paramomicina (aminosidine)⁸ y miltefosina (Impavido)^{9,10}. Sin embargo, el uso de estos medicamentos presentan efectividad variable¹¹⁻¹³, protocolos de administración prolongados y efectos secundarios no deseados^{6,12}. Estos inconvenientes han soportado la exploración de nuevas alternativas terapéuticas para la leishmaniasis cutánea donde se encuentra la terapia fotodinámica (TFD)^{6,14}.

La TFD se basa en la utilización de fotosensibilizadores (FS) los cuales se activan a una luz de longitud de onda apropiada produciendo especies reactivas de oxígeno (ERO) altamente inestables y tóxicas para los sistemas biológicos^{15,16}. La interacción de las ERO con lípidos, proteínas y otras moléculas cercanas al sitio donde estas se producen pueden activar mecanismos de muerte celular como apoptosis o necrosis^{17,18}. El tipo de FS, el tiempo de exposición al FS antes de la irradiación, el tipo celular estudiado y el sitio de localización intracelular entre otros determinan si las señales activadas luego del tratamiento fotodinámico llevan a la muerte celular por apoptosis o necrosis^{19,20}. Algunos FS como la ftalocianina de aluminio, la ftalocianina de silicio o la protoporfirina IX producida internamente por la célula previo tratamiento con ácido δ-aminolevulínico (ALA), pueden inducir la muerte de células tumorales por apoptosis²¹⁻²⁵. Aunque la apoptosis se pensaba como un proceso exclusivo de organismos pluricelulares, diferentes estímulos pueden inducir la muerte de promastigotes de *Leishmania spp.* por un proceso parecido a la apoptosis denominado "Apoptosis-like"^{26,27}. Algunos medicamentos como los antomoniales pentavalentes entre estos el estibogluconato de sodio (Sb^V)²⁸, la miltefosina^{29,30}, la novobiocina³¹ y otros compuestos como el peróxido de hidrógeno³² inducen la condensación del citoplasma, exposición de fosfatidilserina, fragmentación del ADN en ausencia de alteraciones de la membrana celular. También se ha visto la activación de proteasas que comparten los mismos sustratos de las caspasas en las células de mamífero³³. La apoptosis posterior a la TFD, se desencadena por el daño directo a la mitocondria que permite que se libere el citocromo C y se active la vía de las caspasas³⁴⁻³⁷.

En leishmaniasis la efectividad de la TFD ha sido demostrada en pacientes, en algunos modelos experimentales e *in vitro* utilizando diferentes FS³⁵⁻³⁹. Tratando de aportar en el conocimiento de los efectos que tiene la TFD en *Leishmania spp.*, este estudio evaluó los cambios en el crecimiento, en la morfología y en la actividad mitocondrial ($\Delta\psi_m$) de promastigotes de *L. amazonensis* luego de la TFD utilizando ftalocianina de aluminio clorada (PcAlCl) como FS.

MATERIALES Y MÉTODOS

Fotosensibilizador y parásitos

Se prepararon soluciones stock de PcAlCl (Sigma-Aldrich, USA) en dimetilsulfoxido (DMSO, Carlo Erba, Italy) 100X. Las soluciones de trabajo se prepararon diluyendo la PcAlCl en medio de cultivo (menor de 1X).

Se utilizaron promastigotes de *L. amazonensis* cepa MHOM/BR/73/LV78 (LV78) (donada gentilmente por la Dra Sara M. Robledo, PECET, UDEA). Los parásitos fueron mantenidos en cultivos seriados utilizando medio líquido Schneider suplementado con 10% de suero bovino fetal inactivado (SBFi, GIBCO Grand Island, NY, USA) a 28°C.

Ensayos de viabilidad

La viabilidad fue determinada siguiendo el protocolo descrito por Escobar y colaboradores, 2006⁴⁰. Promastigotes fueron tratados con 3 diluciones seriadas 1:3 (0 a 0.06 μ M) de PcAlCl y con HCL (1N, como control de inhibición) en placas de 24 pozos (Becton Dickinson, New Jersey, USA) por 24 horas a 28°C. Los parásitos fueron irradiados utilizando un fotorreactor biológico ($\lambda=597-752$ nm) y una fluencia de 17 J/cm². Parásitos controles fueron mantenidos sin irradiar. De 0, 12 y 24 horas post irradiación, los parásitos fueron contados microscópicamente en cámara de Neubauer diluidos en eosina amarilla 0,25 % en PBS pH=7,2 para determinar el número de parásitos vivos. Los resultados fueron expresados como el promedio de la concentración de parásitos (parásitos vivos/mL) \pm desviación estándar de 2 experimentos independientes. La inhibición del crecimiento de los parásitos fue calculada utilizando la fórmula: % de inhibición = 1 - (número de parásitos del grupo tratado / número de parásitos del grupo control) x 100. La actividad de la PcAlCl fue expresada como concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) y 90 (CI₉₀) con ayuda del programa *Mxscfit*TM (ID Business Solution, Guildford, UK)

Determinación de cambios morfológicos

Los parásitos fueron tratados con PcAlCl e irradiados como en el numeral 2.2. De 0, 12 y 24 horas post-irradiación, los parásitos fueron lavados con PBS (pH=7,2) y resuspendidos en PBS más 2 % de formalina. Aproximadamente 2x10⁵ parásitos fueron colocados en cada pozo de placas para fluorescencia, secados y coloreados con Giemsa. Fueron observados con microscopio de luz y fotografiados

utilizando una cámara digital (Nikon Coolpix 5000). Las características analizadas fueron presencia o ausencia de núcleo, kinetoplasto y/o flagelo, fragmentación del núcleo, presencia de vacuolas y pérdida de la morfología típica del promastigote.

Ensayos de actividad mitocondrial

Los cambios en el potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$) fueron determinados utilizando la sonda JC-1 (Ioduro de 5,5', 6, 6'-tetracloro - 1, 1', 3, 3' - tetraetilbenzimidazol carbocianida, Sigma Aldrich) donada amablemente por la Dra. Susana Fiorentino del grupo de Inmunobiología y Biología Celular de la Universidad Javeriana. Los parásitos fueron tratados como se describió para los ensayos de fototoxicidad. De 0, 12 y 24 horas post-irradiación, los parásitos fueron lavados con PBS y tratados con 1 μM de la sonda JC-1 por 10 minutos a 37°C. Los parásitos fueron observados microscópicamente utilizando un microscopio de fluorescencia (Nikon Eclipse E400) equipado con el filtro B2A (Ex= 450-490, DM= 500, BA=515). Se tomó registro fotográfico utilizando una cámara digital (Nikon Coolpix 5000) y las fotos fueron procesadas utilizando el programa ADOBE Photoshop CS2. Los resultados se expresaron como presencia o ausencia de $\Delta\psi_m$ y como porcentaje de despolarización (promedio \pm la desviación estándar) de cuatro (4) conteos realizados en fotos independientes utilizando la fórmula: % de despolarización = (# de células despolarizadas X 100) / total de células contadas.

RESULTADOS

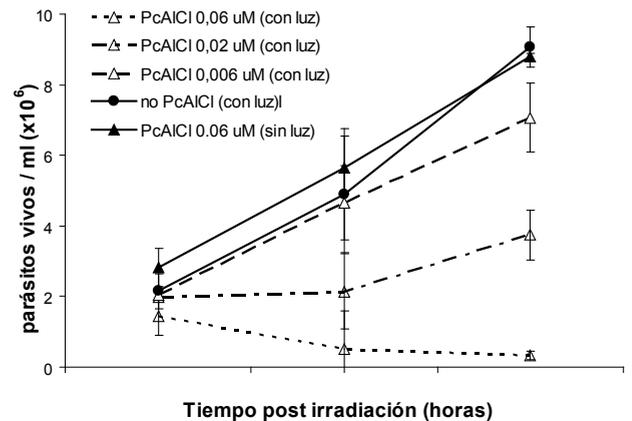
Tratamiento con PcAICI inhibe el crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis* post-irradiación

El tratamiento de promastigotes de *L. amazonensis* con PcAICI y posterior irradiación con 17 J/cm² inhibió el crecimiento de los parásitos (Figura 1a) y este efecto fue dependiente de la dosis utilizada. El crecimiento de los parásitos no tratados con luz o sin luz fue similar. El mayor porcentaje de inhibición fue observado 24 horas después de la irradiación cuando se utilizó 0,06 μM de PcAICI (96,37 % \pm 5,12) (Figura 1b) en este mismo tiempo y con esta concentración, el crecimiento de los parásitos no irradiados fué inhibidos solo en un 19,17% (\pm 1,42). El máximo efecto fue encontrado 24 horas después de la irradiación encontrándose una CI_{50} = 0,0157 μM (\pm 0.004) y CI_{90} = 0,041 μM (\pm 0.026).

Tratamiento con PcAICI induce cambios morfológicos progresivos en los parásitos post-irradiación

Los promastigotes de *Leishmania* no tratados se caracterizaron por presentar forma alargada, flagelo anterior, núcleo y kinetoplasto intactos. Inmediatamente después de irradiar, previo tratamiento con PcAICI 0,06 μM , se empezaron a observar cambios morfológicos. Los promastigotes comenzaron a hincharse perdiendo su forma alargada y presentaron vacuolas (Figura 2). A medida que

A



B

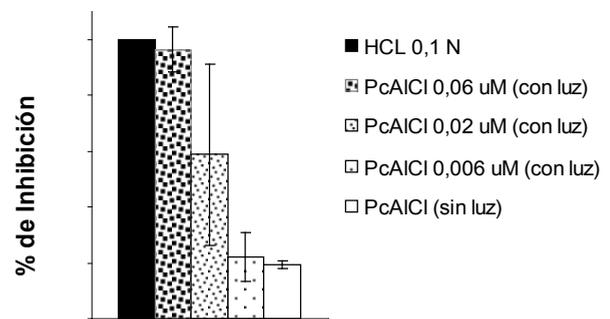


Figura 1. Crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis* post-irradiación. Los parásitos fueron tratados con 0,06 μM de PcAICI o con medio solo (no PcAICI) e irradiados a una fluencia de 17 J/cm² (con luz) o mantenidos en oscuridad (sin luz). La figura A muestra el promedio \pm la desviación estándar del número de parásitos vivos/mL contados 0, 12, 24 horas post-irradiación en dos experimentos independientes. La figura B muestra el porcentaje de inhibición de los parásitos tratados con las diferentes concentraciones de PcAICI o HCl 24 horas después de la irradiación.

transcurrió el tiempo post-irradiación (12 y 24 horas) los parásitos afectados captaron débilmente la coloración de Giemsa, algunos núcleos se observaron fragmentados y algunos parásitos se observaron sin núcleo y/o sin kinetoplasto (Figura 2). Estas variaciones morfológicas no se observaron en todos los parásitos. No se observaron cambios morfológicos en los parásitos tratados con PcAICI no irradiados.

El tratamiento fotodinámico con PcAICI induce pérdida del potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$)

Los parásitos sin irradiar no tratados incubados con la sonda fluorescente JC-1 se caracterizaron por presentar su cuerpo alargado con citoplasma verde mostrando actividad mitocondrial ($\Delta\psi_m$) evidenciada por la fluorescencia roja o amarilla observada en las mitocondrias (Figura 3A). Después de irradiar, los parásitos tratados PcAICI empezaron a mostrar pérdida en la $\Delta\psi_m$ caracterizada por disminución en el número de parásitos con mitocondrias teñidas, adicionalmente se observó pérdida de la forma alargada.

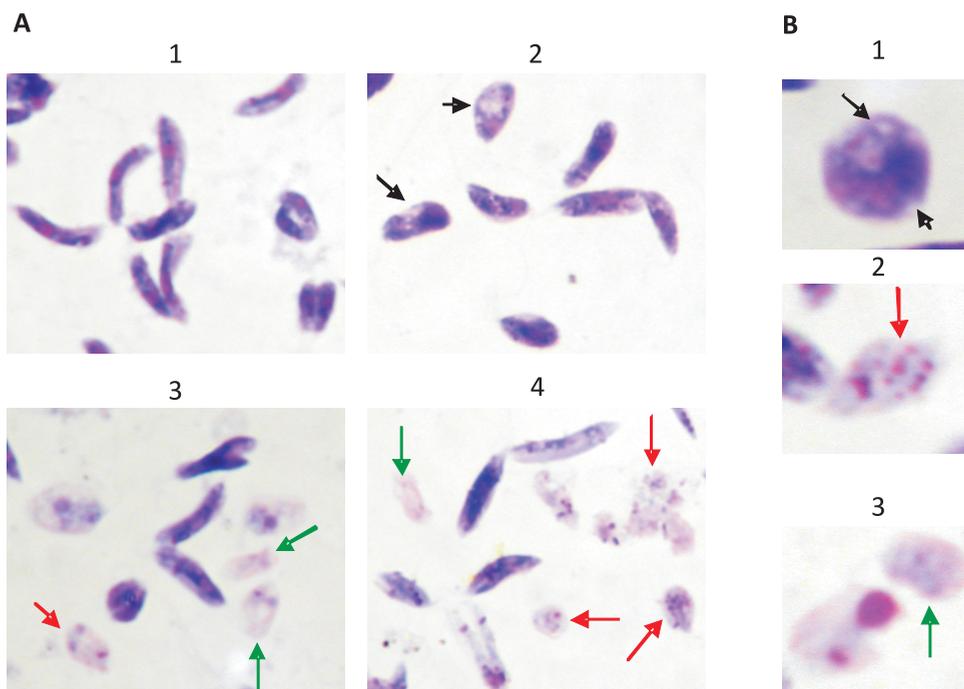


Figura 2. Cambios morfológicos inducidos para la PcAlCl post-irradiación. La figura muestra fotos de los parásitos coloreados con Giemsa y observados microscópicamente previo tratamiento con 0,06 μ M de PcAlCl e irradiación con 17 J/cm². A. Registro de los parásitos realizado inmediatamente (A2), 12 horas (A3) y 24 horas (A4) post-irradiación. La figura A1 muestra la morfología de los parásitos controles mantenidos en oscuridad. Presencia de vacuolas (flechas negras), de núcleos fragmentados (flechas rojas), pérdida de núcleo y/o el kinetoplasto (flechas verdes) B. Características morfológicas encontradas. B1: vacuolas y pérdida de la forma alargada; B2: núcleo fragmentado; B3: pérdida del núcleo y el kinetoplasto. En B2 y B3 se observa la coloración tenue en el citoplasma. Aumento 100X.

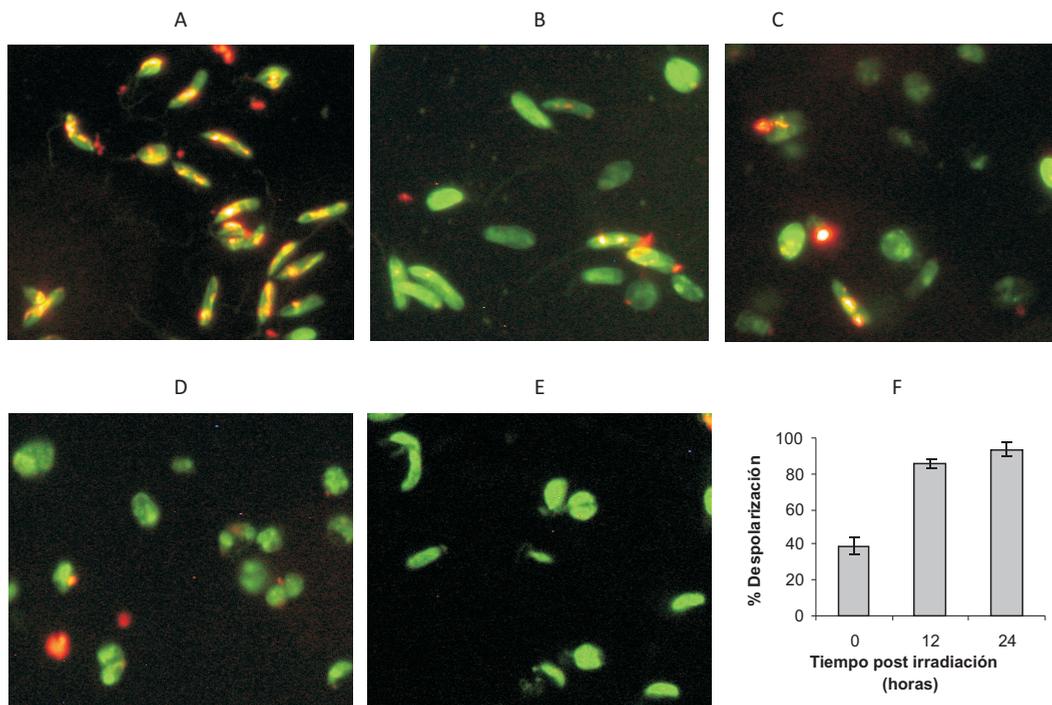


Figura 3. Cambios en la actividad mitocondrial inducidos para la PcAlCl post-irradiación. La figura muestra fotos de los parásitos tratados con la sonda fluorescente JC-1 y observados microscópicamente previo tratamiento con 0,02 μ M de PcAlCl e irradiación con 17 J/cm². Los parásitos fueron registrados 0 h (B), 12 horas (C) y 24 horas (D) post-irradiación. La foto 3A muestra las mitocondrias teñidas de rojo o amarillo (flechas blancas) de parásitos mantenidos en oscuridad; la foto 3E muestra los parásitos tratados con HCl (1N). En F se muestra la pérdida progresiva de $\Delta\psi_m$. Las fotografías son representativas de dos experimentos independientes. El porcentaje de despolarización es el promedio \pm la desviación estándar de 4 conteos realizados en fotos independientes.

La pérdida de $\Delta\psi_m$ a las 0, 12 y 24 horas fue de 39,42% \pm 4,49, 85,87% \pm 2,42 y 93,27% \pm 3,88 respectivamente. Los parásitos tratados con PcAlCl no irradiados no presentaron pérdida de $\Delta\psi_m$. Los parásitos tratados con HCL (1N) se observaron verdes, demostrando pérdida total de la $\Delta\psi_m$.

DISCUSIÓN

La PcAlCl, es un FS utilizado en terapia fotodinámica para la eliminación de células tumorales y parásitos⁴⁰⁻⁴². Este trabajo demostró el efecto fototóxico de la PcAlCl en promastigotes de *L. amazonensis* en diferentes tiempos después de irradiación. Tratamiento con PcAlCl inhibió progresivamente el crecimiento de promastigotes de *L. amazonensis* llegando a un máximo de 96,37 % 24 horas post-irradiación. Se sabe que FS como la PcAlCl cuando son irradiados a una longitud de onda específica (máxima absorción entre 650 y 770 nm)⁴³ se excitan hasta su estado de energía más alto regresando a su estado original permitiendo la transferencia de electrones al oxígeno directamente o a través de otras moléculas^{15, 44}. Dado que las ERO son producidas en el momento de la irradiación y que estas tienen una vida media muy corta²³ es posible que el aumento gradual en los porcentajes de inhibición de los parásitos observados post-irradiación se deba a la activación de mecanismos de muerte en los parásitos de tal forma que pese a la ausencia del estímulo, el parásito continúe su camino hacia la muerte.

En *Leishmania* la muerte celular programada es un mecanismo que hace parte de algunas fases del ciclo de vida^{45,46}, en la infección ya establecida⁴⁷, como respuesta a agentes físicos como la temperatura⁴⁸ y a algunos fármacos utilizados para su eliminación (i.e antimoniales, miltefosina, noboviocina)²⁸⁻³¹. La ejecución de este proceso involucra, al igual que en los mamíferos, la pérdida de la actividad mitocondrial con la subsecuente salida del citocromo C al citoplasma⁴⁹ y la activación de proteasas de cisteína^{31, 50}. También se ha visto que moléculas como la captotepcina un alcaloide que inhibe la acción de la topoisomerasa I en células de mamífero, puede inducir apoptosis en promastigotes y amastigotes de *L. donovani*⁵¹.

Los cambios morfológicos observados post-irradiación (presencia de vacuolas, reducción del tamaño celular, fragmentación de núcleo, hinchamiento de los parásitos, pérdida del núcleo y/o kineoplasto) y la pérdida gradual en la actividad mitocondrial sugieren la posibilidad que procesos de tipo apoptótico estén relacionados con el efecto fototóxico de la PcAlCl en promastigotes de *L. amazonensis*. Sin embargo es necesario el estudio de otros marcadores de muerte como la fragmentación de ADN, actividad de proteínas con actividad de caspasas y expresión de fosfatidilserina para asociar los cambios morfológicos y la pérdida de $\Delta\psi_m$ con la inducción de apoptosis por la TFD en promastigotes de *Leishmania*.

AGRADECIMIENTOS

Este proyecto fue financiado por la Universidad Industrial de Santander, proyecto DIFE Código 9007039.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses para la realización del presente trabajo

REFERENCIAS

1. Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007;7:581-96.
2. Desjeux P. Worldwide increasing risk factors for leishmaniasis. *Med Microbiol Immunol* 2001;190:77-9.
3. Davies CR, Reithinger R, Campbell-Lendrum D, Feliciangeli D, Borges R, Rodriguez N. The epidemiology and control of leishmaniasis in Andean countries. *Cad Saude Publica* 2000;16:925-50.
4. Osorio LE, Castillo CM, Ochoa MT. Mucosal leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in Colombia: clinical characteristics. *Am J Trop Med Hyg* 1998;59:49-52.
5. Yardley V, Ortuno N, Llanos-Cuentas A, et al. American tegumentary leishmaniasis: Is antimonial treatment outcome related to parasite drug susceptibility? *J Infect Dis* 2006;194:1168-75.
6. Minodier P, Parola P. Cutaneous leishmaniasis treatment. *Travel Med Infect Dis* 2007;5:150-8.
7. Croft SL, Brazil RP. Effect of pentamidine isethionate on the ultrastructure and morphology of *Leishmania mexicana amazonensis* in vitro. *Ann Trop Med Parasitol* 1982;76:37-43.
8. Armijos RX, Weigel MM, Calvopina M, Mancheno M, Rodriguez R. Comparison of the effectiveness of two topical paromomycin treatments versus meglumine antimoniate for New World cutaneous leishmaniasis. *Acta Trop* 2004;91:153-60.
9. Croft SL, Engel J. Miltefosine--discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2006;100 Suppl 1:S4-8.
10. Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 2007;25:203-11.
11. Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev* 2006;19:111-26.
12. Rojas R, Valderrama L, Valderrama M, Varona MX, Ouellette M, Saravia NG. Resistance to antimony and treatment failure in human *Leishmania (Viannia)* infection. *J Infect Dis* 2006;193:1375-83.
13. Ameen M. Cutaneous leishmaniasis: therapeutic strategies and future directions. *Expert Opin Pharmacother*

- 2007;8:2689-99.
14. Khatami A, Firooz A, Gorouhi F, Dowlati Y. Treatment of acute Old World cutaneous leishmaniasis: a systematic review of the randomized controlled trials. *J Am Acad Dermatol* 2007;57:335 e1-29.
 15. Rosenthal I, Ben-Hur E. Role of oxygen in the phototoxicity of phthalocyanines. *Int J Radiat Biol* 1995;67:85-91.
 16. Pervaiz S. Reactive oxygen-dependent production of novel photochemotherapeutic agents. *FASEB J* 2001;15:612-7.
 17. Almeida RD, Gomes ER, Carvalho AP, Duarte CB. Calpains are activated by photodynamic therapy but do not contribute to apoptotic tumor cell death. *Cancer Lett* 2004;216:183-9.
 18. Klein A, Babilas P, Karrer S, Landthaler M, Szeimies RM. Photodynamic Therapy in Dermatology - an Update 2008. *J Dtsch Dermatol Ges* 2008.
 19. Fabris C, Valduga G, Miotto G, et al. Photosensitization with zinc (II) phthalocyanine as a switch in the decision between apoptosis and necrosis. *Cancer Res* 2001;61:7495-500.
 20. Moor AC. Signaling pathways in cell death and survival after photodynamic therapy. *J Photochem Photobiol B* 2000;57:1-13.
 21. de Castro Pazos M, Pacheco-Soares C, Soares da Silva N, DaMatta RA, Pacheco MT. Ultrastructural effects of two phthalocyanines in CHO-K1 and HeLa cells after laser irradiation. *Biocell* 2003;27:301-9.
 22. Barge J, Decreau R, Julliard M, et al. Killing efficacy of a new silicon phthalocyanine in human melanoma cells treated with photodynamic therapy by early activation of mitochondrion-mediated apoptosis. *Exp Dermatol* 2004;13:33-44.
 23. Plaetzer K, Kiesslich T, Krammer B, Hammerl P. Characterization of the cell death modes and the associated changes in cellular energy supply in response to AlPcS4-PDT. *Photochem Photobiol Sci* 2002;1:172-7.
 24. Miller JD, Baron ED, Scull H, et al. Photodynamic therapy with the phthalocyanine photosensitizer Pc 4: the case experience with preclinical mechanistic and early clinical-translational studies. *Toxicol Appl Pharmacol* 2007;224:290-9.
 25. Bednarz N, Zawacka-Pankau J, Kowalska A. Protoporphyrin IX induces apoptosis in HeLa cells prior to photodynamic treatment. *Pharmacol Rep* 2007;59:474-9.
 26. Alzate JF, Arias AA, Moreno-Mateos D, Alvarez-Barrientos A, Jimenez-Ruiz A. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. *Mol Biochem Parasitol* 2007;152:192-202.
 27. Sen N, Das BB, Ganguly A, Banerjee B, Sen T, Majumder HK. *Leishmania donovani*: intracellular ATP level regulates apoptosis-like death in luteolin induced dyskinetoplastid cells. *Exp Parasitol* 2006;114:204-14.
 28. Sereno D, Holzmuller P, Mangot I, Cuny G, Ouaisi A, Lemesre JL. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2001;45:2064-9.
 29. Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother* 2004;48:852-9.
 30. Verma NK, Singh G, Dey CS. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. *Exp Parasitol* 2007;116:1-13.
 31. Singh G, Jayanarayan KG, Dey CS. Novobiocin induces apoptosis-like cell death in topoisomerase II over-expressing arsenite resistant *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol* 2005;141:57-69.
 32. Das M, Mukherjee SB, Shaha C. Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci* 2001;114:2461-9.
 33. Gonzalez IJ, Desponds C, Schaff C, Mottram JC, Fasel N. *Leishmania major* metacaspase can replace yeast metacaspase in programmed cell death and has arginine-specific cysteine peptidase activity. *Int J Parasitol* 2007;37:161-72.
 34. Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, et al. Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* 1997;91:479-89.
 35. Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, et al. The role of photosensitizer molecular charge and structure on the efficacy of photodynamic therapy against *Leishmania* parasites. *Chem Biol* 2006;13:839-47.
 36. 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.
 37. Akilov OE, Kosaka S, O'Riordan K, Hasan T. Photodynamic therapy for cutaneous leishmaniasis: the effectiveness of topical phenothiaziniums in parasite eradication and Th1 immune response stimulation. *Photochem Photobiol Sci* 2007;6:1067-75.
 38. Gardlo K, Horska Z, Enk CD, et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis by photodynamic therapy. *J Am Acad Dermatol* 2003;48:893-6.
 39. 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.
 40. Escobar P, Hernandez IP, Rueda CM, Martinez F, Paez E. Photodynamic activity of aluminium (III) and zinc (II) phthalocyanines in *Leishmania* promastigotes. *Biomedica* 2006;26 Suppl 1:49-56.

41. Kyriazi M, Alexandratou E, Yova D, Rallis M, Trebst T. Topical photodynamic therapy of murine non-melanoma skin carcinomas with aluminum phthalocyanine chloride and a diode laser: pharmacokinetics, tumor response and cosmetic outcomes. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 2008;24:87-94.
42. Hisazumi H, Hirata A, Uchibayashi T, Naito K, Miyoshi N. [Phthalocyanine: a new photosensitizer in photodynamic therapy]. *Gan To Kagaku Ryoho* 1990;17:1120-6.
43. van Lier JE, Spikes JD. The chemistry, photophysics and photosensitizing properties of phthalocyanines. *Ciba Found Symp* 1989;146:17-26; discussion -32.
44. Kolarova H, Bajgar R, Tomankova K, Nevrelva P, Mosinger J. Comparison of sensitizers by detecting reactive oxygen species after photodynamic reaction in vitro. *Toxicol In Vitro* 2007;21:1287-91.
45. Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res* 2006;123:233-44.
46. Zangger H, Mottram JC, Fasel N. Cell death in *Leishmania* induced by stress and differentiation: programmed cell death or necrosis? *Cell Death Differ* 2002;9:1126-39.
47. Lindoso JA, Cotrim PC, Goto H. Apoptosis of *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi* amastigotes in hamsters infected with visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol* 2004;34:1-4.
48. Raina P, Kaur S. Chronic heat-shock treatment driven differentiation induces apoptosis in *Leishmania donovani*. *Mol Cell Biochem* 2006;289:83-90.
49. Arnoult D, Parone P, Martinou JC, Antonsson B, Estaquier J, Ameisen JC. Mitochondrial release of apoptosis-inducing factor occurs downstream of cytochrome c release in response to several proapoptotic stimuli. *J Cell Biol* 2002;159:923-9.
50. Arnoult D, Akarid K, Grodet A, Petit PX, Estaquier J, Ameisen JC. On the evolution of programmed cell death: apoptosis of the unicellular eukaryote *Leishmania major* involves cysteine proteinase activation and mitochondrion permeabilization. *Cell Death Differ* 2002;9:65-81.
51. Sen N, Das BB, Ganguly A, Mukherjee T, Bandyopadhyay S, Majumder HK. Camptothecin-induced imbalance in intracellular cation homeostasis regulates programmed cell death in unicellular hemoflagellate *Leishmania donovani*. *J Biol Chem* 2004;279:52366-75.