

Artículo original

***Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze: una nueva promesa para el tratamiento tópico de la leishmaniasis cutánea**

***Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze: a new promise for the topical treatment of cutaneous leishmaniasis**

✉ Sara M. Robledo*, ✉ Juliana Quintero, ✉ Jorge Higueta, ✉ Maritza Fernández,
✉ Javier Murillo, ✉ Adriana Restrepo, ✉ Natalia Arbeláez, ✉ Andrés Montoya,
✉ Victoria Ospina, ✉ Tatiana Pineda, ✉ Lina M. Yepes, ✉ Yulieth Upegui, ✉ Iván D. Vélez

Programa de Estudio y Control de Enfermedades Tropicales- PECET, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia

Sara M. Robledo, artículo de posesión para admisión como miembro correspondiente a la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Resumen

Ante la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos para el tratamiento de la leishmaniasis cutánea que sean efectivos, seguros, de mayor aceptación entre los pacientes, fáciles de administrar en los entornos rurales y más económicos, en el presente estudio se evaluó *in vitro* e *in vivo* el potencial terapéutico y el perfil de citotoxicidad de un extracto etanólico y un extracto glicólico de las ramas de *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze y sus respectivas formulaciones: loción y emulsión. Asimismo, se validó la utilidad de las dos formulaciones como tratamiento tópico en diez pacientes con leishmaniasis cutánea no complicada. Ambos extractos fueron activos contra *Leishmania braziliensis* en concentraciones de menos de 22 µg/mL, tuvieron baja toxicidad en las células U-937 y HL60 cuando se administraron en forma pura y en las células Hep G2 y Detroit 551 cuando se administraron en concentraciones de menos de 20 %. Ni los extractos ni las formulaciones fueron irritantes o corrosivos y no causaron ningún otro tipo de toxicidad dérmica. La exposición de fibroblastos al extracto glicólico y a las formulaciones favoreció su migración y la reparación de la monocapa luego de 16 horas de contacto, permitiendo cierres de la brecha entre 33,9 y 70,9 %. Tanto los extractos como las formulaciones favorecieron la curación completa de los hámsteres con leishmaniasis cutánea en porcentajes mayores al 80 %. La loción y la emulsión se absorben y penetran en la piel después de su aplicación y, aunque se alcanzan a detectar en plasma hasta las 24 h (la loción) o las 6 h (la emulsión) de la aplicación, la mayor parte queda retenida en la piel. Por último, el tratamiento de los diez pacientes con la loción y la emulsión logró la curación completa de las lesiones con la reparación de la piel dañada y sin efectos adversos. En conclusión, los resultados demostraron las propiedades leishmanicidas y cicatrizantes de *C. spinosa*, lo que le permitiría ser una alternativa segura para el tratamiento local de la leishmaniasis cutánea. Es necesario validar estos resultados en ensayos clínicos controlados y determinar la eficacia y la seguridad del tratamiento con los productos fitoterapéuticos de *C. spinosa*.

Palabras clave: *Leishmania braziliensis*; *Mesocricetus auratus*; Desarrollo medicamentos; Toxicidad; Actividad leishmanicida; Tratamiento.

Abstract

Given the need to develop new drugs for the treatment of cutaneous leishmaniasis, not only effective and safe, but also more widely accepted by patients, easily administered in rural settings and cheaper, in the present study the *in vitro* and *in vivo* therapeutic potential and cytotoxicity profile of an ethanolic and a glycolic extracts obtained from the branches of *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze and their respective formulations (lotion and emulsion) were evaluated. Finally, the usefulness of the two formulations as topical treatment was validated in 10 patients with

Citación: Sara M. Robledo, Juliana Quintero, Jorge Higueta, *et al.* *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze: una nueva promesa para el tratamiento tópico de la leishmaniasis cutánea. Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat. 44(173):915-936, octubre-diciembre de 2020. doi: <https://doi.org/10.18257/raccefyn.1247>

Editor: Gustavo Adolfo Vallejo

***Correspondencia:**

Sara M. Robledo;
sara.robledo@udea.edu.co

Recibido: 25 de junio de 2020

Aceptado: 27 de agosto de 2020

Publicado: 5 diciembre de 2020



Este artículo está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-Compartir Igual 4.0 Internacional

uncomplicated CL. Both extracts were active against *L. braziliensis* at concentrations <22 µg / mL, with low toxicity in U-937 and HL60 cells when administered pure and for Hep G2 and Detroit 551 cells when administered at concentrations <20%. Neither the extracts nor the formulations were irritating or did not cause any corrosive or any other sign of dermal toxicity. The exposure of fibroblasts to the glycolic extract and to the formulations favored the migration of fibroblasts and repair of the monolayer after 16 h of contact, allowing the closing of the gap between 33.9% and 70.9%. Both the extracts and the formulations favored the complete cure of the hamsters with cutaneous leishmaniasis in percentages greater than 80%. After being applied to the skin, lotion and emulsion are absorbed, penetrate, and although they can be detected in plasma up to 24 hours (the lotion) or 6 hours (the emulsion) after application, most of the products it is retained in the skin. Lastly, the treatment of 10 patients with the lotion and the emulsion showed the complete healing of the lesions with the repair of the damaged skin and without adverse effects. In conclusion, the results demonstrate leishmanicidal and healing properties for *C. spinosa* that give it the potential to become a safe alternative for the local treatment of cutaneous leishmaniasis. It is necessary to validate these results in controlled clinical trials and determine the efficacy and safety of treatment with *C. spinosa* phytotherapeutic products.

Keywords: *Leishmania braziliensis*; *Mesocricetus auratus*; Drug development; Toxicity; Leishmanicidal activity; Treatment.

Introducción

La leishmaniasis cutánea (LC) es una enfermedad infecciosa causada por varias especies de un protozoo perteneciente al género *Leishmania* que afecta las áreas de la piel expuestas a la picadura de insectos flebotómicos. La enfermedad es endémica en 98 países y dos territorios (**World Health Organization, 2010; Alvar, et al., 2012**) y se la considera una de las enfermedades tropicales más desatendidas por sus fuertes vínculos con la pobreza (**Alvar, et al., 2006**), lo que a su vez es la causa del poco interés que tiene la industria farmacéutica para trabajar en el desarrollo de nuevos y mejores tratamientos (**Trouiller, et al., 2002**).

La LC se manifiesta con lesiones en la piel, ya sea nódulos, pápulas, placas, o úlceras, que al curarse dejan cicatrices que permanecen por el resto de la vida. Las lesiones y las cicatrices alteran la apariencia física de los enfermos y afectan su aceptación personal y social, lo que produce estigmatización, y, con ello, trastornos psicológicos y sufrimiento (**Bennis, et al., 2017**). Dado el impacto de la LC en la carga real de la enfermedad en términos de años de vida vividos con discapacidad, el tratamiento adecuado y oportuno permite, no solo aliviar los signos y síntomas de la enfermedad, sino también mejorar la calidad de vida de los pacientes

Los tratamientos disponibles son insuficientes debido a las muchas desventajas que presentan: i) la eficacia, que varía en función de la especie de *Leishmania*; ii) la necesidad de usar altas dosis en esquemas de uso prolongado, lo que favorece el abandono del tratamiento y, por ende, la aparición de cepas de parásitos con sensibilidad disminuida o resistentes al medicamento; iii) la alta toxicidad evidenciada por los efectos adversos, que varían en frecuencia y gravedad dependiendo del medicamento, y iv) los costos indirectos de atención causados por la toxicidad y la eficacia cada vez más baja (**Hotez, et al., 2013, Cardona-Arias, et al., 2017a**). Estas limitaciones enfatizan la necesidad de desarrollar nuevos medicamentos que sean no solo efectivos y seguros, sino también de mayor aceptación por los pacientes, de fácil administración en los entornos rurales y más económicos.

La investigación fitoquímica basada en la información etnofarmacológica a partir de plantas superiores (angiospermas) es una estrategia eficaz en el descubrimiento de nuevos agentes antiinfecciosos. Colombia es uno de los países más biodiversos, pues cuenta con el 27 % de los géneros de flora y el 12 % de las especies y entre las 12 familias más diversificadas del planeta se encuentran las leguminosas, de las cuales el país cuenta con 173 géneros y 1.068 especies, muchas de ellas con usos maderables y medicinales (**Rangel, 2015**).

Caesalpinia spinosa (Molina) Kuntze (Caesalpinaceae) es una especie nativa del Perú, ampliamente distribuida en Venezuela, Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y hasta el norte de Chile, que crece de manera silvestre o cultivada en varios de estos países. Se conoce

con el nombre común de “divi divi de tierra fría”, “guarango”, “cuica”, “serrano”, “tara” (Colombia), “vinillo”, “guarango” (Ecuador), “tara” (Bolivia, Chile, Venezuela) y “tara” o “taya” (Perú) (Narváez, *et al.*, 2009). En Colombia está presente en las cordilleras Oriental y Central, principalmente en climas medios y fríos entre los 1.500 y 2.900 m s.n.m. En forma natural se presenta en lugares semiáridos con un promedio de pluviosidad anual de 230 a 500 mm. También se le observa en cercos o linderos, como árbol de sombra para los animales, y dentro de cultivos de secano; además, se la usa como planta ornamental y no se la considera una especie amenazada. Los frutos (semillas y vainas), las ramas y las hojas son la fuente de compuestos polifenólicos (taninos), una goma espesa (polisacárido compuesto de cadenas lineales de (1-4) - β -D-mano-piranosas, ramificadas mediante enlaces (1-6) con unidades de α -D-galactopiranosas en una proporción de 3:1 (Rigano, *et al.*, 2019), que se utiliza en varios alimentos y en pinturas, así como en la industria cosmética, química y farmacéutica (De la Cruz-Lapa, 2004). Las ramas contienen compuestos del tipo de homoisoflavanos (4'-hidroxi-7-metoxi-3-bencil-2H-cromeno y 3,4-cis-di-O-3-hidroxi-7-metoxi-3-(4-hidroxibencil)-4-etoxicroman), de cumarina (7-metoxi-3-(4-hidroxibencil)cumarina) y de compuestos fenólicos (bonducelina, anemarcumarina A, (+)-sirin-garesinol, curuilligan D, escopoletina y p-hidroxibenzaldehído) (He, *et al.*, 2016).

En la medicina tradicional las semillas y las vainas se usan para tratar amigdalitis, úlceras gástricas e infecciones de la piel debido a su alto contenido de taninos (Horler & Nursten, 1961) y sus propiedades antibacteriales, antitumorales, astringentes, antiinflamatorias y cicatrizantes (De la Cruz, *et al.*, 2007). El extracto etanólico (EtOH) de las vainas tiene actividad contra bacterias Gram positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis* y *Enterococcus faecalis*) y Gram negativas (*Bacteroides fragilis*) (Kloucek, *et al.*, 2005), pero también actividad antioxidante (Skowrya, *et al.*, 2013). Asimismo, una fracción enriquecida en polifenoles hidrolizables obtenida de las vainas ha demostrado actividad citotóxica contra células humanas K562 de leucemia eritrocítica (Castañeda, *et al.*, 2012) y actividad antitumoral en el modelo murino de cáncer de mama (Urueña, *et al.*, 2013). Además, se ha demostrado que el éster metílico del ácido 3,4,5-tri-O-galoilquinico obtenido a partir del extracto EtOH de las vainas tiene propiedades como intensificador de la sensibilidad a betalactámicos en cepas de *S. aureus* resistentes a la meticilina (Kondo, *et al.*, 2006) y que el galactomanano purificado de las vainas induce la maduración fenotípica de las células dendríticas aumentando la expresión de las citocinas proinflamatorias IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-12p70 y TNF- α (Santander, *et al.*, 2011). Hasta la fecha no hay información relacionada con el uso medicinal de las ramas ni de extractos diferentes al EtOH.

Dadas estas propiedades medicinales, el presente trabajo tuvo como objetivo evaluar el potencial leishmanicida de extractos de las ramas de *C. spinosa* y validar la utilidad de productos formulados con dichos extractos en el tratamiento local de la LC.

Materiales y métodos

Material vegetal

Las ramas adultas de *C. spinosa* fueron suministradas por Bionest S.A.S (Duitama, Boyacá). El comprobante de identificación reposa en el Herbario Nacional Colombiano de la Universidad Nacional de Colombia (No COL-514056). Las ramas se colocaron en una superficie limpia, separadas unas de otras y se mantuvieron a temperatura ambiente en un lugar aireado, cubierto y seco. El material seco se trituroó con la ayuda de un molino hasta obtener un polvo fino. El producto se almacenó en condiciones de temperatura y humedad controladas.

Preparación de los extractos

Los extractos fueron elaborados por Bioextractos Naturales (Bogotá, D.C, Colombia). Para la obtención del extracto EtOH, el material vegetal seco y molido se colocó en un recipiente color ámbar al que se le adicionó la misma cantidad (p/v) de una mezcla de alcohol al 70 % y agua desmineralizada (relación 3:1). Se agitó la mezcla y se dejó en

reposo durante 10 días, revolviendo ocasionalmente; cumplido este tiempo, se filtró la mezcla en un lienzo y se descartó el ripio. Para la obtención del extracto glicólico (G), al material vegetal seco y molido se le adicionó la misma cantidad (p/v) de una mezcla de polietilenglicol y agua desmineralizada (relación 3:1). Se calentó la mezcla a 60 °C durante 30 minutos y se dejó en reposo durante 10 días al cabo de los cuales se filtró para desechar los detritos. Ambos extractos se conservaron a una temperatura ambiente entre 15 y 20 °C.

Para las pruebas de actividad leishmanicida se concentró al vacío *in vitro* una muestra de 100 mL de cada extracto (SpeedVac® Concentrator Savant SPD111V, Thermo Scientific, USA) a una temperatura de 35 °C durante 3 h y después se preparó una solución con una concentración de 1,0 mg/mL en solución salina con tampón de fosfatos (PBS).

Cultivo de las células

La actividad citotóxica se evaluó en varios tipos de células: promonocitos humanos (U937, CRL-1593.2), células hepáticas humanas (Hep G2, HB-8065), promieloblastos de sangre periférica humana (HL60, CCL-240) y fibroblastos de piel humana (Detroit 551, CCL-110) (American Type Cell Collection-ATCC, Manassas, VA, USA). Las células se mantuvieron cultivadas en condiciones estándar en medio RPMI-1640 (U937) o en EMEM (Hep G2, Detroit 551) enriquecido con 10 % de suero bovino fetal (SBF) inactivado y 1 % de antibióticos (100 U/mL de penicilina y 0,1 mg/mL de estreptomycin), el cual se denomina medio “completo”. Todas las células se mantuvieron en incubación a 37 °C en una atmosfera con 5 % de CO₂.

Cultivo de los parásitos

Se empleó la cepa de *L. (V) braziliensis* transfectada con el gen de la proteína verde fluorescente (MHOM/CO/88/UA301-EGFP) (Pulido, *et al.*, 2012). Los parásitos se mantuvieron en el estadio de promastigotes cultivados en medio bifásico Novy-MacNeil-Nicolle (NNN) y PBS con glucosa, con un pH de 6,9 e incubación a 26 °C (Ladopoulos, *et al.*, 2015). Estos promastigotes se usaron en los ensayos de infección de células U937 y de los hámsteres.

Alojamiento de los animales

Los estudios de respuesta terapéutica se hicieron en hámsteres, en tanto que en los estudios de toxicidad se utilizaron ratas Wistar y ratones albinos suizos comprados en Charles River Laboratories International, Inc. (Wilmington, MA, USA) y criados en el bioterio libre de patógenos específicos (*spf*) de la Universidad de Antioquia. Los animales se mantuvieron en un ambiente de humedad relativa y fotoperiodo controlados y se alimentaron a voluntad con dieta estándar (LabDiet 5010®) y agua potable esterilizada en autoclave.

Ensayo de citotoxicidad *in vitro*

Se dispensaron células U937, HL60, Detroit y Hep-G2 en una densidad de 10,000 células en cada pozo de un plato de 96. A las 24 h de incubación, partiendo de una concentración inicial del 100 % se hicieron seis diluciones en relación de 1:2 de los extractos y el medio de cultivo correspondiente (DMEM o RPMI-1640) (50 - 25 - 12,5 - 6,25 - 3,125 - 1,56 %, v/v). La citotoxicidad se evaluó a las 72 horas usando el ensayo del bromuro 3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difenil tetrazolio (MTT) (Sigma-Aldrich) y siguiendo la metodología descrita por Upegui, *et al.* (2019). Se usaron células cultivadas bajo las mismas condiciones en ausencia de extractos como control es de viabilidad (no toxicidad), en tanto que las células expuestas a DMSO (Sigma-Aldrich) al 6 % se usaron como control de toxicidad.

La citotoxicidad se determinó según el porcentaje de mortalidad con cada concentración del extracto, según las densidades ópticas (DO) obtenidas en cada condición experimental y en comparación con las DO obtenidas de las células no expuestas a los extractos usando la ecuación 1: % de mortalidad = $1 - [\text{DO de células expuestas al compuesto} \div \text{DO de células no expuestas}] \times 100$. Se estableció la relación entre la concentración de extractos (x) y el porcentaje de inhibición (y) y se calcularon los valores de la concentración letal media (CL₅₀) usando el programa estadístico Prism 8 (GraphPad Software Inc., USA). La

citotoxicidad de cada extracto se clasificó según los valores de CL_{50} usando la siguiente escala: citotoxicidad alta para $CL_{50} < 50$ % (v/v) o < 100 $\mu\text{g/mL}$, moderada para $CL_{50} > 50$ % y < 80 % (v/v) o > 100 y < 200 $\mu\text{g/mL}$, y baja para $CL_{50} > 80$ % (v/v) o > 200 $\mu\text{g/mL}$.

Ensayo de actividad leishmanicida in vitro

Se infectaron células U937 (3×10^5 células/mL de medio RPMI-1640 enriquecido con SFB y antibióticos y 0,1 $\mu\text{g/mL}$ de acetato miristato de forbol con promastigotes de *L. braziliensis* en fase estacionaria de crecimiento (día 5 del cultivo) en una concentración de 45×10^5 parásitos/mL de medio RPMI-1640 “completo”. A las 3 h de incubación a 34 °C y 5 % de CO_2 se retiraron los parásitos extracelulares mediante lavados con PBS. A cada pozo se le adicionó medio fresco y los platos se incubaron nuevamente a 34 °C y 5 % de CO_2 . A las 24 h se reemplazó el medio por medio fresco que contenía la correspondiente concentración del extracto a evaluar (50 - 12,5 - 3,1 o 0,8 $\mu\text{g/mL}$). Para aquellos extractos con valores de $CL_{50} < 50$ $\mu\text{g/mL}$, la máxima concentración evaluada fue el doble de la CL_{50} determinada previamente, con el fin de garantizar la viabilidad de las células durante el ensayo. A las 72 h de incubación a 34 °C y 5 % de CO_2 las células se leyeron en un citómetro de flujo (Cytomics FC 500MPL) siguiendo la metodología descrita por **Pulido, et al.** (2012). Se usaron células infectadas no expuestas a los extractos como control de la infección, en tanto que se usaron células infectadas expuestas a anfotericina B (Sigma-Aldrich) como control interno de la actividad leishmanicida. Se realizaron dos ensayos con tres réplicas por cada concentración evaluada.

La actividad leishmanicida se determinó a partir de la cantidad de parásitos en las células infectadas obtenidas para cada concentración de extracto o compuesto según el número de eventos positivos para la fluorescencia verde en un diagrama de puntos y la intensidad media de fluorescencia (IFM) en el histograma. La inhibición de la infección, es decir, la disminución de la cantidad de parásitos debido al efecto de los extractos, se calculó utilizando la ecuación 2: % de inhibición de la infección = $100 - [(IFM \text{ células infectadas y expuestas} / IFM \text{ células infectadas y no expuestas}) \times 100]$. Se calcularon los valores de la concentración efectiva media (CE_{50}) usando el programa estadístico Prism 8 (GraphPad Software Inc., USA). Al igual que la citotoxicidad, la actividad leishmanicida se clasificó según los valores de CE_{50} así: actividad alta para $CE_{50} < 25$ $\mu\text{g/mL}$; actividad moderada para $CE_{50} > 25$ a < 50 $\mu\text{g/mL}$, y actividad baja para $CE_{50} > 50$ $\mu\text{g/mL}$. La actividad citotóxica se correlacionó con la actividad leishmanicida calculando el índice de selectividad (IS) con la ecuación $IS = CL_{50} \div CE_{50}$.

Preparación de las formulaciones

Con los extractos G y EtOH se preparó una formulación magistral en emulsión y en loción, respectivamente. Dichas formulaciones fueron elaboradas por Biohealthy SD S.A.S (Medellín, Colombia) ajustándose a la regulación colombiana en buenas prácticas de manufactura (BPM). La loción contiene extracto EtOH, carbopol y agua; por su parte, la emulsión contiene extracto G y excipientes (caprilato de coco, alcohol cetílico, ácido cítrico, EDTA, metoxi-cinamato de etilhexilo, glicerina, estearato de glicerilo, aceite mineral, aceite de ricino hidrogenado, fenoxietanol, etilhexilglicerina poliacrilato de sodio, acetato de tocoferilo y agua).

Caracterización de extractos y productos formulados por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)

Para la extracción de los metabolitos se partió de 100 mg de cada tratamiento (extractos EtOH y G, loción y emulsión), a los cuales se les adicionaron 400 μL de acetonitrilo y 400 μL de metanol. Cada muestra se agitó vigorosamente en agitador vórtex durante 2 minutos y luego se sometió a sonicación en baño de ultrasonido (FB11201, Fisherbrand, EEUU) durante 10 minutos a una temperatura inferior a 35 °C. Las muestras se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 minutos (Megafuge40R, Thermo Scientific, USA), se separó el sobrenadante del sedimento y se llevó al evaporador rotativo (SpeedVac Concentrator Savant SPD111V, Thermo Scientific, USA) a una temperatura de 35 °C durante 3 h. Posteriormente cada muestra se resuspendió en 200 μL de metanol.

Para la extracción en fase sólida (*solid-phase extraction*, SPE), se utilizaron cartuchos SPE para fase normal (Strata® SI-1, Phenomenex®, USA) activados con 2 mL de metanol y agua al 30 % (v/v) y cartuchos SPE para fase reversa (Strata® C18-E, Phenomenex®, USA) activados con 2 mL de metanol. Para la elución a través de los cartuchos SPE se centrifugó a 1.200 rpm durante 10 minutos. Inicialmente las muestras resuspendidas en metanol se eluyeron a través del cartucho SPE para fase normal con 3 mL de metanol y, a continuación, los 3,2 mL de metanol recuperados se pasaron por cartuchos SPE para fase reversa y se eluyeron otros 3 mL de metanol mediante dichos cartuchos. Por último, los 6,2 mL recolectados se llevaron al evaporador rotativo y las muestras ya evaporadas se resuspendieron en 1 mL metanol y se filtraron en acrodiscos de 0,22 µm depositándolos en viales para la HPLC.

Las muestras se analizaron en un equipo Chromaster® (Hitachi, China) equipado con un detector PDA a una longitud de onda de 257 nm, una columna Synergi™ 4 µm Hydro-RP 80 Å (4,6 x 150 mm) con una precolumna KJ0-4282 (Phenomenex®, USA) y cartuchos de C18 (Phenomenex®, USA). Las fases móviles fueron: A (agua miliQ con 0,01 % de ácido trifluoroacético) y B (acetonitrilo) a 40°C.

El método de elución consistió en un flujo de 0,5 mL/min con 90 % de A y 10 % de B durante los primeros dos minutos y, posteriormente, su paso por un gradiente lineal en las fases de 90 a 10 % de A y de 80 a 20 % de B entre el minuto 2 y el 4; se continuó con el mismo flujo isocráticamente hasta el minuto 14. Del minuto 14 al 16 se utilizó un gradiente lineal pasando de 80 % de A y 20 % de B a 60 % de A y 40 % de B y se continuó isocráticamente hasta el minuto 25; entre el minuto 20 y el 25 se estableció un gradiente en el flujo pasando de 0,5 a 1 mL/min y se continuó isocráticamente hasta el minuto 30. Entre el minuto 25 y el 30 las fases pasaron de 60 a 40 % de A hasta 10 a 90 % de B y luego continuaron isocráticamente hasta el minuto 33, en tanto que el flujo cambió de 1,0 a 0,5 mL/min en el mismo tiempo. Del minuto 33 al 35 se retornó a la condición inicial hasta alcanzar un tiempo total de 37 minutos. Antes de cada inyección de las muestras se corrió un blanco con el cual se realizó la corrección de la línea base. Los cromatogramas se procesaron utilizando el programa Clarity VA y se corrieron tres veces.

Análisis organoléptico, fisicoquímico y microbiológico

La determinación organoléptica de las muestras EtOH y G de los extractos y de sus productos formulados se llevó a cabo analizando cualitativamente los siguientes parámetros sensoriales: i) aspecto, ii) consistencia (blanda, semidura o dura a temperaturas entre 0 y 20 °C); iii) olor; iv) color, v) impurezas visibles, y vi) textura; no se evaluó el parámetro de sabor. Una muestra de cada extracto, así como de la loción y la emulsión, se observaron bajo el microscopio convencional con objetivos de 40x y 100x. Los análisis fisicoquímico y el microbiológico se ajustaron a los métodos descritos en la *United States Pharmacopeia* (USP 39, 2016).

Ensayo de respuesta leishmanicida in vivo

Cuarenta hámsteres se infectaron experimentalmente con 1×10^8 promastigotes de *L. braziliensis* en fase estacionaria de crecimiento en 100 µL de PBS por vía intradérmica en la piel del dorso. Una vez aparecieron úlceras, los hámsteres se distribuyeron aleatoriamente en cinco grupos (n: 8 en cada grupo). Dos grupos de hámsteres se trataron con 40 µL/día de los extractos G y EtOH, otros dos grupos se trataron con 40 mg/día de emulsión o crema y un quinto grupo se trató con 40 mg/día de la loción en combinación con la emulsión. Cada uno de los tratamientos tuvo una duración de 30 días. Un sexto grupo de hámsteres fue tratado con antimonio de meglumina (AM) (200 µg) administrado por vía intralesional dos veces a la semana durante cuatro semanas. Una vez finalizado el tratamiento, se hizo seguimiento durante tres meses. El bienestar animal se supervisó diariamente durante el estudio para detectar cambios en el comportamiento, el consumo de agua y alimentos y la apariencia de la orina y las heces.

La efectividad de cada tratamiento se determinó comparando los tamaños de las lesiones antes y después de los tratamientos. El tamaño de la lesión se midió al final del tratamiento (TD30) y en los días 30, 60 y 90 (PTD30, PTD60 y PTD90, respectivamente)

contados a partir del último día de tratamiento (**Robledo, et al., 2012**). Al final del estudio se consideraron los siguientes resultados del tratamiento: cura (curación del 100 % del área y desaparición completa de la lesión); mejoría (cualquier porcentaje de reducción en el área de la lesión), y falla (cualquier aumento en el tamaño de la lesión comparado con el tamaño inicial). La toxicidad de los extractos y las formulaciones en emulsión y loción en dosis repetida (30 días de tratamiento) se determinó con base en los cambios en el peso corporal durante y después del tratamiento y los niveles en suero de la alanina aminotransferasa (ALT), el nitrógeno ureico en sangre (BUN) y la creatinina antes del tratamiento (TD0) y en el día 8 después del tratamiento (PTD8).

Ensayo de cicatrización in vitro

Para determinar el efecto tanto de los extractos G y EtOH como de la emulsión y la loción en el cierre de una herida se utilizó el kit de cicatrización de heridas CytoSelect™ (Cell Biolabs, Inc.), siguiendo la metodología descrita por **Montoya, et al. (2015)**. Brevemente, se sembraron fibroblastos Detroit 551 ($2,5 \times 10^5$ /mL) en medio DMEM “completo” en cada uno de los pozos que contenía los insertos para demarcar la brecha en la monocapa de las células. Tres pozos se dejaron sin inserto para permitir la formación de la monocapa (100 % de confluencia). Los platos se incubaron durante 24 h. Después de retirar los insertos de los pozos, las células se trataron con cada extracto al 5, 10 y 20 % o con la emulsión y la loción en concentraciones de 10 µg/mL, 20 µg/mL y 40 µg/mL. Los platos se incubaron nuevamente durante 24 h a 37 °C en 5 % de CO₂.

El efecto de los extractos en el cierre de la brecha se determinó según la migración de los fibroblastos en la zona de la brecha mediante fotografías con el microscopio a las 8, 16 y 24 h. Se calculó el porcentaje de cierre de la brecha para cada extracto o formulación y concentración evaluada en comparación con la migración observada en el pozo de control (células no tratadas). Como control positivo (control positivo) se utilizó medio DMEM con 20 % de FBS, y como control negativo (control negativo), medio DMEM con 10 % de SFB y 0,02 % de DMSO. Para cuantificar el efecto cicatrizante se calculó el porcentaje de cierre de la brecha usando la ecuación 3: Cierre de la brecha (%) = [(compuesto de prueba (%) - control no tratado (%)) / (área confluyente (%) - control no tratado (%))] × 100 (3).

Ensayo de irritación y corrosión in vitro

El potencial corrosivo e irritante para la piel se evaluó usando piel de hámster según las guías de la *Organisation for Economic Co-operation and Development-OECD 431 (OECD, 2019a)* y *OECD 439 (OECD, 2019b)*, respectivamente. Los tejidos se transfirieron al medio RPMI-1640 “completo” durante una hora antes de hacer el ensayo. Luego, se aplicaron sobre cada pieza de tejido 40 µL de cada extracto o 40 mg de cada formulación.

En la prueba de corrosión cutánea se utilizó como control positivo una solución de KOH 8N y como control negativo se usó PBS. Los platos se incubaron a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 3 y 60 minutos. Se determinó la viabilidad celular mediante el ensayo con solución MTT descrito previamente. Para la prueba de irritación cutánea se usó como control positivo una solución de SDS al 20 % y como control negativo, PBS. Los tejidos se incubaron a 37 °C con 5 % CO₂ durante 42 minutos, se lavaron y se les agregó medio fresco para ser incubados de nuevo a 37 °C con 5 % de CO₂ durante 42 h. La viabilidad celular se midió por reducción del compuesto MTT como se describió previamente. El potencial de irritación o corrosión de la sustancia en evaluación se determinó de acuerdo a la clasificación de la Unión Europea (EU, R38). Cada prueba se llevó a cabo por triplicado.

Estudio de toxicidad dérmica aguda

El estudio se hizo en 23 ratones de la cepa albino suizo distribuidos en cinco grupos: grupo de “extracto EtOH” (n=5), grupo de “extracto G” (n=5), grupo de “loción” (n=5), grupo de “emulsión” (n=5), y grupo de “control sin tratamiento” (n=3), siguiendo las recomendaciones establecidas en la guía 402 de la OCDE (**OECD, 2017**). En cada ratón se aplicaron 100 µL del extracto EtOH o del G o 40 mg de la loción o la emulsión, por una sola vez. Al grupo de control no se le aplicó ninguna sustancia. El producto se mantuvo en

contacto con la piel durante 24 h y se observó periódicamente en busca de cualquier reacción posterior a la aplicación de los productos. Los ratones permanecieron bajo observación durante 14 días. Antes de la aplicación de los productos (DT0) y luego de los días 7 y 15 del tratamiento (DPT7 y DPT15, respectivamente) se hizo un registro fotográfico de la zona de aplicación del producto y se obtuvo el peso corporal. Se supervisó la apariencia de la piel tratada y se registró la presencia de algún signo asociado con toxicidad, el momento de su aparición, su naturaleza, gravedad y duración, así como de la muerte de los ratones (en caso de que ocurriera). En el DPT15 se practicó la eutanasia a los ratones en cámara de CO₂ y se les hizo la necropsia y se tomaron muestras de la piel tratada, del hígado y el riñón para el estudio histológico.

Estudio de absorción y penetración cutánea in vivo

El estudio se hizo en 12 ratas machos de la cepa Wistar de 12 semanas de edad distribuidas en tres grupos: grupo de “emulsión” (n=4), grupo de “loción” (n=4) y grupo de “control no tratado” (n=4), siguiendo las recomendaciones establecidas en la guía 427 de la OCDE (OECD, 2004). Las ratas se trataron con 40 mg de cada producto. Al grupo de control se le aplicó agua. El producto se mantuvo en contacto con la piel durante 6 h y luego se retiraron las gasas y se depositaron en un vial con PBS. El producto que restaba sobre la piel se retiró con hisopos que se depositaron en PBS. Asimismo, la formulación restante del estrato córneo se recogió con piezas de cinta pegante y cada cinta se depositó luego en un vial con PBS. Se tomaron muestras de orina, heces y plasma antes de la aplicación del producto y a las 6, 24 y 48 h de la aplicación. En el día 5 se registró el peso corporal y se practicó la eutanasia en cámara de CO₂; se hizo la necropsia y se tomaron muestras de piel tratada, y de hígado y riñón para la histología. Otro trozo de cada uno de estos órganos se depositó en PBS y se procesaron para el posterior análisis por HPLC. Las muestras de plasma y piel, así como las gasas, los lavados y las cintas, se almacenaron a -80 °C para el análisis por HPLC del producto no absorbido. Se determinaron los dos picos de guía para cada uno de los tratamientos y las muestras (plasma, piel y lavados). Según la metodología ya descrita, para las muestras de piel se adicionaron 400 µL de acetato de etilo a la mezcla de extracción.

Respuesta terapéutica en pacientes con leishmaniasis cutánea no complicada

Los sujetos del estudio fueron hombres o mujeres no embarazadas y no lactantes y con tres o menos lesiones cutáneas no mayores a 4 cm de diámetro y sin evidencia clínica de compromiso de la mucosa. Todos los pacientes firmaron el consentimiento informado. Se les hizo diagnóstico parasitológico de leishmaniasis cutánea mediante examen directo, cultivo o reacción en cadena de la polimerasa (PCR); siempre que fue posible, la especie infectante de *Leishmania* se determinó por PCR seguida del análisis del polimorfismo de longitud de fragmento de restricción (RFLP) utilizando la proteína de choque térmico 70 (Sp70) (Montalvo, *et al.*, 2016). Una vez se estableció el diagnóstico de leishmaniasis cutánea, las lesiones de cada paciente se trataron por vía tópica aplicando 300 mg de producto tres veces al día (la loción) y dos veces al día (la emulsión) durante cuatro semanas. El tratamiento lo aplicaron los propios pacientes y fue supervisado mediante registro fotográfico con teléfonos inteligentes.

Se estableció como resultado principal de respuesta terapéutica la curación clínica final definida como la reepitelización del 100 % de la lesión en el día 90 después de finalizado el tratamiento, o más del 50 % de reepitelización de la lesión en el día 90, seguido por el 100 % en el día 180 del tratamiento. La seguridad de cada formulación magistral se evaluó verificando la aparición de efectos adversos, incluidas las reacciones en el sitio de aplicación (dolor, eritema, edema y vesículas) y la aparición de leishmaniasis mucosa. El examen de las mucosas nasal y oral se hizo al inicio del estudio y en los días 90 y 180.

Análisis de los datos

Los datos de los ensayos *in vitro* se expresaron como los valores promedio ± la desviación estándar (DS) y las comparaciones entre grupos de tratamiento se hicieron con un ANOVA

de una vía. Para determinar la eficacia *in vivo* de los extractos y las formulaciones, se verificó la respuesta terapéutica de cada uno de los diferentes tratamientos comparados con el AM según el tamaño de las lesiones en cada animal antes, durante y después del tratamiento y calculando los porcentajes de curación *Vs.* la mejoría o la falla. Para determinar la toxicidad asociada con la administración de los tratamientos según los pesos corporales y los niveles séricos de BUN, creatinina y ALT, se hicieron comparaciones entre los grupos (ANOVA de una vía). Los resultados se consideraron estadísticamente significativos con un $p < 0,05$ y con un nivel de confianza del 95 % usando el programa estadístico Prisma 8 (GraphPad Software Inc., USA).

Aspectos éticos

Todos los procedimientos en animales contaron con el aval del Comité de Ética para la Experimentación Animal de la Universidad de Antioquia (Acta No. 91 de septiembre 25, 2014). Los pacientes incluidos en el estudio habían sido diagnosticados con leishmaniasis cutánea no complicada. Se les ofreció una alternativa de tratamiento en el marco del Programa de Tratamientos de Uso Compasivo dadas sus dificultades para el seguimiento, y todos ellos firmaron el consentimiento informado.

Resultados

Análisis organoléptico, fisicoquímico y microbiológico

El extracto EtOH es una suspensión líquida translúcida, homogénea, libre de material extraño, de color café ámbar y olor característico del alcohol; su pH es de 5,87 y su densidad relativa de 0,9427 g/mL, en tanto que el extracto G es una suspensión translúcida, homogénea, libre de material extraño, de color vino tinto ámbar y con un olor característico; su pH es de 5,57 y su densidad relativa de 0,9542 g/mL.

La loción es una solución homogénea de color vino tinto, sin presencia de material extraño ni en partículas y con el olor característico del alcohol, su pH es de $5,02 \pm 0,02$, ideal para las características fisiológicas de la piel. Bajo el microscopio óptico se observó la homogeneidad en la solución, sin presencia de precipitados (**Figura 1S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2867>); la densidad relativa es de 0,9652 g/mL a 25,5 °C y el contenido de alcohol fue de 24,2 %, porcentaje de grado alcohólico que está dentro de los valores seguros establecidos por la *Federal Drug Administration* (FDA) de los Estados Unidos para formulaciones tópicas. Por su parte, la emulsión es un semisólido de agua en aceite (W/O) soluble en agua, con aspecto granuloso, color beige, sin presencia de material extraño ni material en partículas, y de olor característico; su pH es de $5,91 \pm 0,09$. Bajo el microscopio convencional se observaron glóbulos sin material en partículas ni material extraño y fue estable en la centrifugación de 30 min a 1.250 x g, sin separación en las fases de la formulación. El área de extensibilidad medida con placas de vidrio fue de $48,3 \pm 0,6 \text{ mm}^2$, lo cual proporciona una sensación menos grasosa al aplicar en la piel y demora poco en secarse. Los índices de acidez y saponificación estuvieron dentro del rango apropiado para estas formulaciones. La pérdida por secado fue de 4 % de la masa pesada (**Figura 1S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2867>).

Ambos extractos y formulaciones cumplieron con las especificaciones microbiológicas exigidas: recuento de mesófilos aerobios >10 UFC/mL y ausencia de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* y *Salmonella* sp.

Perfil cromatográfico (HPLC)

El perfil cromatográfico de los extractos EtOH y G obtenidos de las ramas de *C. spinosa* y del producto formulado como loción fue muy similar, con dos picos característicos que fueron seleccionados como señales referentes. Con el extracto G se observaron dos picos de gran intensidad; el primero, denominado GP1, con un tiempo de retención (*rt*) de 22,1 minutos y el segundo, GP2, con un *rt* de 28,3 minutos; también se detectaron dos picos de menor intensidad, el primero, denominado G1, con un *rt* de 10,4 minutos y el G2,

con un *rt* de 17,2 minutos. En el extracto EtOH se observaron también dos picos de gran intensidad; el primero, denominado EP1, con un *rt* de 22,1 minutos y el EP2, con un *rt* de 28,3 minutos, además de dos picos de menor intensidad denominados E1, con un *rt* de 13,7 minutos, y el E2, con un *rt* de 15,2 minutos (**Figura 2S-A**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2868> y **figura 2S-C**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2868>).

El método de detección fue comprobado con dos formulaciones (emulsión y loción). Después de la extracción, se detectaron las mismas señales establecidas como picos de referencia en los extractos. Hubo un efecto matriz mínimo en la emulsión al presentar otros picos que no se relacionaron con los metabolitos del extracto pero que no afectaron la detección de los picos de guía, pues tuvieron tiempos de retención diferentes (**Figura 2S-B**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2868> y **figura 2S-D**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2868>). La altura (mAU) y el área (mAU.s) para los picos identificados se resumen en la **tabla 1S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2881>.

Con el propósito de verificar que los picos seleccionados pudieran utilizarse como guías para la cuantificación, se analizaron concentraciones decrecientes de cada extracto por HPLC y en cada una de las áreas bajo la curva de cada pico se determinó y se estableció mediante una regresión lineal su posible cuantificación (**Figura 3S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2872>). Se obtuvo una señal de respuesta lineal entre la concentración de extracto y el área bajo la curva de cada uno de los picos. Se calculó el límite de detección (*limit of detection*, LOD) y el límite de cuantificación (*limit of quantification*, LOQ) según las ecuaciones 1 y 2, respectivamente, donde *Cstd* corresponde a la concentración inferior, *S* al área detectada y *N* a la señal de ruido (100 UA). Los parámetros del método se resumen en la **tabla 2S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2882>.

Para determinar la robustez del método, se dopó una matriz biológica (plasma de humano) adicionando diferentes concentraciones de cada uno de los extractos y nuevamente se detectaron los dos picos para cada una de las curvas propuestas, con lo que se determinó que no había efecto matriz.

Citotoxicidad y actividad leishmanicida in vitro

Tanto el extracto EtOH como el G mostraron una citotoxicidad baja para las células U937 y HL60, ya que al evaluarlos en estado puro no causaron su muerte. Los extractos, en cambio, tuvieron una citotoxicidad alta para las células Hep G2, con valores de CL_{50} de 18,9 % con el extracto EtOH y de 15,5 % con el G, así como para las células Detroit 551, cuyos valores de CL_{50} fueron de 17,1 % con el extracto EtOH y de 18,7 % con el G. La CL_{50} de los dos extractos liofilizados en células U937 y Detroit 551 fue mayor a 200 $\mu\text{g/mL}$.

Los extractos EtOH y G mostraron una actividad leishmanicida con valores de CE_{50} de 9,4 $\mu\text{g/mL}$ y 7,4 $\mu\text{g/mL}$ para los extractos EtOH y G, respectivamente, en tanto que la AMB arrojó una CE_{50} de $0,1 \pm 0$ $\mu\text{g/mL}$. El IS calculado considerando la CL_{50} para las células U937 y la CE_{50} para los amastigotes de *L. braziliensis* fue de 21,3 para el extracto EtOH y de 27,0 para el G.

Efecto en el proceso de cicatrización in vitro

Después de 8 h de exposición el extracto G de *C. spinosa* produjo un cierre de la brecha de $23,0 \pm 6,7$ %, $13,5 \pm 3,1$ % y $5,0 \pm 5,7$ % con las concentraciones de 20 %, 10 % y 5 %, respectivamente. Estos valores fueron similares, o incluso inferiores, al valor mostrado por el control negativo, que produjo un porcentaje de cierre de $19,7 \pm 5,8$. Por su parte, el control positivo produjo un porcentaje de cierre de $43,8 \pm 6,6$ %, es decir, 47,5, 70 y 89 % más que la emulsión en las concentraciones de 20, 10 y 5 %, respectivamente. Las diferencias entre el efecto del extracto G en las tres concentraciones evaluadas y el control positivo fueron estadísticamente significativas ($<0,0001$) (**Figura 1A**). Asimismo, el efecto mostrado por el extracto G en la concentración de 5 % mostró diferencias estadísticamente

significativas con respecto al control negativo ($p < 0,0001$). A las 16 h el efecto del extracto G en el cierre de la brecha fue mayor que el observado a las 8 h, y fue aumentando a medida que la concentración se redujo. Los porcentajes de cierre de la brecha fueron de $33,9 \pm 7,4 \%$, $41,1 \pm 3,4 \%$ y $70,3 \pm 11,9 \%$ cuando se evaluó en las concentraciones de 20 %, 10 % y 5 %, respectivamente (**Figura 1A**). El porcentaje de cierre de la brecha del control positivo fue de $55,0 \pm 4,0$ y el del control negativo, de $26,8 \pm 5,8 \%$. Las diferencias entre el efecto del control positivo y el extracto G al 20 y el 10 % y el control negativo fueron estadísticamente significativas, así como entre el control positivo y las tres concentraciones evaluadas del extracto G. Todas estas diferencias tuvieron un valor de $p < 0,0001$ (**Figura 1A**).

La emulsión tuvo un efecto muy similar en el cierre de la brecha al del control negativo (DMEM con 10 % de SFB y 0,2 % de DMSO), toda vez que la emulsión favoreció el cierre de la brecha en $21,1 \pm 7,6 \%$, $11,0 \pm 1,3 \%$ y $19,7 \pm 6,2 \%$ con 40, 20 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente, en tanto que el control negativo mostró un porcentaje de cierre del $19,7 \pm 5,8 \%$. El medio enriquecido con 20 % de SFB (control positivo) favoreció el

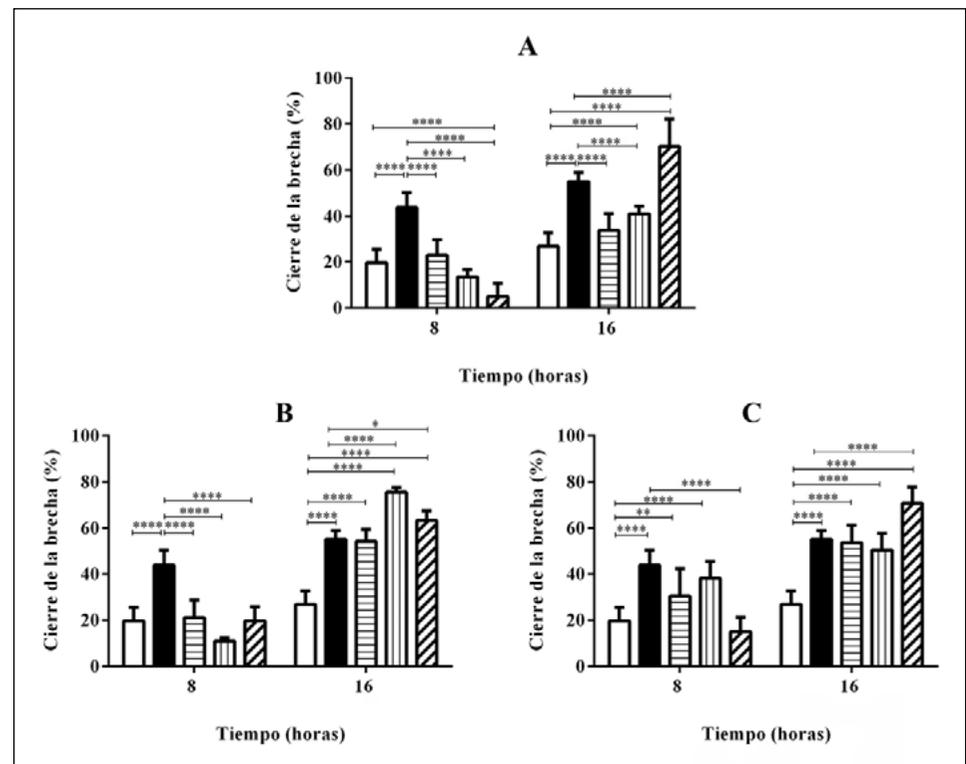


Figura 1. Efecto de los extractos y productos formulados de *C. spinosa* en el cierre de la brecha. Efecto de extracto glicólico-G (**A**), emulsión-E (**B**) y loción-L (**C**) sobre el cierre de la brecha en cultivos de fibroblastos Detroit 551 (250.000 células/pozo) expresadas en porcentaje: con 100 % de cierre de la brecha se estableció la densidad de células sin brecha. Las barras expresan los valores promedio \pm desviación estándar del porcentaje de cierre de la brecha a las 8 y 16 h comparados con la medición inicial (0 h). Cada concentración se evaluó por duplicado y en cada imagen aparecen cinco mediciones. Las barras blancas corresponden al control negativo (DMEM con 10 % de SFB y 0,2 % de DMSO); las barras negras corresponden al control positivo (medio DMEM enriquecido con 20 % de SFB); las barras con líneas horizontales corresponden a la concentración de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para E y L, 20 % para el extracto G y 5 % para el extracto EtOH; las barras con líneas verticales corresponden a la concentración de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para E y L, 10 % para el extracto G y 2,5 % para el extracto EtOH, y las barras con líneas diagonales corresponden a la concentración de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para E y L, 5 % para el extracto G y 1,25 % para el extracto EtOH. **** $p < 0,0001$; ** $p = 0,0033$; * $p = 0,0449$

cierre de la brecha en $43,8 \pm 6,6$ %. Esta diferencia entre el control positivo y la emulsión en sus diferentes concentraciones, así como con el control negativo, fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$) (**Figura 1B**). Al contrario, después de 16 h el efecto en el cierre de la brecha con la emulsión ($40 \mu\text{g/mL}$) fue similar al mostrado por el control positivo, con porcentajes de cierre de $54,1 \pm 5,4$ % Vs. $55,0 \pm 4,0$ %, respectivamente. Sin embargo, cuando se evaluó en menores concentraciones, esto es, 20 y $10 \mu\text{g/mL}$, el porcentaje de cierre aumentó a $75,7 \pm 2,1$ % y $63,3 \pm 4,3$ %, respectivamente, lo que corresponde a un aumento del $37,6$ y el $15,1$ % con respecto al porcentaje de cierre mostrado por el control positivo. Las diferencias observadas entre el control negativo y el control positivo y la emulsión en diferentes concentraciones fue estadísticamente significativa ($p < 0,0001$). Asimismo, las diferencias entre los porcentajes de cierre mostrados por el control positivo y la emulsión en una concentración de 20 y $10 \mu\text{g/mL}$ también fueron estadísticamente significativas, con valores de $p > 0,0001$ (para $20 \mu\text{g/mL}$) y $p = 0,0449$ (para $10 \mu\text{g/mL}$) (**Figura 1B**).

El efecto del extracto EtOH no se logró evaluar debido a que, al contacto de las células con el extracto, se alteró la monocapa formada por las células adheridas. Al contrario, con la loción el efecto en el cierre de la brecha con una concentración de $10 \mu\text{g/mL}$ y luego de 8 h de exposición fue muy similar a la del control negativo, toda vez que los porcentajes de cierre fueron de $15,0 \pm 6,2$ % y $19,7 \pm 5,8$ %, respectivamente (**Figura 1C**). En concentraciones mayores de 20 y $40 \mu\text{g/mL}$, los porcentajes de cierre observados fueron de $30,5 \pm 11,9$ % y $38,2 \pm 7,4$ %, respectivamente. Estos porcentajes fueron 30 y $12,8$ % menores con respecto al control positivo, cuyo porcentaje de cierre fue de $43,8 \pm 6,6$ %. Las diferencias en los porcentajes de cierre fueron estadísticamente significativas, con valores de $p < 0,0001$, entre la loción ($20 \mu\text{g/mL}$) y el control positivo con respecto al control negativo, y entre la loción ($40 \mu\text{g/mL}$) y el control positivo y la loción ($40 \mu\text{g/mL}$) y el control negativo, con un valor de $p = 0,0033$ (**Figura 1C**). A las 16 h el efecto de la loción en el cierre de la brecha aumentó en todas las concentraciones evaluadas, con porcentajes de cierre de $53,5 \pm 7,9$ %, $50,4 \pm 7,4$ % y $70,9 \pm 6,9$ % con las concentraciones de 40 , 20 y $10 \mu\text{g/mL}$, respectivamente. El porcentaje de cierre obtenido con la loción en la menor concentración fue 1,3 veces más que el obtenido con el control positivo ($55,0 \pm 4,0$ %) y 2,64 veces más que lo obtenido con el control negativo ($26,8 \pm 5,8$ %). Las diferencias entre la loción de $10 \mu\text{g/mL}$ y el control positivo, y entre el control positivo y las tres concentraciones de la loción con respecto al control negativo fueron estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) (**Figura 1C**).

Potencial irritante y corrosivo

La exposición de los tejidos de piel al extracto EtOH y al G produjo porcentajes de viabilidad del 100 y el $88,5$ %, respectivamente, en tanto que la exposición al KOH 8N (control positivo) arrojó un porcentaje de viabilidad de tan solo $24,7$ %. Como se esperaba, el PBS usado como control negativo produjo una viabilidad del 100 % (**Figura 4S-A**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2873>). En los análisis histológicos de los tejidos expuestos a PBS (control negativo) y a los extractos, se encontraron capas de células correspondientes a las capas granulares y corneas típicas de un epitelio normal. En el caso del tejido expuesto a KOH 8N (control positivo) se encontró un estrato espinoso atrófico con ausencia de capa granular y dermis subepitelial. El diagnóstico en este tejido fue de atrofia.

De forma similar, la exposición de los tejidos de piel a los extractos EtOH y G produjo un porcentaje de viabilidad del 100 % a los 3 minutos y del $93,6$ % a los 60 minutos, en tanto que la viabilidad del control positivo (SDS al 20 %) a los 3 minutos fue del 48 % y a los 60 minutos del 38 %. La viabilidad producida por el PBS (control negativo) a los 3 y 60 minutos fue del 100 % (**Figura 4S-B**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2873>). En los análisis histológicos de los tejidos expuestos a los extractos EtOH y G y a PBS se encontraron capas de células correspondientes a un epitelio normal. En el caso del tejido expuesto a SDS al 20 % se encontraron grupos de células escamosas y capas

de queratina aisladas. La epidermis no presentaba todas sus capas. Según la clasificación R38 de la Unión Europea, tanto el extracto G como el EtOH de *C. spinosa* se clasifican como no irritantes y no corrosivos.

Respuesta terapéutica en hámsteres

El tratamiento con el extracto EtOH y con la loción produjo la cura en 4 de 6 hámsteres al final del estudio y los dos hámsteres restantes de cada grupo mostraron mejoría, con una reducción del tamaño de la lesión de 61,5 y 51,4 % en el grupo del extracto EtOH y de 21,7 y 31,8 % en el grupo tratado con la loción comparado con el inicio del estudio. En el grupo tratado con el extracto G y la emulsión, cinco de los animales se curaron al final del estudio y el hámster restante en cada grupo mostró una mejoría de la lesión del 16,2 y 32,4 %, respectivamente. Por su parte, el tratamiento combinado de loción y emulsión produjo la cura en todos los hámsteres de este grupo de tratamiento, en tanto que el tratamiento con el AM permitió la cura de 4 de 6 hámsteres, en 1 de 6 hámsteres la lesión se redujo en 94 % y en el hámster restante la lesión aumentó de tamaño en un 5,3 %; este aumento de tamaño se consideró una falla del tratamiento (**Figura 2**).

Al final del estudio la respuesta terapéutica de los diferentes tratamientos fue la siguiente: 67 % con el extracto EtOH y la loción, así como con el AM; 83 % con el extracto G y la emulsión y 100 % en el grupo tratado con la combinación de loción y emulsión. En la **figura 5S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2874> se presentan imágenes representativas de la apariencia clínica de las lesiones antes y después del tratamiento.

Ni el tratamiento con los extractos (EtOH o G) o las formulaciones (loción o emulsión), ni el tratamiento combinado, produjeron efectos perjudiciales para el peso corporal en los hámsteres. La evolución del peso corporal en cada grupo de tratamiento se muestra en la **figura 6S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2875>. Se encontró que en la mayoría de los grupos hubo aumento del peso corporal, excepto en el grupo tratado con el extracto EtOH. En promedio, el aumento de peso corporal fue de 18 % en el grupo tratado con el extracto G, y de 12,6 % y 26,7 % en los grupos tratados con la loción y la emulsión, respectivamente, en tanto que en el grupo tratado con la combinación de loción y emulsión el aumento fue de 21,3 %. El aumento de peso en los hámsteres tratados con AM fue de tan solo 5,6 %, y en el grupo tratado con el extracto se observó una disminución correspondiente al 8,2 % del peso corporal, aunque sin compromiso del bienestar de los hámsteres. Solo se observaron diferencias estadísticamente significativas en el peso al final del estudio (DPT90) entre los grupos tratados con los extractos EtOH y los tratados con emulsión, loción y AM ($p < 0,005$).

Los parámetros de la función renal y hepática, la ALT, la creatinina y el BUN, no evidenciaron ninguna alteración debida al tratamiento y todos los niveles estuvieron entre los valores normales (**Figura 7S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2876>). No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos como tampoco entre el inicio y la finalización del tratamiento ($p > 0,05$).

Toxicidad dérmica aguda

Durante el estudio no se detectaron signos clínicos asociados con toxicidad ni cambios en el comportamiento normal de los animales; tampoco se registraron muertes. La condición corporal también fue óptima. No hubo disminución en la ingesta de agua y alimento y en todos los ratones se observó ganancia de peso, tanto en los controles como en los tratados con la loción y la emulsión (**Tabla 1**).

Ninguno de los ratones murió durante el ensayo ni fue necesario practicar la eutanasia debido a distrés o alteraciones en el bienestar que se pudieran relacionar con efectos tóxicos del compuesto. La piel tratada mantuvo su apariencia normal en todos los ratones durante todo el estudio, sin evidencia de eritema, edema, brotes u otras alteraciones (**Figura 8S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2877>). En la revisión macroscópica durante la necropsia no se evidenciaron signos patológicos en los órganos de los sistemas respiratorio, circulatorio, urinario, reproductivo y digestivo en ninguno de los ratones ni en ningún grupo. En el estudio histológico no se hallaron lesiones significativas de la piel.

Absorción y penetración

No se registraron pérdidas en el peso corporal de las ratas durante el estudio en ninguno de los grupos expuestos a la loción o a la emulsión. Por el contrario, se observó un aumento de peso de 1 % con respecto al del inicio durante los 15 días del estudio. El comportamiento y el estado general de las ratas fueron normales, sin evidencia de signos de enfermedad o alteraciones en la piel ni a nivel sistémico. En las muestras de las ratas tratadas con la

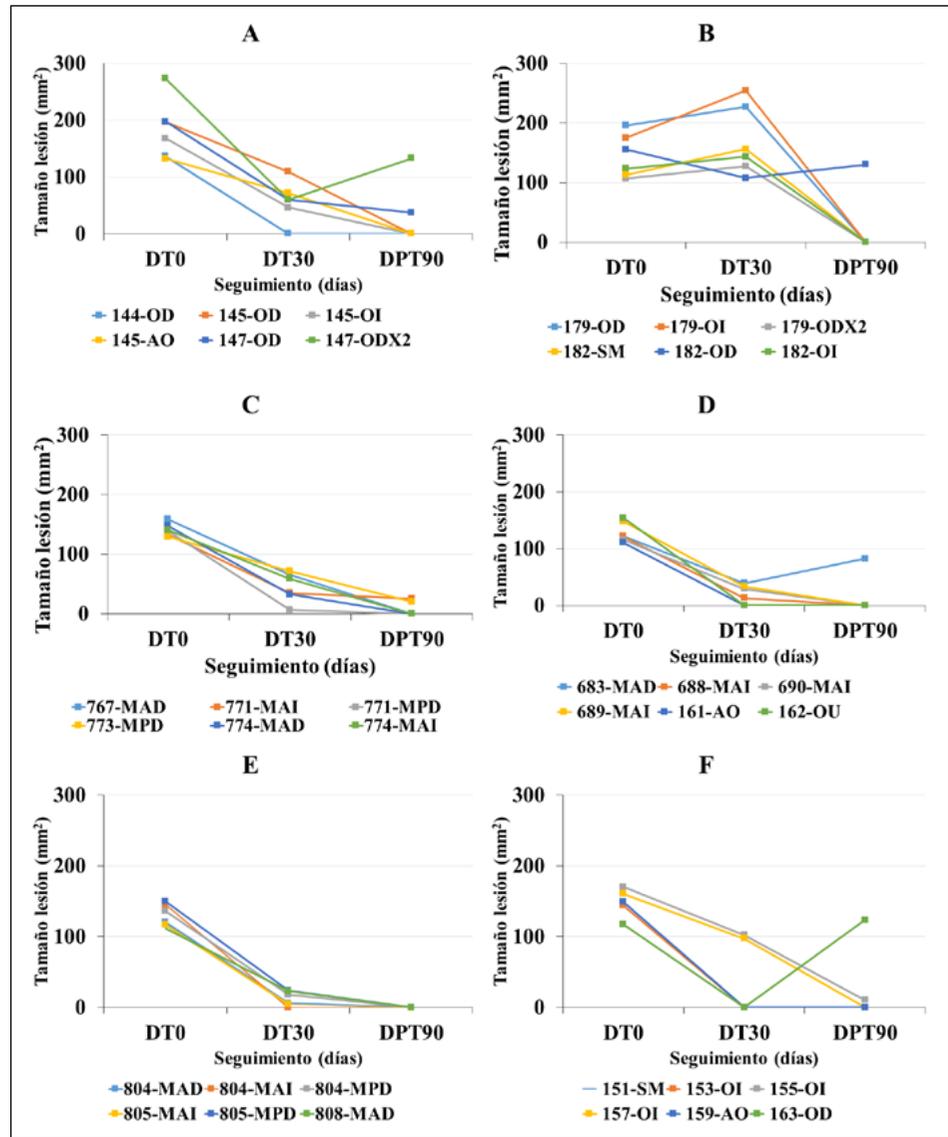


Figura 2. Efectividad de los extractos y formulaciones de *C. spinosa* y el antimoniato de meglumina en hámsteres con leishmaniasis cutánea experimental causada por *Leishmania braziliensis*. Los datos muestran la evolución de la lesión según el tamaño del área en mm² después del tratamiento con 40 mg de extracto EtOH (A) o G (B) o loción (C) o emulsión (D) y de manera combinada, administrada por vía tópica durante 30 días, o MA (200 µg administrados por vía intralesional dos veces a la semana durante cuatro semanas, MA-30). La efectividad de cada tratamiento se determinó comparando el tamaño de la lesión antes del tratamiento (DT0), al final del tratamiento (DT30) y al final del estudio (DPT90), donde un valor “0” correspondía a curación frente al tamaño de la lesión antes de iniciar el tratamiento. El resultado al final del estudio se registró en términos de “cura” (reparación de la epidermis y aparición de pelaje); “mejoría” (reducción del tamaño de la lesión), o falla (aumento del tamaño de la lesión).

Tabla 1. Efecto de *C. spinosa* en el peso de ratones luego de la aplicación tópica de una dosis única

Grupo	Días después del tratamiento		
	0	7	15
Emulsión	40,9 ± 2,1	41,1 ± 1.8	42,5 ± 2,4
Loción	42,3 ± 2,7	46,4 ± 1.8	48,1 ± 2,4
Control	51,3 ± 0,4	51,9 ± 0.8	52,3 ± 2,0

Los datos representan el valor promedio ± DE del peso en gramos de ratones después de la aplicación de una dosis única de 40 mg de la loción y la emulsión que contenían los extractos EtOH y G de *C. spinosa*.

loción fue posible detectar mediante HPLC trazas de los picos de interés a las 6 y 24 h, en tanto que en las muestras de las ratas tratadas con la emulsión se encontraron trazas únicamente a las 6 h (**Figura 9S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2878>). En los lavados de las ratas tratadas con la loción se detectaron ambos picos, EP1 y EP2, pero en los lavados de las ratas tratadas con la emulsión no se detectó ninguno de estos dos picos característicos (**Figura 10S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2879>). Asimismo, en la piel de los ratones tratados con la loción se logró detectar las dos señales, siendo mayor la de las 24 h que la de las 6 h, lo que sugiere que los metabolitos que generan las señales de interés se encuentran distribuidos en las capas de la piel y permean poco la circulación sistémica (**Figura 10S**, <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2879>). En las muestras de piel tratadas con la emulsión se obtuvieron cromatogramas muy difusos, con líneas de base menores a cero, lo que sugiere que no ocurrió penetración en las capas profundas de la piel.

Respuesta terapéutica a las formulaciones magistrales a base de extractos de *C. spinosa* en pacientes con leishmaniasis cutánea no complicada

Entre el 2016 y el 2017 se trataron diez pacientes, de los cuales ocho tenían una sola lesión, uno dos lesiones y otro tres lesiones, es decir, se trataron 13 lesiones. Cinco lesiones estaban ubicadas en los miembros inferiores, cinco en los miembros superiores, dos en la cabeza y una en el cuello. Dos pacientes tenían 60 años o más y ocho tenían entre 13 y 59 años. Entre las muestras tomadas para la identificación de especies, cinco correspondieron a *L. panamensis* y otra a *L. braziliensis*. Los pacientes se trataron con la loción y la emulsión aplicadas tres y dos veces al día, respectivamente, durante 28 a 30 días (cuatro semanas). Todos los pacientes mostraron curación en los días 60 y 90 después de terminado el tratamiento. Hasta el momento, ninguno ha tenido recaídas. Tampoco ninguno presentó efectos sistémicos y solo uno tuvo eritema leve y dos salpullido alrededor de la lesión. La **figura 3** incluye fotografías de los pacientes con leishmaniasis cutánea y los tratados con la emulsión y la loción. Es notorio el proceso de cicatrización que ocurre con este tratamiento tópico, con formación de cicatrices planas, no deprimidas y, en algunos casos, poco notorias, como el caso del paciente #3, cuya lesión en la frente sanó sin dejar cicatrices.

Discusión

La LC afecta la piel en áreas expuestas y cuando las lesiones se curan por lo general quedan cicatrices para toda la vida. Tanto las lesiones como las cicatrices son causa de estigma y sufrimiento en los personas enfermas, pues pueden sentirse o ser rechazados por la comunidad y su propia familia. Por ello el tratamiento adecuado y oportuno es fundamental no solo para aliviar los signos y síntomas de la enfermedad, sino, sobre todo, para mejorar la calidad de vida de los pacientes al prevenir que se desarrollen desfiguraciones o discapacidades.

Hasta ahora los tratamientos se han basado en el uso de antimoniales pentavalentes, anfotericina B, paromomicina, miltefosina y anfotericina liposomal B. Sin embargo, los resultados de su uso son limitado debido a la baja eficacia, los efectos secundarios que



Figura 3. Apariencia clínica de la leishmaniasis cutánea antes y después del tratamiento con extractos formulados de *C. spinosa*. La figura muestra la apariencia de las lesiones antes y después del tratamiento (día 90 de finalizado) con la loción y la emulsión preparados con extractos EtOH y G de *C. spinosa*, respectivamente. Los productos se aplicaron diariamente tres y dos veces al día durante cuatro semanas.

amenazan la vida, la alta toxicidad, la inducción de resistencia a los parásitos, la duración del tratamiento y el alto costo de la atención (WHO, 2010). Además, persisten muchas barreras para acceder al tratamiento, lo que aumenta la vulnerabilidad y el riesgo de incumplirlo, especialmente por los costos indirectos adicionales que los pacientes deben cubrir, pero también, por los días de ausencia escolar o laboral, la pérdida de ingresos debido a la ausencia en el trabajo o el costo económico del tiempo de una persona, así como los costos y el tiempo de desplazamiento a los servicios de salud. Esta situación puede profundizar aun más la vulnerabilidad económica de los afectados y sus familias (Cardona-Arias, et al., 2017a, Cardona-Arias, et al., 2017b, Cardona-Arias, et al., 2018).

Dado que no se vislumbra en un futuro cercano la elaboración de una vacuna que prevenga la infección, es necesario seguir buscando mejores opciones terapéuticas. Los productos naturales, especialmente las plantas, ofrecen una fuente ilimitada de metabolitos con potencial terapéutico y son abundantes los estudios que han demostrado una potente actividad leishmanicida en los extractos, las fracciones y los metabolitos de las plantas (Oryan, 2015; Sen & Chatterjee, 2011). Por otro lado, los medicamentos de aplicación tópica, en lugar de los parenterales, ofrecen un tratamiento potencialmente más seguro y más fácil de administrar, además de limitar el riesgo de efectos adversos, reducir los costos y mejorar su cumplimiento por parte del paciente, preservando su eficacia. Y aunque persiste la preocupación por la posibilidad de desarrollar leishmaniasis mucosa, hasta el momento no hay evidencia concluyente de que el tratamiento sistémico sí lo evite.

En los últimos 10 años se ha intensificado el desarrollo de medicamentos para aplicación tópica y son numerosos los productos naturales propuestos como candidatos para convertirse en medicamentos. Sin embargo, son muy escasos los que se destacan por haber

avanzado hasta los ensayos clínicos controlados. Uno de estos productos tópicos es una crema con extracto hidroalcohólico de hojas de *Juniperus excelsa* M. Bieb (Cupressaceae) al 5 %. Un ensayo clínico controlado aleatorio triple ciego en el que se evaluó la eficacia de la crioterapia más la crema tópica de *J. excelsa* M. Bieb comparándola con el uso de crioterapia y placebo en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo demostró que, en general, el 82 % de los pacientes en el grupo con crioterapia y crema experimentaron cura completa, el 9 % tuvo parcial y en el 9 % restante el tratamiento falló, en tanto que en el grupo de crioterapia y placebo solo el 34 % tuvo una cura completa, y en el 14 % de ellos fue parcial al final del estudio, con una diferencia estadísticamente significativa entre los dos grupos ($p < 0,001$). Asimismo, la reducción del tiempo necesario hasta la cicatrización de las lesiones en pacientes que recibieron extracto de *J. excelsa* fue estadísticamente significativa comparada con el grupo placebo ($p = 0,04$). No se observaron efectos secundarios significativos en el grupo tratado con extracto de *J. excelsa*, excepto por la irritación local leve a moderada después de algunas semanas en un número reducido de pacientes. Los autores concluyeron que el extracto tópico de *J. excelsa* puede usarse como tratamiento adyuvante de la crioterapia para aumentar la tasa y acelerar el tiempo de la curación completa de la leishmaniasis cutánea del Viejo Mundo causada por *L. major* (Parvizi, et al., 2017).

Un segundo producto a base de plantas es una pasta denominada “Z-HE” preparada con una mezcla de hierbas que se evaluó en 14 pacientes con leishmaniasis cutánea erisipeloide en Irán. La pasta se aplicó una vez al día durante cinco días consecutivos y luego cada dos semanas según necesidad durante un período máximo de tres meses. En 11 (92 %) de los pacientes hubo curación completa entre uno y siete meses del tratamiento y sin recaídas ni efectos secundarios relacionados con el tratamiento después de 12 meses de seguimiento (Zerehsaz, et al., 2003). No se encontraron más estudios relacionados con este producto.

Otros productos que han llegado a la etapa de estudios clínicos en humanos para el tratamiento tópico de la LC incluye una formulación en crema con paromomicina al 15 %, sola o en combinación con gentamicina al 0,5 %, que ha sido denominado WR 279,396, así como una formulación de anfotericina B al 3 % denominada Anfoleish®, que cuenta con patente de invención en Estados Unidos (Vélez, et al., 2017) y en Colombia (Robledo, et al., 2018). En los estudios clínicos de fase 2 y 3 con el WR 279,396 en Tunisia y en Panamá contra *L. major* y *L. panamensis*, respectivamente, se ha evidenciado que es estadísticamente superior al vehículo, con tasas de curación clínica final que varían entre 78 y 82 %, y que los efectos adversos son leves a moderados, especialmente dermatitis, dolor y prurito (Ben Salah, et al., 2013; Sosa, et al., 2013; Sosa, et al., 2019). Asimismo, la formulación de paromomicina al 15 % en Aquaphilic®, evaluada en pacientes con leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis* en Bolivia, mostró tasas de curación después de seis meses de seguimiento de 77,5 % para la combinación de paromomicina y Aquaphilic®, de 10 % para el vehículo (Aquaphilic®) y de 70 % para la pentamidina intralesional. Tanto la paromomicina-Aquaphilic® como el Aquaphilic® fueron muy bien tolerados, y solo hubo reacciones adversas de grado 1 en 5 a 10 % de los pacientes (Soto, et al., 2019). Por su parte, en un estudio observacional en pacientes tratados con tres aplicaciones diarias de la crema Anfoleish® durante 30 días, se encontró la cura inicial en el 90 % de los pacientes en el tercer mes de finalizado el tratamiento. A diferencia de lo encontrado en el estudio observacional, en un ensayo clínico abierto, aleatorizado y no comparativo, de fase Ib/II, llevado a cabo en pacientes con LC no complicada, se registró una cura inicial en el 46 % de los pacientes evaluados en el segundo mes de finalizado el tratamiento. Anfoleish® demostró ser segura, y los pocos efectos adversos informados fueron locales, alrededor del área de aplicación de la crema, y de intensidad leve (López, et al., 2018). Estas diferencias en el porcentaje de curación entre el estudio observacional y el ensayo clínico pudieron deberse a diferencias en el protocolo de seguimiento para definir la cura inicial (3 meses *Vs.* 2 meses, respectivamente).

En busca de un mayor acceso al tratamiento, una mayor aceptación por parte de los pacientes y una reducción en los costos de atención, en el presente trabajo se reportan los resultados obtenidos con los extractos EtOH y G puros y formulados como loción y emulsión, respectivamente, obtenidos de *C. spinosa* o “tara”, una leguminosa de la familia Caesalpiniaceae ampliamente utilizado en la medicina ancestral en la región andina latinoamericana, especialmente en el Perú, por sus propiedades astringentes, anti-inflamatorias y cicatrizantes (De la Cruz, *et al.*, 2007). Los extractos de *C. spinosa* mostraron ser altamente selectivos contra *L. braziliensis*, pues su citotoxicidad fue baja para los macrófagos U937, en tanto que su actividad contra los amastigotes de *L. braziliensis* fue alta. Este hallazgo es importante toda vez que *The Drug Neglected Disease Initiative* (DNDi) y la OMS señalan como prioridad el desarrollo de medicamentos contra la leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis* en América, por ser esta la especie que produce más casos de leishmaniasis mucosa, y contra *L. tropica* en el Viejo Mundo, por ser la especie causante de la leishmaniasis *recidivans*, que es de muy difícil tratamiento. De ahí la importancia de este nuevo producto.

En estudios previos se ha demostrado la actividad biológica de extractos y fracciones obtenidos de los frutos (vainas y semillas) de *C. spinosa*, pero no de las ramas. Los resultados aquí obtenidos demostraron que los extractos de las ramas promueven la cicatrización de heridas y permiten la curación de la LC en hámsters. Los productos formulados para ambos extractos son seguros cuando se aplican por vía tópica en dosis única o dosis repetidas. Ambos productos se absorben, penetran y permean hasta el torrente sanguíneo donde se detectan pequeñas trazas, lo que significa que la mayor parte es retenida sin permear. Por último, el uso en pacientes evidenció la curación completa de las lesiones ubicadas en diferentes partes anatómicas y con diferentes tiempos de evolución permitiendo la epitelización adecuada de la piel dañada sin efectos adversos, o solo leves. La cicatriz, aunque con cambios en la pigmentación con respecto al tejido original, como sucede con las cicatrices que dejan los medicamentos convencionales, mejoró el aspecto estético de la piel dañada en algunos de los casos.

Conclusiones

Los resultados del presente estudio sugieren que los extractos EtOH y G obtenidos de las ramas de “tara” en las formulaciones de emulsión y loción tienen un gran potencial para ser considerados una alternativa al tratamiento tópico de la LC no complicada. Sin embargo, se requieren nuevos estudios para evaluar su eficacia y su seguridad en ensayos clínicos controlados. Asimismo, deben identificarse los componentes presentes en los extractos para evaluar los posibles modos de acción.

El tratamiento tópico con productos a base de extractos de *C. spinosa* se vislumbra como segura y efectiva para la LC y tiene muchas ventajas sobre los tratamientos sistémicos, pues puede usarse tanto en adultos como en niños o en entornos donde el tratamiento parenteral no es factible. La mejoría del aspecto estético de la cicatriz obtenida con el tratamiento tópico a base de extractos de *C. spinosa* permitirá disminuir las secuelas de la enfermedad y, por lo tanto, la consecuente estigmatización de los pacientes.

Por último, este estudio demuestra que en países en desarrollo como Colombia es posible avanzar en el desarrollo de medicamentos, labor que se creía de dominio exclusivo de las multinacionales farmacéuticas. Con una reorientación de la forma de hacer investigación en la universidad, no solo para formar estudiantes y publicar, sino también para desarrollar productos (medicamentos, vacunas, pruebas diagnósticas, medidas de prevención, entre otros), se puede avanzar y ayudar a cerrar la brecha para que las poblaciones olvidadas, aquejadas de enfermedades tropicales, tengan, por fin, una oportunidad.

Información suplementaria

Tabla 1S. Resumen de los cromatogramas obtenidos para cada tratamiento extracto y/o producto. Ver la tabla 1S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2881>

Tabla 2S. Parámetros estadísticos método de identificación en extracto etanólico y glicólico de *C. spinosa*. Ver la tabla 2S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2882>

Figura 1S. Apariencia macro y microscópica de los extractos y productos formulados de *C. spinosa*. Ver la figura 1S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2867>

Figura 2S. Perfil cromatográfico de extractos y productos formulados de *C. spinosa*. Ver la figura 2S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2868>

Figura 3S. Curvas de calibración. Ver la figura 3S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2872>

Figura 4S. Potencial irritante y corrosivo cutáneo de los extractos etanólico y glicólico de *C. spinosa*. Ver la figura 4S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2873>

Figura 5S. Respuesta al tratamiento con extractos y formulaciones de *Caesalpinia spinosa* en hámsteres con LC por *L. braziliensis*. Ver la figura 5S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2874>

Figura 6S. Efecto del tratamiento con extractos y formulaciones de *Caesalpinia spinosa* en el peso corporal. Ver la figura 6S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2875>

Figura 7S. Efecto de *Caesalpinia spinosa* en los niveles de ALT, BUN y creatinina en hámsteres con leishmaniasis cutánea causada por *L. braziliensis*. Ver la figura 7S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2876>

Figura 8S. Toxicidad dérmica de *C. spinosa*. Ver la figura 8S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2877>

Figura 9S. Perfil cromatográfico plasma de ratones tratados con loción y emulsión a base de extractos de *C. spinosa*. Ver la figura 9S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2878>

Figura 10S. Perfil cromatográfico en muestras de lavados de piel y en piel de ratones tratados con loción y emulsión a base de extractos de *C. spinosa*. Ver la figura 10S en: <https://www.raccefyn.co/index.php/raccefyn/article/view/1247/2879>

Agradecimientos

A José Barrera y Yuly A. Barrera por sus aportes en el uso tradicional del material vegetal y el suministro de los extractos. Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación - Minciencias (CT 695-2914) y a la Universidad de Antioquia por la financiación recibida.

Contribución de los autores

Conceptualización: SMR e IDV; Metodología: JQ, JH, MF, JM, AR, NA, AM, VO, TP, LMY, YU; Análisis formal: SMR, JQ, JH, MF, JM, AR, NA, AM, VO, TP, LMY, YU; Escritura del borrador original: SMR; Escritura, revisión y edición: SMR e IDV; Consecución de financiación: SMR.

Conflicto de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

Referencias

- Alvar, J., Yactayo, S., Bern, C. (2006). Leishmaniasis and poverty. *Trends in Parasitol.* **22**: 552-556.
- Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Jannin, J., den Boer, M., WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PLoS One.* **7**: 35671
- Ben-Salah, A., Ben-Messaoud, N., Guedri, E., Zaatour, A., Ben-Alaya, N., Bettaieb, J., Gharbi, A., Belhadj-Hamida, N., Boukthir, A., Chlif, S., Abdelhamid K., El Ahmadi, Z., Louzir, H., Mokni, M., Morizot, G., Buffet, P., Smith, P.L., Kopydlowski, K.M., Kreishman-

- Deitrick, M., Smith, K.S., Nielsen, C.J., Ullman, D.R., Norwood, J.A., Thorne, G.D., McCarthy, W.F., Adams, R.C., Rice, R.M., Tang, D., Berman, J., Ransom, J., Magill, A.J., Grogl, M. (2013). Topical paromomycin with or without gentamicin for cutaneous leishmaniasis. *N Engl J Med.* **368**: 524-32. doi: 10.1056/NEJMoa1202657.
- Bennis, I., Thys, S., Filali, H., De Brouwere, V., Sahibi, H., Boelaert, M. (2017). Psychosocial impact of scars due to cutaneous leishmaniasis on high school students in Errachidia province, Morocco. *Infect Dis Poverty.* **6**: 146. Doi: 10.1186/s40249-017-0267-5
- Cardona-Arias, J.A., Patiño-Martínez, D.A., López-Carvajal, L. (2017a). Evaluaciones económicas en leishmaniasis cutánea: revisión sistemática de literatura 1980-2015. *Revista de Economía del Caribe.* **20**: 52-70.
- Cardona-Arias, J.A., López-Carvajal, L., Tamayo Plata, M.P., Vélez I.D. (2017b). Cost-effectiveness analysis of thermotherapy versus pentavalent antimonials for the treatment of cutaneous leishmaniasis. *J Evid Based Med.* **10**: 81-90. Doi: 10.1111/jebm.12245.
- Cardona-Arias, J.A., López-Carvajal, L., Tamayo-Plata, M.P., Vélez, I.D. (2018). Comprehensive economic evaluation of thermotherapy for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia. *BMC Public Health.* **18**: 185. Doi: 10.1186/s12889-018-5060-2
- Castañeda DM, Pombo LM, Urueña CP, Hernández JF, Fiorentino S. (2012). A gallotannin-rich fraction from *Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze displays cytotoxic activity and raises sensitivity to doxorubicin in a leukemia cell line. *BMC Complement Altern Med.* **12**: 38. Doi: 10.1186/1472-6882-12-38
- De la Cruz-Lapa, P. (2004). Aprovechamiento integral y racional de la tara. *Revista del Instituto de Investigación FIGMMG.* **7**: 64-73.
- De la Cruz, H., Vilcapoma, G., Zevallos P.A. (2007). Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Andean people of Canta, Lima, Perú. *J Ethnopharmacol.* **111**: 284-94.
- Hotez, P. (2013). *Forgotten People, Forgotten Diseases: The Neglected Tropical Diseases and Their Impact on Global Health and Development*, 2nd ed.; ASM Press: Washington, DC, USA. ¿p?
- Klouček, P., Polesny, Z., Svobodova, B., Vlkova, E., Kokoska, L. (2005). Antibacterial screening of some Peruvian medicinal plants used in Calleria District. *J Ethnopharmacol.* **99**: 309-312. Doi: 10.1016/j.jep.2005.01.062
- Kondo, K., Takaishi, Y., Shibata, H., Higuti, T. (2006). ILSMRs (intensifier of beta-lactam-susceptibility in methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) from Tara [*Caesalpinia spinosa* (Molina) Kuntze]. *Phytomed.* **13**: 209-212. Doi: 10.1016/j.phymed.2004.08.001
- Ladopoulos, T., Ntais, P., Tsirigotakis, N., Dokianakis, E., Antoniou, M. (2015). The proliferation potential of promastigotes of the main *Leishmania* species of the old world in NNN culture medium prepared using blood of four different mammals. *Exp Parasitol.* **157**: 124-127. Doi:10.1016/j.exppara.2015.07.008
- López, L., Vélez, I., Asela, C., Cruz, C., Alves, F., Robledo, S., Arana, B. (2018). A phase II study to evaluate the safety and efficacy of topical 3% amphotericin B cream (Anfoleish) for the treatment of uncomplicated cutaneous leishmaniasis in Colombia. *PLoS Negl Trop Dis.* **12**: e0006653. Doi: 10.1371/journal.pntd.0006653.
- Montalvo, A.M., Fraga, J., Montano, I., Monzote, L., Van der Auwera, G., Marín, M., Muskus, C. (2016). Molecular identification of *Leishmania* spp. clinical isolates from Colombia based on hsp70 gene. *Biomédica.* **36**: 37-44. Doi: 10.7705/biomedica.v36i2.2688.
- Montoya, A., Daza, A., Muñoz, D., Ríos, K., Taylor, V., Cedeño, D., Vélez, I.D., Echeverri, F., Robledo, S.M. (2015). Development of a novel formulation with hypericin to treat cutaneous leishmaniasis based on photodynamic therapy in vitro and in vivo studies. *Antimicrob Agents Chemother.* **59**: 5804-5813. Doi: 10.1128/AAC.00545-15
- Narváez, A., Calvo, A., Troya, A.M. (2009). Las poblaciones naturales de la tara (*Caesalpinia spinosa*) en el Ecuador: una aproximación al conocimiento de la diversidad genética y el contenido de taninos a través de estudios moleculares y bioquímicos. *Serie Investigación y Sistematización No. 7*. Programa Regional Ecobona-Intercooperation, Laboratorio de Biotecnología Vegetal Escuela de Ciencias Biológicas Pontificia Universidad Católica del Ecuador PUCE. Quito. 39 pp.
- OECD. (2004). Test No. 427: Skin Absorption: In Vivo Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264071063-en>
- OECD. (2017). Test No. 402: Acute Dermal Toxicity, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264070585-en>
- OECD. (2019a). Test No. 431: In vitro skin corrosion: Reconstructed human epidermis (RHE) test method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264264618-en>

- OECD.** (2019b). Test No. 439: In Vitro Skin Irritation: Reconstructed Human Epidermis Test Method, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4, OECD Publishing, Paris. <https://doi.org/10.1787/9789264242845-en>
- Oryan, A.** (2015). Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iran J Vet Res.* **16:** 1-19.
- Parvizi, M. M., Handjani, F., Moein, M., Hatam, G., Nimrouzi, M., Hassanzadeh, J., Hamidzadeh, N., Khorrami, H. R., Zarshenas, M. M.** (2017). Efficacy of cryotherapy plus topical *Juniperus excelsa* M. Bieb cream versus cryotherapy plus placebo in the treatment of Old World cutaneous leishmaniasis: A triple-blind randomized controlled clinical trial. *PLoS Negl Trop Dis.* **11:**e0005957. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005957>
- Pulido, S.A., Muñoz, D.L., Restrepo, A.M., Mesa, C.V, Alzate, J.F., Vélez, I.D., Robledo, S.M.** (2012). Improvement of the green fluorescent protein reporter system in *Leishmania* spp. for the in vitro and in vivo screening of antileishmanial drugs. *Acta Trop.* **122:** 36-45. Doi: 10.1016/j.actatropica.2011.11.015
- Rangel-Ch., J.O.** (2015). La biodiversidad de Colombia: significado y distribución regional. *Rev. Acad. Colomb. Cienc. Ex. Fis. Nat.* **39:** 176-200. Doi: <http://dx.doi.org/10.18257/raccefyn.136>
- Rigano, L., Deola, M., Zaccariotto, F., Colleoni, T., Lionetti, N.** (2019). A New Gelling Agent and Rheology Modifier in Cosmetics: *Caesalpinia spinosa* Gum. *Cosmetics.* **6:** 34.
- Robledo S.M., Carrillo, L.M., Daza, A., Restrepo, A.M., Muñoz, D.L., Tobón, J., Murillo, J.D., López, A., Ríos, C., Mesa, C.V., Upegui, Y.A., Valencia-T., A., Mondragón-Sh, K., Rodríguez, B., Vélez, I.D.** (2012). Cutaneous leishmaniasis in the dorsal skin of hamsters: A useful model for the screening of antileishmanial drugs. *J Vis Exp.* pii: 3533. Doi: 10.3791/3533
- Robledo, M.B, Robledo, S.M., Ceballos, A.L., Vélez, I.D., Gómez, N., Zuluaga, J.J.** (2018). Formulación del producto crema aceite en agua útil para aplicación tópica en mucosas y piel contra enfermedades producidas por parásitos, hongos y bacterias. Resolución No. 32414 de mayo 11 de 2018.
- Santander, S. P., Aoki, M., Hernández, J. F., Pombo, M., Moins-Teisserenc, H., Mooney, N., Fiorentino, S.** (2011). Galactomannan from *Caesalpinia spinosa* induces phenotypic and functional maturation of human dendritic cells. *Int Immunopharmacol.* **11:** 652-660. Doi: 10.1016/j.intimp.2011.01.006
- Sen, R., Chatterjee, M.** (2011). Plant derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. *Phytomed.* **18:** 1056-69. Doi: 10.1016/j.phymed.2011.03.004
- Sosa, N., Capitán, Z., Nieto, J., Nieto, M., Calzada, J., Paz, H., Spadafora, C., Kreishman-Deitrick, M., Kopydlowski, K., Ullman, D., McCarthy, W.F., Ransom, J., Berman, J., Scott, C., Grogl, M.** (2013). Randomized, double-blinded, phase 2 trial of WR 279,396 (paromomycin and gentamicin) for cutaneous leishmaniasis in Panama. *Am J Trop Med Hyg.* **89:** 557-563. Doi: 10.4269/ajtmh.12-0736
- Sosa, N., Pascale, J.M., Jiménez, A.I., Norwood, J.A., Kreishman-Detrick, M., Weina, P.J., Lawrence, K., McCarthy, W.F., Adams, R.C., Scott, C., Ransom, J., Tang, D., Grogl, M.** (2019). Topical paromomycin for New World cutaneous leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* **13** (5): e0007253. Doi: 10.1371/journal.pntd.0007253
- Soto, J., Soto, P., Ajata, A., Luque, C., Tintaya, C., Paz D, Rivero D., Berman, J.** (2019). Topical 15% Paromomycin-Aquaphilic for Bolivian *Leishmania braziliensis* Cutaneous Leishmaniasis: A Randomized, Placebo-controlled Trial. *Clin Infect Dis.* **68:** 844-849. Doi: 10.1093/cid/ciy619
- Skowrya, M. Falguera, V., Gallego, G., Peiró, S., Almajano, M. del P.** (2014). Antioxidant properties of aqueous and ethanolic extracts of tara (*Caesalpinia spinosa*) pods *in vitro* and in model food emulsions. *J Sci Food Agric.* **94:** 911-918.
- Trouiller, P., Olliaro, P., Torreele, E., Orbinski, J., Laing, R., Ford, N.** (2002). Drug development for neglected diseases: A deficient market and a publiccontrol negativohealth policy failure. *Lancet.* **359:** 2188-2194.
- Upegui, Y., Ríos, K., Quiñones, W., Echeverri, F., Archbold, R., Murillo, J.D., Torres, F., Escobar, G., Vélez, I.D., Robledo, S.M.** (2019). Chroman-4-one hydrazones derivatives: Synthesis, characterization, and in vitro and in vivo antileishmanial effects. *Med Chem Res.* **28:** 2184-2199 (2019). Doi: 10.1007/s00044-019-02446-x
- Urueña, C., Mancipe, J., Hernández, J., Castañeda, D., Pombo, L., Gómez, A., Asea, A., Fiorentino, S.** (2013). Gallotannin-rich *Caesalpinia spinosa* fraction decreases the primary tumor and factors associated with poor prognosis in a murine breast cancer model. *BMC Complement Altern Med.* **13:** 74. Doi.org/10.1186/1472-6882-13-74

- The United States Pharmacopeia; the national formulary.** (2016). 39a. rev. (USP39) 34a. ed. (NF34). Rockville, Md.: United States Pharmacopeial Convention, c2016.
- Vélez, I.D., Robledo, S.M., Robledo, M.B., Ceballos, A.L., Giraldo, N.A., Gómez, A., Zuluaga, J.J.** (2017). Cream formulation with amphotericin B and oil in water useful for topical application to mucous tissue and skin against diseases produced by leishmaniasis. US9801895B1.
- World Health Organization.** (2010). Control of the leishmaniasis: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22-26 March 2010. WHO Technical Report Series 949.
- Zerehsaz, F., Beheshti, S., Reza Rezaian, G., Joubeh, S.** (2003). Erysipeloid cutaneous leishmaniasis: Treatment with a new, topical, pure herbal extract. *Eur J Dermatol.* **13**: 145-148.