

**Evaluación *in vitro* de la actividad antiparasitaria
de las especies vegetales *Uncaria tomentosa*,
Picramnia spruceana y *Solanum nigrum* sobre
leishmaniasis**

Angélica María Córdoba Fuzga

Asesores:

**PhD. Alex Armando Sáez Vega
PhD. Sara María Robledo Restrepo**

**Trabajo de grado presentado como requisito
parcial para optar al título de Bióloga
Departamento de Ciencias
Universidad EAFIT
Julio 2018**

Resumen

La leishmaniasis es una enfermedad que afecta principalmente a poblaciones de escasos recursos, la cual es causada por parásitos del género *Leishmania* y es transmitida por la picadura de flebótomos infectados. Se estima que cada año se producen aproximadamente 700.000 casos nuevos de infección y entre 20.000 y 30.000 muertes, lo que llevó que, a partir de hace algunos años, el estado colombiano invirtiera uno 4,5 millones de dólares en la adquisición de medicamentos necesarios para tratar la enfermedad.

Actualmente, esta enfermedad aún no cuenta con un tratamiento óptimo, debido a la toxicidad, el costo y la resistencia por parte de algunas especies del parásito a los fármacos basados en sales antimoniales pentavalente, la única opción para combatir la enfermedad desde hace más de 50 años, esto debido a que hace parte de aquellas enfermedades desatendidas que se caracterizan por no contar con grandes inversiones en el sector farmacéutico. Además de ello, se carece de compuestos activos antileishmaníasicos sin efectos tóxicos contra la célula del mamífero afectado, lo que conlleva a un gran reto de investigación en áreas como la Medicina y la Biología. Por tal motivo, en el presente proyectos, se evaluaron siete extractos de tres especies de plantas diferentes cuyo saber popular y conocimiento ancestral haya referenciado su uso en afecciones de la piel, con el fin de buscar una alternativa de origen natural para el tratamiento de esta enfermedad.

*Para mi padre por apoyarme siempre en mis estudios y valorar mis
esfuerzos*

Agradecimientos

Este trabajo es producto de las contribuciones de todas las personas que me han motivado y apoyado en el desarrollo de mi carrera profesional.

Quiero agradecer a mi compañera Angélica Posada, quien me brindó apoyo y ayuda tanto en la parte experimental como en los momentos de fraternización durante el tiempo en el que el proyecto se llevó a cabo.

Al profesor Alex Sáez y la profesora Sara Robledo de la Universidad de Antioquia, por la confianza, la motivación y la formación que me ofrecieron, lo cual hizo posible la materialización de esta investigación. También al profesor Álvaro Cogollo, quien dedicó parte de su tiempo en mi trabajo y me instruyó más de plantas que cualquier otra persona.

A mis amigos de la universidad y mi familia, que siempre creyeron en mis capacidades y fortalezas.

Por último, agradezco a la universidad EAFIT, al PECET y al Jardín botánico Joaquín Antonio Uribe, por el espacio y los recursos brindados.

Contenido

| | Pag. |
|---|------|
| Resumen | II |
| Agradecimientos | IV |
| Contenido | V |
| Lista de figuras | VII |
| Lista de tablas | XI |
| Acroónimos | XII |
| 1 Introducción | 1 |
| 1.1.1 Objetivo general..... | 3 |
| 1.1.2 Objetivos específicos | 3 |
| 2 Marco Teórico | 4 |
| 2.1 Leishmaniasis..... | 4 |
| 2.1.1 Taxonomía..... | 4 |
| 2.1.2 Tipos de Leishmaniasis | 5 |
| 2.2 Ciclo biológico de la Leishmaniasis | 8 |
| 2.3 Respuesta inmune contra Leishmaniasis..... | 9 |
| 3 Justificación..... | 11 |
| 3.1 Tratamientos actuales para la leishmaniasis | 11 |

| | | |
|-------|---|----|
| 3.1.1 | Toxicidad y resistencia..... | 12 |
| 3.2 | La Leishmaniasis en Colombia..... | 13 |
| 3.3 | Plantas medicinales..... | 16 |
| 3.3.1 | <i>Uncaria tomentosa</i> | 16 |
| 3.3.2 | <i>Solanum nigrum</i> | 17 |
| 3.3.3 | <i>Picramnia spruceana</i> | 18 |
| 4 | Metodología..... | 19 |
| 4.1 | Recolección de material vegetal..... | 19 |
| 4.2 | Obtención de extractos..... | 20 |
| 4.3 | Ensayos de citotoxicidad..... | 21 |
| 4.4 | Ensayos de actividad Leishmanicida..... | 22 |
| 4.5 | Manejo de datos..... | 23 |
| 5 | Resultados..... | 25 |
| 6 | Análisis..... | 27 |
| 7 | Conclusiones y perspectivas..... | 30 |
| 8 | Referencias..... | 31 |

Lista de figuras

| | |
|--|----|
| Fig. 1. Taxonomía del género <i>Leishmania</i> | 5 |
| Fig. 2. Fotografía de paciente con ulcera en dorso de la mano izquierda al momento de la primera consulta..... | 7 |
| Fig. 3. Ciclo de vida de las especies de género <i>Leishmania</i> | 9 |
| Fig. 4. Número de casos de leishmaniasis en Colombia. Presentados en el 2017..... | 15 |
| Fig. 5. Procedimiento de extracción para la especie <i>Uncaria tomentosa</i> . A) Tallo lijado y triturado. B) Hojas molidas | 20 |
| Fig. 6. Procedimiento para la obtención del extracto. Filtración, obtención del extracto y secado..... | 21 |
| Fig. 7. Comparación de los resultados de los extractos provenientes de la planta <i>Uncaria tomentosa</i> . A) Efecto citotóxico d. B) Actividad Leishmanicida. La línea punteada corresponde a el extracto de tallo y hoja en solvente etanolico de <i>Uncaria tomentosa</i> , mientras que la línea solida representa el extracto de tallo y hoja en solvente acuoso de la especie <i>Uncaria tomentosa</i> | 26 |
| Fig. 8. Comparación de los resultados de los extractos provenientes de la planta <i>Solanum nigrum</i> . A) Efecto citotóxico de los extractos. B) Actividad Leishmanicida de los extractos. La línea punteada corresponde a el extracto de tallo y hoja en solvente etanolico de <i>Solanum nigrum</i> , mientras que la línea solida representa el extracto de tallo y hoja en solvente acuoso de la especie <i>Solanum nigrum</i> | 29 |

Lista de tablas

Tabla 1. Fotografías de las zonas de recolección de las especies seleccionadas para la investigación..... 19

Tabla 2. Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* de los extractos de tres especies de plantas medicinales. Cl_{50} : Concentración letal 50. CE_{50} : Concentración efectiva 50. DS: Desviación estándar. IS: Índice de selectividad 26

Acrónimos

| | |
|------------------|----------------------------------|
| LC | Leishmaniasis Cutánea |
| LMC | Leishmaniasis Mucocutánea |
| LV | Leishmaniasis Visceral |
| IFAT | Anticuerpos inmunofluorescentes |
| CL ₅₀ | Concentración Letal 50 |
| CE ₅₀ | Concentración Efectiva 50 |
| OMS | Organización Mundial de la Salud |

1 Introducción

La leishmaniasis es una enfermedad parasitaria que afecta principalmente a poblaciones de escasos recursos, la cual es causada por el parásito del género *Leishmania* y transmitida por la picadura de flebótomos infectados. Se estima que cada año se producen aproximadamente 700.000 casos nuevos de infección y entre 20.000 y 30.000 muertes (OMS, 2010) en los 98 países endémicos para esta enfermedad (Alvar, Velez, Bern, Herrero, Desjeux, Cano & WHO, 2012) lo que refleja los inconvenientes crecientes que se tienen sobre salud pública relacionados con leishmaniasis y la razón por lo que es catalogada como enfermedad huérfana. La leishmaniasis, conocida mejor como un grupo de enfermedades, se clasifican en tres formas: leishmaniasis visceral, leishmaniasis cutánea y leishmaniasis mucocutánea, en donde muchas veces una conlleva a la otra si no se es tratada apresuradamente (Guamán, Armijos & Mancheno, 2017). Para la leishmaniasis cutánea (LC), la incidencia anual a nivel mundial es de alrededor de 1 millón de casos nuevo al año (Jiménez, 2016)., con un mayor número de casos en países de América, Asia y el medio oriente, siendo Afganistán, Argelia, Colombia, Brasil, Irán, Siria, Etiopía, Sudan, Costa Rica y Perú; los diez países con mayor número de casos estimados y reportados (Alvar, 2012). La LC es producida por 25 géneros de *Leishmania* diferentes. En América es causada mayormente por las especies *L. mexicana*, *L. amazonensis* y *L. brasilienses*; mientras que, para el viejo mundo, las especies *L. tropica* y *L. aethiopica* son las que más generan esta enfermedad (Reithinger, Dujardin, Louzir, Pirmez, Alexander & Brooker, 2007). Las lesiones cutáneas que generan esta afección pueden llegar a ser únicas o múltiples, presentándose, en general, como úlceras de bordes elevados, en algunos casos cubiertas de exudado, indoloras. Pueden cicatrizar en varios meses o persistir durante algunos años (Gaudiano, Valderrama, & Ávila, 2016). El tratamiento para la leishmaniasis usado como primera elección hace más de 70 años, son las drogas a base de antimoniales pentavalentes con una tasa de curación variable entre el 50% y el 70%, pero al mismo tiempo, presentando fallas como su toxicidad, el elevado costo, la disponibilidad para los pacientes, además de la falta de efectividad en muchos casos, resistencias y diversos efectos secundarios (Rojas, Paz, Córdova & Rivero, 2017). Según el ministerio de salud y

protección social de Colombia, la situación del país es preocupante debido al incremento registrado durante los últimos años de casos de LC, el proceso creciente de domiciliación y urbanización del ciclo de transmisión, el cambio en el patrón epidemiológico y la aparición de nuevos focos (Instituto Nacional de Salud, 2010).

Actualmente la leishmaniasis aún no cuenta con un tratamiento óptimo debido a que hace parte de aquellas enfermedades desatendidas, que se caracterizan por no contar con grandes inversiones en el sector farmacéutico, además de ello, existe una falta de compuestos activos leishmanicidas los cuales sean no citotóxicos para la célula lo que conlleva a un gran problema en el área de la medicina, y es por tal motivo que se busca una alternativa para el tratamiento a través de ciertas plantas que producen diversos metabolitos secundarios con un posible potencial antiparasitario.

Colombia es un país que cuenta con más de 53 gimnospermas y 23,082 angiospermas (Fakhfakh, Fournet, Prina, Mouscadet, Franck, Hocquemiller & Figadère, 2003), algunas de ellas, con gran potencial para investigaciones biológicas en el ámbito de la medicina por medio de metabolitos que podrían servir para el desarrollo de tratamientos para todo tipo de enfermedades. Los productos que han demostrado posible actividad contra enfermedades parasitarias son las quinolinas sustituidas o las estirilquinolinas, las cuales pueden ser sintetizadas a partir de diversos reactivos (Barrera, Suárez & Quintero, 2013), sin embargo, se han encontrado diversos metabolitos tipo alcaloides obtenidos de plantas que presentan actividad contra enfermedades parasitarias. Del mismo modo, existen otros productos como lo son las bencilquinolinas, los alcaloides de Amaryllidaceae, los alcaloides indólicos de Apocynaceae, los alcaloides indólicos de Loganiaceae y Rubiaceae y los alcaloides esteroidales extraídos de otras familias de plantas que también presentan actividad contra *Plasmodium* y *Leishmania* y podrían ser objeto de estudio para investigaciones que ayuden a los tratamientos de algunas de las enfermedades tropicales más importantes (Muthaura, Rukunga, Chhabra, Mungai & Njagi, 2007).

1.1 Objetivo general

Evaluar la actividad *in vitro* de extractos etanolicos y acuosos en amastigotes intracelulares de *L. (V) braziliensis*, con el fin de determinar su potencial leishmanicida.

1.2 Objetivos específicos

- Analizar especies vegetales de algunas regiones de Colombia con fin de identificar las de mayor potencial terapéutico para enfermedades de la piel.
- Valorar *in vitro* el potencial leishmanicida de extractos de plantas medicinales
- Evaluar la actividad citotóxica *in vitro* de los extractos de *Uncaria tomentosa*, *Picramnia spruceana* y *Solanum nigrum* en macrófagos de origen humano.

2 Marco teórico

2.1 Leishmaniasis

Las leishmaniasis pertenecen a un gran número de enfermedades extendidas en todo el mundo, con una gran incidencia en países del medio oriente, así como también en África, América central y Sudamérica (Iniesta & Luengo, 1982). Es causada por parásitos protozoarios del género *Leishmania* y transmitida por la picadura de cerca de 30 especies diferentes de flebotomos, del género *Lutzomyia* en el nuevo mundo y del género *Phlebotomus* en América, afectando con una mayor incidencia a las poblaciones de escasos recursos, estando asociada con las malas condiciones de vivienda, la malnutrición y el desplazamiento (Suarez, 2011).

Según Kumar (2013), la leishmaniasis es la enfermedad parasitaria más prevalente en el mundo, después de la malaria. Para la organización mundial de la salud (OMS), solo una pequeña parte de las personas infectadas por *Leishmania* acaban padeciendo la enfermedad, pero se estima que cada año se producen entre 700.000 y un millón de nuevos casos y entre 20.000 y 30.000 muertes.

La enfermedad es endémica en aproximadamente 98 países, pero en pocos países hay notificación de la enfermedad, lo que resulta en una subestimación del número de casos real convirtiéndose en un problema de salud pública (Myler & Fasel, 2008)

2.1.1 Taxonomía

La Leishmaniasis es causada por parásitos del orden Kinetoplastida, de la familia Trypanosomatidae y del género *Leishmania*, sin embargo, ha evolucionado a lo largo de los años de tal forma que su taxonomía aún continúa siendo compleja. Antes de clasificarse según sus características moleculares y bioquímicas, los grupos taxonómicos se basaban en el resultado clínico que producía la enfermedad y su localización geográfica, de tal forma que el género de *Leishmania* está fraccionado en dos subgéneros, *Leishmania* y *Viannia*, los cuales se subdividen en complejos (Figura 1). Mientras que en el subgénero *Viannia*

están los complejos *L. braziliensis* y *L. guyanensis*, en donde se encuentran las especies: *L. braziliensis*, *L. peruviana*, *L. colombiense*, *L. lainsoni*, *L. shawi*, *L. naiffi* y *L. guyanensis*, *L. panamensis*, respectivamente. Para el subgénero *Leishmania* se tienen cinco complejos, los cuales son, *L. major*, *L. tropica*, *L. aethiopica*, *L. donovani* y *L. mexicana*, en donde los tres primeros solo poseen una sola especie, cuyo nombre es igual al del complejo. Por último, el complejo *L. donovani* está conformado por tres especies *L. donovani*, *L. infantum* y *L. chagasi*, y el complejo *L. mexicana* está formado por *L. mexicana*, *L. venezuelensis*, *L. garhami*, *L. amazonensis* y *L. pifanoi* (Yuil & Sousa, 2010).

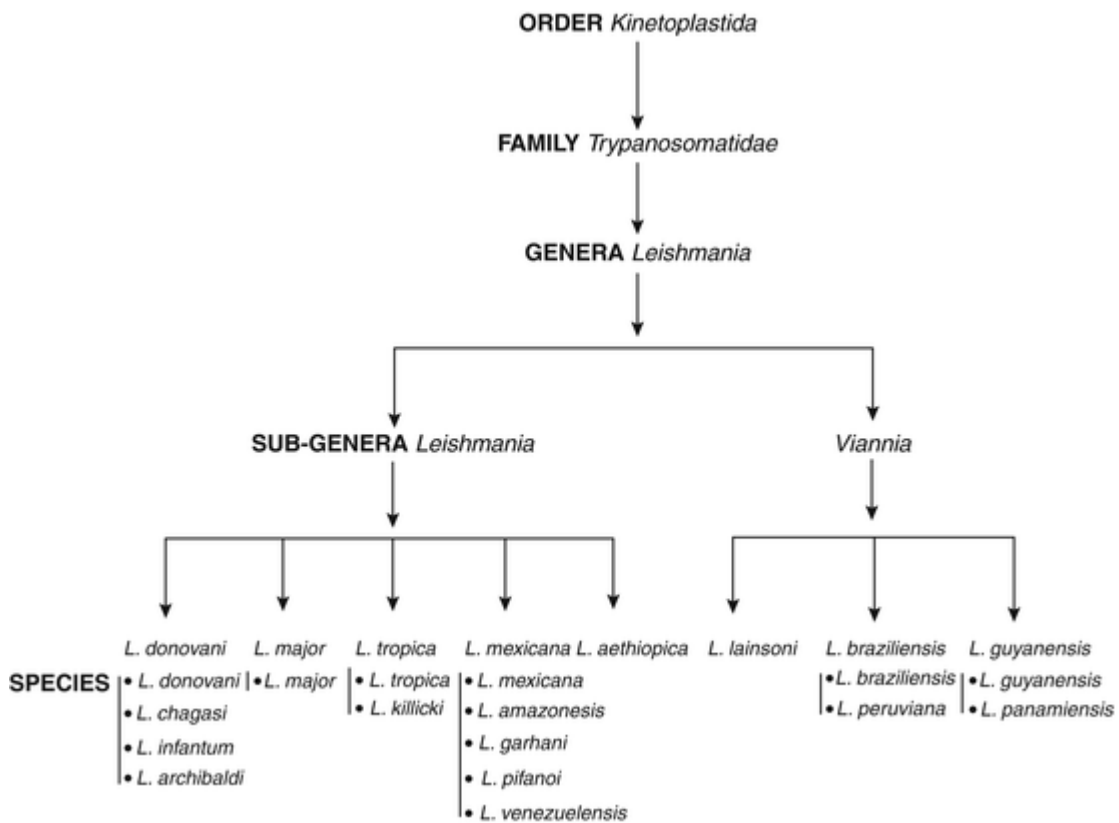


Figura 1. Taxonomía del género *Leishmania* (Mishra, Kishore, Singh & Tiwari, 2013).

2.1.2 tipos de Leishmaniasis

La enfermedad se presenta en tres formas clínicas que pueden llegar a manifestarse en el ser humano, éstas dependen de la especie de *Leishmania* implicada y el estado inmunológico del infectado, que son:

LV: también conocida como kalazar en el viejo mundo. Se reconoce por ser producida por la propagación del parásito *Leishmania*, a través de todo el sistema mononuclear fagocítico, mayormente en órganos como el hígado, la médula ósea y el bazo (Chappuis, Sundar, Hailu, Ghalib, Rijal, Peeling & Boelaert, 2007)., pero de igual manera, en algunas ocasiones se han llegado a observar que la visceralización también involucra órganos como los pulmones, la laringe, el intestino delgado, el esófago, el estómago y también la mucosa oral (Zijlstra, 2001).

En la LV, los macrófagos infectados liberan TNF-alfa (factor de necrosis tumoral) que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria y por lo cual hace que se produzca una fiebre intensa y se consuma parte del tejido graso y muscular. Clínicamente, este tipo de enfermedad puede expresarse por la presencia de anemia, pérdida de peso, caquexia, cambios en la pigmentación de la piel y hepatoesplenomegalia (Chappuis, et al., 2007). Las especies de *Leishmania* que más se han llegado a asociar con este tipo de enfermedad específicas, son: *L. chagasi* y *L. amazonensis* para el continente americano, y *L. tropica*, *L. infantum* y *L. donovani* para el viejo mundo (Grevelink, 1996).

LC: Es el tipo de Leishmaniasis más frecuente y con más amplia distribución en el mundo. Es causada por diferentes protozoos del género *Leishmania*, pero son *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. venezuelensis* y *L. panamensis*, los que más han sido reportados como originarios de una patología en humanos para América. Por otro lado, *L. major*, *L. tropica* y *L. aethiopica*, son las que más se presentan en el viejo mundo. La infección suele comenzar con un pequeño tumor eruptivo de la piel justo en el sitio de la picadura, en donde, después de algunas semanas su tamaño aumenta, se forma un nódulo hasta convertirse en una úlcera (Saravia et al. 2009). El espectro clínico inmunológico de la LC permite clasificar la variante de la enfermedad en tres clases diferentes de LC.

- LC localizada: Causa lesiones ulcerosas, pueden ser múltiples o únicas. Posee un crecimiento profundo, granuloso e indoloro. Pueden ser lesiones adenopáticas o satelitales. Todas estas manifestaciones clínicas van a depender de la respuesta del individuo infectado, la especie del parásito y el tipo de ciclo zoonótico. Este tipo de leishmaniasis cutánea es la más común, con una frecuencia en casos de entre 90% a 99%.

- LC intermedia: Los casos reportados con este tipo de leishmaniasis son muy bajos, alrededor del 2%. Genera lesiones proliferativas de apariencia vegetante o verrugosa que se cronifican.
- LC difusa: Se presenta como lesiones múltiples de diferentes tamaños, de placas o nodulares, sin manifestación de inmunidad que proteja (Figura 2). Puede llegar a ser tan grave que se pueden producir mutilaciones, pero su frecuencia en los casos es de menos del 1% de los pacientes con LC. (D'Suza & García, 1993)



Figura 2. Fotografía de paciente con ulcera en dorso de mano izquierda al momento de la primera consulta (Nógalo, Molina, Norry, Romano & Lorenz, 2012).

LMC: las lesiones causan destrucciones, en su mayoría, en áreas que poseen cartílagos, ocasionando mutilaciones de los tejidos subyacentes (González, Benito, García & Iglesias, 2009). Debido a que es una enfermedad que ataca específicamente la cavidad oral, la nariz y la faringe, genera dificultad para comer y aumenta los posibles riesgos de alguna otra infección y la desfiguración (D'Suza, 1993).

En general, las lesiones cutáneas permanecen localizadas, pero en algunos casos, los parásitos de *Leishmania* pueden distribuirse por los vasos linfáticos y llegar a producir lesiones secundarias en otras partes del cuerpo como regiones específicas de la piel o en las mucosas (Weis, 1943).

2.2 Ciclo biológico de *Leishmania*

A pesar de la existencia de distintos tipos de Leishmaniasis y sus diferencias, las especies de *Leishmania* son muy similares en su ciclo de vida y es por ello que, para poder aplicar una medida de control, tratamiento o estudio para cualquier especie, es

necesario conocer y entender cada una de las etapas de esta infección (Ministerio de Salud de Lima, 2000).

Leishmania presenta su ciclo de vida usando dos huéspedes y al mismo tiempo se desarrolla en dos ciclos de transmisión distintos dependiendo de ellos. El primero es cuando se circula por reservorios naturales en vida silvestre como zorros, chacales, lobos, perezosos y mayormente roedores de la especie *Proechymis semispinosus*, *Hoplomys gimnurus*, *Rattus rattus alexandrinus*, *Kannabateomys amblyonyx*, *Dasyprocta azarae* y *Cuniculus paca* (Medina, 1966); manteniéndose en vectores propios de la zona endémica. El en segundo ciclo existente, los vectores pueden llegar a atacar a los animales domésticos como gatos, perros y caballos, llegando a afectar de igual forma al hombre (Montalvo, 2010).

Los parásitos de *Leishmania* poseen dos estadios en su ciclo de vida, el amastigote, que es inmóvil y no presenta flagelo, pero es el estado en el que se encuentra cuando el vector toma sangre del vertebrado infectado para alimentarse, ingiriendo los amastigotes que se encuentran en los macrófagos del animal. Después de un día o dos, los amastigotes se transforman en promastigotes, la forma flagelada y móvil del parásito que exhibe la extremidad posterior más delgada que la anterior. En este estadio se empiezan a multiplicar de forma acelerada por fisión binaria longitudinal. Muchos de ellos se unen a la pared, mientras otros quedan libres en el lumen intestinal. El lugar donde se encuentra el parásito en el intestino varía dependiendo la especie del vector y de por supuesto el parásito. Luego de la replicación del microorganismo, los promastigotes migran hacia la faringe y el esófago (Muskus & Villa, 2002).

En el momento en el que el vector que está infectado se alimenta de un huésped sano, son inoculados aproximadamente de 10 a 100 promastigotes que se encuentran en la proboscis y traspasan la dermis, de allí se mantienen en el espacio intracelular y accionan un complemento que permite la acumulación de macrófagos y neutrófilos. El mosquito disminuye la producción de óxido nítrico por medio de la saliva gracias a los macrófagos activados, lo que genera que este fluido cumpla un rol importante en el establecimiento de la infección (Hall, 1995). Cuando los vectores están exageradamente infectados, la proboscis se congestiona y dificulta la alimentación del vector. Por lo que se le hace necesario realizar varias picaduras y por ende inoculaciones. A pesar de que

muchos de estos promastigotes son destruidos por leucocitos polimorfonucleares, los restantes tardan en convertirse de 3 a 4 horas en amastigotes dentro de células del retículo endotelial, permaneciendo en un estadio estacionario por unas 36 horas más y luego, comenzar a reproducirse (Sánchez, Sáenz, Pancorbo, Zegarra, Garcés & Regis, 2004).

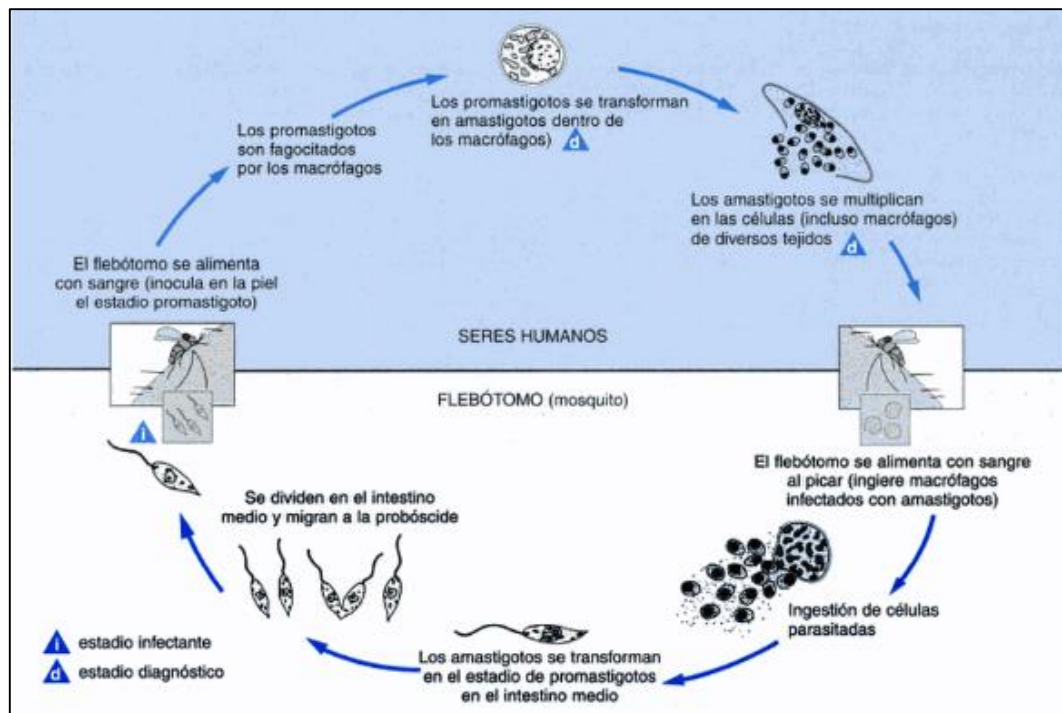


Figura 3. Ciclo de vida de las especies del género *Leishmania*. (Koneman & Allen, 2008)

2.3 Respuesta inmune contra la *Leishmania*

La infección de *Leishmania* y la reacción del sistema inmune, resultan ser diferentes dependiendo las características del hospedero y la especie del parásito, por lo cual hace que sea tan compleja y, por ende, una de las invasiones de agentes patógenos en el organismo más estudiadas en los últimos años. *Leishmania* puede producir una respuesta inmune protectora contra infecciones posteriores de hasta la misma especie, no obstante, solo en algunas especies de *Leishmania* ocurre esto.

Inmediatamente el vector se alimenta del hospedero humano comienza la interacción

con el sistema inmunitario. El insecto introduce sustancias vasodilatadoras a través de las piezas bucales que laceran los vasos sanguíneos de la piel, allí la enzima hialuronidasa forma un cumulo de sangre de la que el insecto se alimenta, consecuentemente el sistema inmune innato actúa liberando cininas para una vasoconstricción y al mismo tiempo se activa la coagulación para producir una trombosis de los vasos afectados llegando macrófagos y neutrófilos sanguíneos al lugar de la lesión, todo esto con el fin de detener el proceso de infección-, sin embargo, la saliva del insecto juega un papel importante, conteniendo sustancias vasodilatadoras como la adenosina, antiagregantes plaquetarios y otras sustancias estimuladoras, que permiten que el vector se alimente al reducir la inflamación y así poder transmitir la infección(Yuil & Sousa, 2010).

3 justificación

3.1 Tratamientos actuales para la leishmaniasis

Debido a que la Leishmaniasis está constituida por un amplio espectro de afecciones que van desde la lesión cutánea localizada, hasta los cuadros sistemáticos viscerales que pueden llegar a ser mortales, y que además esta variedad de síntomas clínicos depende de la especie del protozooario causante de la enfermedad, resulta completo dictar un régimen terapéutico específico para las diferentes presentaciones de la infección.

Para la LC, primero es necesario tomar en cuenta la ubicación de la lesión, el tamaño, el tiempo desde que se tiene la lesión y el riesgo de distribución mucosa, entre algunos otros aspectos, mucho antes de tener en cuenta un tratamiento. En Latinoamérica las especies que más se han reportado como causantes de esta enfermedad son *L. braziliensis* y *L. panamensis* lo cual es un factor al que se debe prestar atención debido a que suelen recaer o evolucionar en una LMC si no es tratada adecuadamente. Por otro lado, las especies que inciden en los continentes de Europa y Asia poseen un comportamiento más benigno, tal el caso de que las lesiones no tienen un riesgo de complicación y usualmente pueden tratarse con una vigilancia del avance de la lesión que suele desaparecer sin tratamiento en algunas semanas (Perez, Díaz, Perez, Ferrere, Monje, Norman & Lopez, 2010).

Los tratamientos más usados para la enfermedad durante los últimos 70 años se basan en sales antimoniales pentavalentes. Hoy en día, se disponen en el comercio dos formulaciones, el antimonio de meglumina (Glucantime®) y el estibogluconato de sodio (Pentostam®), los cuales son equivalentes en términos de eficacia clínica, efectos secundarios, farmacocinética y mecanismos de acción. Este último es el fármaco que más se utiliza para la LV, mientras que el antimonio de meglumina es la medicina de elección en la LC y LMC. La acción de estos medicamentos se basa en la reacción que presentan los antimoniales con los grupos (-SH), considerando que la actividad letal es por causa de la inhibición de las enzimas (Henao, Osorio, Saravia, Gómez & Travi, 2004). Lamentablemente, según la OMS en el 2010, el costo de estos medicamentos es bastante alto, variando de unos US\$67 para el estibogluconato de sodio y US\$98 para el antimonio de meglumina.

Diversas investigaciones han realizado experimentación con tratamientos alternativos como la termoterapia, en donde se aplica calor localizado, unos 50°C durante 30 segundos con varias repeticiones, la cual ha tenido una eficacia del 60%; también se usa la paronomicida al 15% que se combina con una pomada de cloruro de metilbencetonio al 12% durante unos días, la eficacia de este es de 65%. Otra elección para una terapia contra la enfermedad es la crioterapia con nitrógeno líquido a -195°C, esta se aplica sobre la lesión una o más veces a la semana durante unos cuantos meses, la eficacia es de un 90% (OMS, 2010).

3.1.1 Toxicidad y resistencia

A pesar de que los compuestos pentavalentes han resultado ser menos tóxicos que los fármacos antecesores como los antimoniales trivalentes, aún continúan generando reacciones adversas en relación con su uso. Entre los efectos que más se destacan son la bradicardia, los trastornos renales, la vasodilatación y la cardiotoxicidad, cuyas anormalidades pueden proceder en arritmias severas asociadas a un suministro de dosis alta (mayor de 3 a 4 gramos) y terapia prolongada. Es bien sabido que aquellos pacientes que presentan malnutrición, deterioro en la función renal o una enfermedad cardíaca preexistente, resultan ser más sensibles a los efectos cardiotóxicos de estos medicamentos (Hepburn, Nolan, Fenn, Herd, Neilson & Sutherland, 1994). De igual manera, las funciones renales y hepáticas también pueden deteriorarse a causa de estos medicamentos, contemplándose un aumento reversible en las enzimas hepato celulares, anemia aplásica, trombocitopenia, pancreatitis química y leucopenia.

Cuando se suministran pequeñas dosis de estos fármacos, se generan reacciones leves incluyendo náuseas, vómitos, fiebre, diarrea, síncope, dolor abdominal y polineuropatía que puede ser reversible; como consecuencias, existen algunas contraindicaciones para el uso del antimonio de meglumina y el estibogluconato de sodio en mujeres embarazadas, niños menores de dos años e individuos con neumonía o tuberculosis (Vásquez, 2009).

La disminución de la eficacia de los medicamentos derivado de sales antimoniales pentavalentes, definida como quimio-resistencia, se ha venido presentado a lo largo de los años. Esta resistencia puede llegar a ser innata, natural o adquirida y ha sido demostrada en investigaciones al seleccionar parásitos con característica las cuales le permiten sobrevivir

cuando hay presencia de la droga en dosis óptimas. La disminución de la eficacia de estos medicamentos compromete el descenso de la acumulación celular de fármacos en consecuencia a la expresión constante de transportadores ABC, encargados de descartar las toxinas xenobióticas y ambientales, como también de los desechos celulares (Padrón & Ponte, 2013). A pesar de todos los reportes que se han hecho sobre dicha resistencia a la terapia antimonial, aún sigue siendo la primera opción de tratamiento a la enfermedad y los pronósticos sobre una medicación alternativa siguen en investigación.

3.2 La leishmaniasis en Colombia

Según el instituto nacional de salud (2017), el incremento en los casos de leishmaniasis en Colombia ha generado un problema de salud pública en los últimos años. En la década de los noventa se notificaron aproximadamente 6.500 casos de leishmaniasis (ministerio de protección social de Colombia, 2010), mientras que para el 2017 se informaron en promedio 6.910 casos nuevos, afectando principalmente al género masculino (Figura 4), por lo que se evidencia un alarmante aumento de la enfermedad. La leishmaniasis ha resultado ser, según investigaciones, una patología endémica en gran parte del territorio nacional, a excepción de San Andrés y el Atlántico: se estima que alrededor de 10 millones de personas se encuentran en riesgo de contraerla, debido a que su transmisión es esencialmente en el área rural.

En Colombia se encuentran 133 especies del género *Lutzomyia* como vectores, más conocidos como arenilla, capotillo o pringador. La distribución geográfica del género empieza desde el nivel del mar hasta los 3.500 msnm, no obstante, su ciclo de transmisión no sobrepasa altitudes de 1.750 msnm.

Al ser Colombia uno de los 3 países con mayor número de especies de *Leishmania*, en el año 1998 se estableció un programa en el país para el control de vectores que constaba de un rociado regular de insecticidas y distribución de mosquitero, desde entonces en los últimos años se han elaborado programas de promoción, prevención y el control epidemiológico, por medio de campañas y entra de boletines informativos (Rodríguez & Ubaque, 2016). También existe un programa de control de yacimientos y control de roedores, uno de sus principales reservorios. Sin embargo, los programas tienen falencias

en la falta de identificación de los casos, la inaccesibilidad para un buen diagnóstico, la falta de personal médico especializado y otros recursos humanos para proporcionar un buen tratamiento. Lamentablemente no solo es la falta de profesionales y un buen manejo de proyectos para el control de la enfermedad lo que ha aumentado la cifras afectados por leishmaniasis, también las actividades militares y los conflictos armados han incrementado la incidencia de la enfermedad, ocasionando que entre el 2005 y el 2010 se hayan presentado más de 45.000 casos de LC en el país, a pesar de que las zonas deforestadas con fines ganaderos hayan creado una especie de tampón entre las viviendas humanas y los territorios selváticos, disminuyendo la tasa de transmisión de leishmaniasis. De igual manera, tal transmisión se puede generar también en los entornos peridomésticos de los valles andinos con plantaciones de café (OMS, 2010).

Según la organización mundial de la salud (2016), aunque si se reporten casos de LV, ésta abarca un porcentaje muy bajo de alrededor de un 0,1%, al igual que la LMC que es de 0,9% en comparación los inmensos alcances que ha tenido la LC en el país, los cuales se concentran entre un 95% a 98% de todos los casos de leishmaniasis. La LC se exhibe de forma endémica en distintas zonas rurales de Colombia, muchas de ellas bastante alejadas de algún centro médico en donde se pueda tratar la enfermedad. De acuerdo con numerosos estudios realizados en los últimos años, la epidemiología de la LC resulta más problemática que la generalmente aceptada, demostrando que los datos de los focos de transmisión intra y peridomesticiaria manifiestan que las estadísticas del instituto nacional de salud no proporcionan la verdadera situación epidemiológica de la leishmaniosis en las zonas rurales del país (Velez, Hendrickx, Robledo & Agudelo, 2001).

El diagnóstico para la confirmación de la leishmaniasis en Colombia depende del tipo a la que esta pertenezca. Para la LV se usa la técnica de comparación de anticuerpos inmunoflorescente (IFAT), mientras que, para la LC, que es la más común, se realiza un examen microscópico de una muestra de la lesión cutánea y se identifica (Organización mundial de la salud, 2010).

Como se ha descrito anteriormente, el principal tratamiento para la leishmaniasis son los medicamentos a base de sales antimoniales pentavalentes, siendo para Colombia también el fármaco primario para la atención clínica de esta enfermedad. Lastimosamente debido a la ubicación en la que se encuentran los afectados y algunos otros factores como la

disponibilidad del personal capacitado y el conflicto armado, no permiten que todas las personas afectadas puedan tener acceso al medicamento (INS, 2010). Por consiguiente, éstas no serían las únicas desventajas de las sales antimoniales pentavalentes, pues también la resistencia de algunas especies de *Leishmania* frente a este fármaco y la toxicidad que este representa ya ha generado muertes en el país (OMS, 2010).

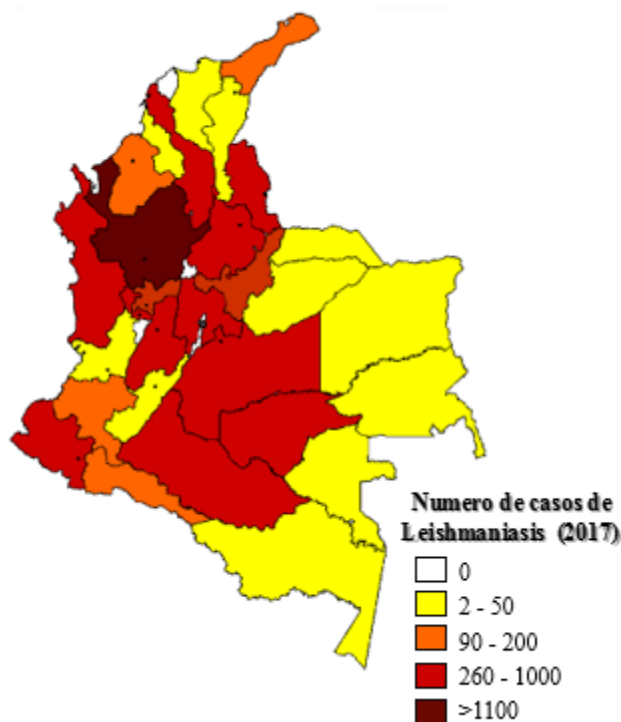


Figura 4. Número de casos de leishmaniasis en Colombia, presentados en el 2017.
(Instituto nacional de salud, 2017)

Como ya se ha conocido, el tratamiento de la leishmaniasis posee varios factores que deben ser motivo de investigación como son la prevención de manifestaciones mucosas tardías, la disminución del tiempo de infección, la eliminación del parásito, la gravedad de la afección, la magnitud de la enfermedad y la interrupción del ciclo de transmisión vectorial. Debido que, desafortunadamente, la cantidad de quimioterapéuticos desarrollados no han podido abastecer estas necesidades. Es por este motivo que hoy en día se busca la producción de medicamentos que superen las desventajas que ofrecen aquellos que están disponibles hace más de 70 años, procurando alternativas desde la generación de productos

naturales o compuestos derivados de los mismos (Beltrán Saldaña & Cavero Bernal, 2011). Una opción para esta inquietante problemática es el uso de las plantas medicinales y la Etnobotania a través de la aprovechamiento del conocimiento ancestral que se tiene en Colombia, que goza de una ventaja competitiva como lo es la megadiversidad de especies vegetales.

En el año 2017, los delegados de los países endémicos participantes de la Reunión Regional de Leishmaniasis, aprobaron el Plan de Acción de la Leishmaniasis en las Américas 2017-2022, que detalla las metas, indicadores y acciones para cumplir con los compromisos de la Resolución CD 55 R09 del 2016 (OPdl, 2015), los cuales se atribuyen a:

- Reducir la letalidad por LV en 50%;
- Reducir las muertes por LC y LMC en 90%;
- Reducir la proporción de LC en niños menores de 10 años en 50%
- Reducir la incidencia de LV, teniendo en cuenta el escenario epidemiológico de cada uno de los países endémicos.

Conociendo el potencial de las especies vegetales como fuente esencial de compuestos beneficiosos y el aprovechamiento de las industrias farmacéuticas de los recursos biológicos, se propuso evaluar en este proyecto la actividad leishmanicida y citotoxicidad de extractos de origen vegetal, cuyas fuentes fueran reconocidas como plantas medicinales capaz de combatir ulceras y demás afecciones de la piel, a partir del conocimiento ancestral y el saber popular en el país.

3.3 Plantas medicinales

3.3.1 *Uncaria tomentosa*

También conocida como uña de gato, esta especie perteneciente a la familia Rubiaceae, cuyas plantas han sido usadas durante años por pueblos y etnias como plantas medicinales en tratamiento que afectan la salud humana, han resultado interesantes para investigadores que buscan responder ante un tratamiento de desarrollo sustentable y natural (Souza, Mendonça & Pessoa da Silva, 2013). Tal es el caso de la especie *Paulicourea guianensis*,

distribuida en países de Centroamérica y Suramérica, fue utilizada por mucho tiempo para dolencias renales e inflamaciones, así numerosos estudios determinaron que posee actividad antimicrobiana antimicótica y antioxidante, atribuyéndose como candidata para un producto farmacobiológico (Giraldo & Ramírez, 2013). Es así como esta familia ha estado presente en 102 estudios etnobotánicos, 20 estudios fitoquímicos y 18 estudios farmacológicos en uno de los paises con mayor producción de investigaciones como es Brasil (Souza, 2013).

La uña de gato ha conseguido popularizarse medianamente como planta medicinal en Colombia, la comunidad indígena de los Tikuna llamaba a esta planta como michiparru, usada como tratamiento para infecciones que podían observarse en la piel y también el sida, la preparación del emplasto a través de la cocción de la corteza y se administraba por inhalación de vapor (Quintana, 2016).

Algunos estudios han logrado describir ventajas que tiene *Ucrania tomentosa* como planta medicinal, entre ellas su potencial antiinflamatorio demostrados en ratones después de 90 días de tratamiento (Franciscone, 2014).

3.3.2 *Solanum nigrum*

El primer referente que se tiene de esta clase de trabajos es de 1860 por Florentino vezca, ya posteriormente se comenzaron por incluir investigaciones científicas que son influenciadas por el conocimiento ancestral de las comunidades del país. Un ejemplo de ello, es la población residente en la reserva forestal del Malmo en el municipio de Tunja, en donde el uso tradicional de especies de plantas pertenecientes a la familia Solanaceae resulta ser la más utilizada por la comunidad, asignando alrededor de 17 usos posibles a las especies *Brugmancia arborea*, *Brugmancia sanguínea*, *Datura stramonium* y *Solanum pseudolulo* (Manrique & Manrique, 2006).

La especie *Solanum nigrum*, también conocida como Hierba mora, perteneciente a la familia Solanaceae, igualmente le es atribuido su empleo en la etnobotánica. El Resguardo Indígena del Gran Cumbal que se encuentra localizado en el Municipio de Cumbal, Nariño; dispone de la hoja, el tallo y el fruto para realizar infusiones y aplicarlo vía externa con fines desinflamatorios y curación de heridas en la piel (Horák, Somerlíková, Kavenská,

Škrabáková & Tournon, 2015). También es conocido que la comunidad de los taitas, ubicada en el Valle de Sibundoy, en el departamento del putumayo; utilizan las hojas y el tallo de la hierba mora a través de la infusión, para tomar baños y curar las afecciones del hígado y las úlceras de la piel (Rodríguez, 2010).

En comparación a muchas especies de plantas, *S. nigrum* no ha sido investigada a profundidad y no se le ha tenido en cuenta referente a sus posibles beneficios medicinales. Un estudio en el 2006 por Janiu & Devi, logró de terminar el efecto antiulcerogénico del fruto de la hierba mora en diferentes modelos experimentales. Otros estudios han logrado corroborar la actividad antiinflamatoria de un extracto metanólico originario del fruto de dicha planta (Ravi., Saleem, Patel, Raamamurthy, & Gauthaman, 2009).

3.3.3 *Picamnia spruceana*

Pertenece a la pequeña familia Picramniaceae cuyas especies están distribuidas principalmente en el neotrópico. Está compuesto por diversas plantas que comprenden arbustos o árboles pequeños con flor, de hojas compuestas y alternas. Muy poco se sabe sobre los beneficios medicinales que pueda llevar esta familia, debido a que no hace mucho los estudios primordiales que se le asignaban, se basaban en determinar su clasificación a nivel molecular (de Medeiros, Ladio, Santos & de Albuquerque, 2013). Algunas comunidades de países como Argentina y Ecuador, usan las hojas de la especie *Picamnia sellowii* como colorante artesanal y protector en la piel (Cortadi, Andriolo, Campagna, Martinez, Di Sapio, Broussalis & Gattuso, 2010).




En Colombia la comunidad amazónica de Kofán o como ellos mismos se llaman los A'Í, utilizan la vía tópica como forma de aplicación de una planta del género *Picamnia*, la corteza es secada al sol o cerca de una fuente de calor para finalmente reducirlo a cenizas y usarlo como tratamiento para la LC (Bernal, López, Murillo, Perea & Méndez, 2014). También en el noroccidente de la amazonia, los resguardos de las tribus indígenas coreguaje y uitoto mencionan el uso de *Picamnia magnifolia* para el tratamiento de hongos, manchas de la piel y alergias, tipos de uso agrupados en la categoría de uso enfermedades en la piel y tejidos subcutáneo (Trujillo & Betancourt, 2011).

4 metodología

4.1 Recolección de material vegetal

El análisis etnobotánico se realizó a partir de una serie de búsquedas en bases de datos como Scopus, Google académico, Science Direct y Scielo, usando palabras claves para la búsqueda tales como Plantas, úlceras, indígenas, piel, vegetal, etnobotánica y Colombia; periódicos y páginas de internet, con el fin de realizar una búsqueda exhaustiva en la que se pretendía encontrar información acerca de plantas medicinales nativas del país usadas para la cura o tratamiento de enfermedades y heridas en la piel como alergias, salpullidos, erupciones y manchas, reconociendo su aprovechamiento y el conocimiento ancestral de las comunidades. Una vez elaborado el screening, se discutió con expertos en el tema de uso de plantas medicinales y se seleccionaron tres especies de plantas de géneros diferentes. El criterio para la elección de las plantas se basó en el conocimiento que se tenían de ésta y las investigaciones que se habían realizado con anterioridad. Las especies de plantas seleccionadas corresponden a *Uncaria tomentosa*, *Picramnia spruceana* y *Solanum nigrum* (tabla 1).

Tabla 1. Fotografía y zona de recolección de las especies seleccionadas para la investigación

| Fotografía de la planta | Especie | Zona de recolección |
|---|----------------------------|---|
|  | <i>Uncaria tomentosa</i> | Municipio de Puerto Berrio, Antioquia |
|  | <i>picramnia spruceana</i> | Municipio de Puerto Berrio, Antioquia |
|  | <i>Solanum nigrum</i> | Municipio de Santa fe de Antioquia, Antioquia |

Las hojas y los tallos de la especie *Uncaria tomentosa* y *Picramnia spruceana*, fueron colectadas en las afueras del municipio de Puerto Berrio, Antioquia, por el profesor Alex Armando Sáez de la Universidad Eafit y Álvaro Cogollo, director del jardín botánico Joaquín Antonio Uribe. La muestra de la especie *Solanum nigrum*, fue colectada entre los municipios de San Jerónimo, Antioquia y Santa Fe de Antioquia, por las estudiantes Angélica María Córdoba, Angélica Posada y el profesor Alex Armando Sáez de la Universidad Eafit.

Tanto el Jardín botánico como la universidad EAFIT se rigen por los permisos, concesiones y demás autorizaciones ambientales para el uso y aprovechamiento de estas variedades vegetales, estipuladas en el decreto No 1376 el 27 de junio de 2013 por el ministerio de ambiente y desarrollo sostenible.

4.2 Obtención de extractos

Una vez conseguido todo el material vegetal de las tres especies de plantas, se dispuso a hacer una separación manual de las hojas y los tallos, posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente durante 3 días. Para las especies *Picramnia spruceana* y *Uncaria tomentosa* fue necesario un secado en estufa a 38°C por 24 horas, después de haber transcurrido los tres días, debido a que las hojas no se encontraban lo suficiente deshidratadas. Después del debido proceso de secado, las hojas de cada especie fueron trituradas en un molino de cereales, de forma separada; mientras que los tallos fueron lijados en una lijadora de banda chicha para conseguir una consistencia en polvo (Figura 5).

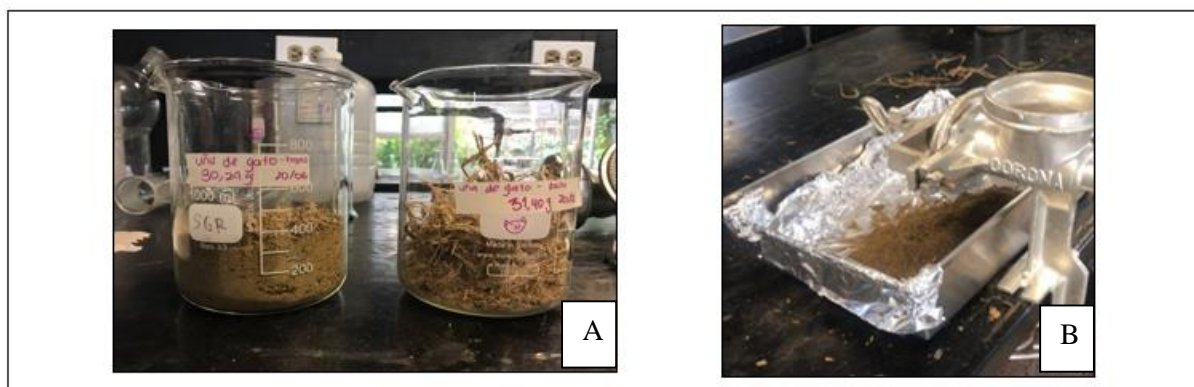


Figura 5. Procedimiento para la especie *Uncaria tomentosa*. A) tallo lijado y triturado. B) hojas molidas.

Luego de que las hojas y el tallo estuvieran secos, ligados y molidos se sometieron a una extracción por percolación con etanol al 96% a temperatura ambiente durante una semana, de forma separada, excepto para la especie *U. tomentosa* debido a que no se tenía el suficiente material vegetal. Del mismo modo se realizaron extractos con H₂O y a su vez se hicieron extractos completos (de forma conjunta, tanto hojas como tallos), con este mismo solvente. Después de haberse cumplido la semana, se elaboró un filtrado por gravedad para obtener el volumen suficiente de extracto. Este mismo se vertió en un beaker y se dejó secar en una estufa por 24 horas para lograr obtener el extracto final (Figura 6).



Figura 6. Procedimiento para la obtencion del extracto. Filtracion, obtencion del extracto y secado

4.3 Ensayos de citotoxicidad

Actividad citotóxica in vitro

La citotoxicidad se evaluó sobre monocitos humanos (líneas celular U-937 ATCC CRL-1593.2) en fase exponencial de crecimiento y ajustadas a una concentración de 1×10^5 células/mL de medio RPMI-1640 con 10% de Suero Fetal Bovino. Cien microlitros de la suspensión de células se dispensaron en cada pozo de un plato para cultivo celular de 96 pozos. A cada pozo

también se le adicionó 100 microlitos de la correspondiente concentración de los extractos a evaluar, incluyendo anfotericina B, que es uno de los medicamentos estándar para la leishmaniasis. Para todos los extractos y el control se evaluaron 4 concentraciones seriadas a partir de 200 µg/mL (200-50-12,5-3,125 microgramos/mL). Las células luego se incubaron durante 72 horas a 37°C y 5% CO₂. La actividad citotóxica de cada producto se determinó según el efecto en la viabilidad de las células utilizando el método el micrométodo enzimático con MTT, un ensayo que se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) producida por la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa en un compuesto coloreado de color azul (formazán) que se forma luego de la adición de MTT (10µl/pozo) e incubando las células expuestas o no a los compuestos a 37°C, 5% de CO₂ durante 3 horas. La reacción se detuvo con la adición de 100µl/pozo de isopropanol al 50% y 10% de SDS. Luego de 30 minutos se midió la producción de formazán en un espectrofotómetro a 570 nm (Pulido, Muñoz, Restrepo, Mesa, Alzate, Vélez & Robledo, 2012). Cada concentración del compuesto, así como el control de células sin extractos se evaluó por triplicado por cada concentración evaluada, en dos experimentos diferentes.

4.4 Ensayos de actividad leishmanicida

La efectividad de los compuestos se evaluó sobre amastigotes intracelulares de *L. (V) braziliensis* transfectada con el gene de la proteína verde fluorescente (GFP) (cepa MHOM/CO/88/UA301-EGFP). Para ello, células U-937 a una concentración de 300.000 células/ml mantenidas en medio RPMI 1640 con 0.1 µg/ml de PMA (phorbol-12-miristate-13-acetate) se infectaron con promastigotes en fase estacionaria (sextodía de crecimiento) en una proporción 30 parásitos por célula y las células en presencia de los parásitos se incubaron por 3 horas a 34°C con 5% de CO₂. Las células se lavaron dos veces con solución tampón de fosfato (PBS) con el fin de eliminar los parásitos no internalizados. Luego se adicionó un mL de medio fresco y se volvieron a incubar durante 24 horas, tiempo en el cual se estableció la infección pues los amastigotes intracelulares logran multiplicarse (Pulido., et al, 2012). Los macrófagos A las 24 horas posteriores a la infección se reemplazó el medio por medio fresco conteniendo cada uno de los compuestos a evaluar a las diferentes concentraciones (100 – 25

– 6.25 – 1.56 µg/mL), con el fin de determinar el porcentaje de inhibición de la infección. En paralelo se evaluaron células infectadas en incubadas en medio solo, sin compuesto, como control de infección y células expuestas a anfotericina B (control de actividad leishmanicida). Las células infectadas se expusieron a cada concentración del compuesto durante 72 horas y después de este tiempo, las células se retiraron del fondo del plato con una solución de tripsina/EDTA (250 mg). Las células desprendidas se centrifugaron a 1100 rpm por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante y las células se lavaron con 1 mL de PBS frío y centrifugadas a 1100 rpm por 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 500 µL de buffer de fosfatos. Posteriormente, las células se analizaron por citometría de flujo utilizando el citómetro Cytomics FC 500MPL, y haciendo lectura a 488 nm de excitación y 525 nm de emisión en un rayo láser de Argon y contando 10.000 (Pulido., et al, 2012). Cada concentración del compuesto, así como los controles, se evaluó por triplicado por cada concentración evaluada, en dos experimentos diferentes.

4.5 manejo de los datos

La citotoxicidad se determinó según los porcentajes de viabilidad y mortalidad obtenidos para condición experimental (extractos, anfotericina B y células solas) y los resultados se expresan como la máxima concentración media conocida como Concentración Letal cincuenta (CL₅₀), es decir, la concentración a la cual ocurre el 50% de muerte celular, calculada por el análisis Probit, un método paramétrico de regresión lineal que permite el análisis de la relación dosis-respuesta (Finney, 1978).

El porcentaje de viabilidad se calcula con la siguiente formula, donde las D.O del pozo control corresponde al 100% de viabilidad:

$$\% V = \frac{\text{D.O células expuestas}}{\text{D.O células control}} \times 100$$

A su vez, el porcentaje de mortalidad corresponde a 100 - % viabilidad

Con los % de mortalidad se calcula la Concentración Letal cincuenta (CL₅₀) por el método

Probit y con este valor se determina el grado de toxicidad, usando una escala previamente establecida, a saber: Citotoxicidad alta: $CL_{50} < 100 \mu\text{g/ml}$; citotoxicidad moderada $CL_{50} > 100$ y $< 200 \mu\text{g/ml}$ y citotoxicidad baja o potencialmente no citotóxico: $CL_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$.

Por su parte, la actividad leishmanicida se determinó según los porcentajes de células infectadas y la carga parasitaria obtenida para cada condición experimental, según los datos del clitómetro. Se determina el porcentaje de células infectadas según el número de eventos positivos fluorescencia verde (parásitos) y células mediante análisis de diagrama de puntos, al igual que la carga parasitaria según el análisis de la Intensidad de Fluorescencia Media para el canal de fluorescencia verde.

$$\% \text{ infección} = \frac{\text{IFM células infectadas y tratadas}}{\text{IFM células infectadas sin tratar}} \times 100$$

A su vez el porcentaje de inhibición corresponde a $100 - \% \text{ infección}$

Con los % de inhibición de la infección se calcula la Concentración Efectiva cincuenta (CE_{50}) por el método Probit y con este valor se determina el grado de actividad leishmanicida, usando una escala previamente establecida, a saber: Actividad alta: $CE_{50} < 25 \mu\text{g/ml}$; actividad moderada: $CE_{50} > 25$ y $< 50 \mu\text{g/ml}$ y actividad baja $CE_{50} > 50 \mu\text{g/ml}$.

El Índice de selectividad se calcula: $IS = CL_{50}/CE_{50}$. Se considera aceptable como promisorio un valor IS, mayor a 2. Sin embargo, entre más alto sea este valor, mayor potencial tendrá el extracto.

5 Resultados

Con los datos que se obtuvieron de los ensayos para la evaluación de citotoxicidad y actividad leishmanicida, se procedió a la elaboración de una interpretación de dosis-respuesta, es decir, la concentración en la cual se puede visualizar el efecto biológico en un 50%. En otros términos, se refiere a lo que llamamos concentración letal 50 (CL₅₀), relativo a la concentración en la que se observa la inhibición del 50% de la viabilidad de la población de células que fue expuesta a los extractos en los ensayos de citotoxicidad. Por otro lado, lo que corresponde a la concentración efectiva (CE₅₀), es decir, la actividad leishmanicida deseada; simboliza la concentración en donde fue posible contemplar una inhibición del 50% de viabilidad de los parásitos que se trataron con los extractos en los ensayos de actividad leishmanicida (Tabla 2). En el método para calcular estas dos concentraciones en los ensayos, se tuvieron en cuenta las Densidades ópticas y la intensidad de fluorescencia emitida proporcional al número de células viables y células con parásitos vivos.

En términos generales, se logró apreciar que seis de los siete extractos a evaluar poseían una toxicidad de alta a moderada para las células en las que se desarrolló el ensayo. La CL₅₀ de todos los extractos a evaluar vario de 10,49 ug/mL a 200 ug/mL. El único extracto cuya concentración se muestra menos citotóxica fue de las hojas y los tallos en solvente etanólico de la especie *U. tormentosa*.

Solamente uno de los siete extractos a evaluar mostró actividad leishmanicida, correspondiente a las hojas en solvente etanólico de la especie *S. nigrum*. Los otros seis extractos evaluados mostraron una actividad contra leishmaniasis de baja a moderada, dos de ellas con citotoxicidad mayor a la actividad.

Cabe resaltar que el extracto correspondiente a las hojas y los tallos de la especie vegetal *S. nigrum* no fue posible de usar para la elaboración de ensayos de citotoxicidad ni actividad leishmanicida debido a que durante el proceso fue contaminado con un organismo fúngico.

Tabla 2. Actividad citotóxica y leishmanicida *in vitro* de los extractos de tres especies de plantas medicinales. CL₅₀: Concentración letal 50. CE₅₀: Concentración efectiva 50. DS: Desviación estándar. IS: Índice de selectividad.

| Extracto | CL ₅₀ (ug/mL) | | Interpretación | CE ₅₀ (ug/mL) | | | Interpretación |
|--|-----------------------------|-------|-------------------------------|-----------------------------|------|-------|---|
| | X | DS | | X | DS | IS | |
| <i>Uncaria tomentosa</i> Hojas+Tallo/H2O | 24,46 | 6,89 | Alta citotoxicidad | 54,38 | 4,34 | 0,45 | Baja actividad |
| <i>Uncaria tomentosa</i> Hojas+Tallo/Etanol | >200 | NA | Potencial no citotoxicidad | >50 | NA | <4 | Baja actividad |
| <i>Picramnia spruceana</i> Hojas+Tallo/H2O | 24,67 | 3,11 | Alta citotoxicidad | >12 | NA | <2,05 | Citotoxicidad mayor que actividad |
| <i>Picramnia spruceana</i> Hojas/H2O | 126,27 | 20,73 | Citotoxicidad Moderada | >50 | NA | <2,52 | Baja actividad |
| <i>picramnia spruceana</i> Hojas/Etanol | 13,16 | 1,77 | Alta citotoxicidad | >7 | NA | <1,88 | Citotoxicidad mayor que actividad |
| <i>Solanum nigrum</i> Hojas/H2O | 16,29 | 2,1 | Alta citotoxicidad | 48,19 | 3,71 | 0,34 | Actividad moderada |
| <i>Solanum nigrum</i> Hojas/Etanol | 10,49 | 0,85 | Alta citotoxicidad | 20,38 | 1,26 | 0,51 | Alta actividad |
| Controles | | | | | | | |
| Doxorrubicina | 1,2 | 0,7 | Alta toxicidad | | | | |
| Anfotericina B | 32,6 | 4 | Alta toxicidad | 0,3 | 0,06 | 108.6 | Alta actividad |

6 Análisis

Así como se puede observar en la (Tabla 2) y como se describe en el capítulo de los resultados, de los siete extractos que fueron usados para esta investigación solamente el extracto de hoja y tallo en solvente etanólico de la especie vegetal *U. tormentosa*, logró mantener un valor mayor a 200ug/mL de la CL₅₀, lo que corresponde a una concentración mucho mayor, necesaria para una citotoxicidad, comparándola con el extracto de la misma especie en solvente acuoso que solamente necesita una concentración de 24,46ug/mL para llegar a ser tóxica para la célula; sin embargo cuando se realiza una comparación entre los valores de la CE₅₀ de los dos extractos, ambas parecen no tener una concentración ideal para poseer actividad leishmanicida, pues es necesaria una concentración mayor a 50ug/mL para logra un efecto en el parasito (Figura 4), lo cual no resulta ser muy productivo si se piensa para una aplicación farmacológica. Esto quiere decir que los extractos etanólicos y acuosos provenientes de la especie *U. tomentosa* no se manifiestan para futuras investigaciones en actividad antiparasitaria del género *Leishmania*, a pesar de que uno de ellos no presente toxicidad para la célula.

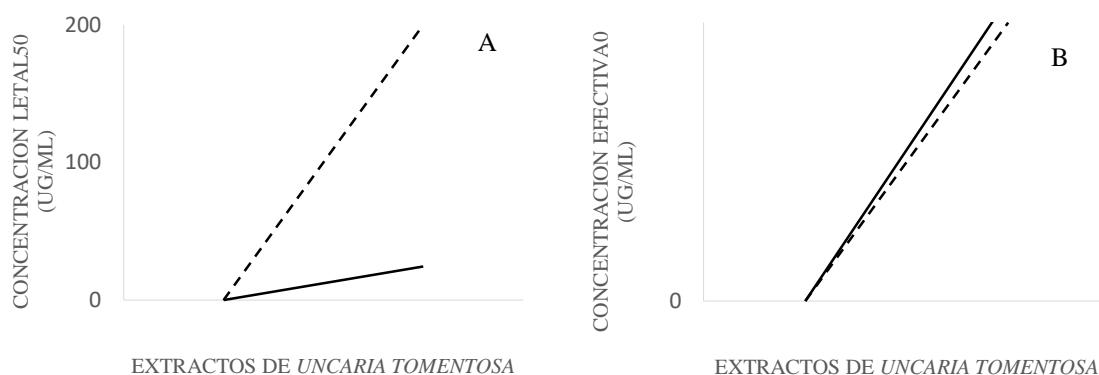


Figura 7. Comparación de los resultados de los extractos provenientes de la planta *Uncaria tomentosa*. A) Efecto citotóxico de los extractos. B) Actividad leishmanicida de los extractos. La línea punteada corresponde a el extracto de tallo y hoja en solvente etanolico de *Uncaria tomentosa*, mientras que la línea solida representa el extracto de tallo y hoja en solvente acuoso de la especie *Uncaria tomentosa*.

Cuando se contemplan los resultados de la actividad leishmanicida que obtuvieron los extractos evaluados, es posible determinar que solo uno de ellos, el extracto de las hojas en solvente etanólico de la especie *S. nigrum*, arrojó una concentración lo suficientemente baja de 20,38ug/mL, capaz de tener actividad letal contra *L. braziliensis*, lo que correspondería a un extracto candidato para futuras investigaciones de no ser por el resultado en la CL₅₀ de 10,49ug/mL que indica que puede generar toxicidad en la célula a muy bajas concentraciones, que pese a que es un valor menor a su concentración efectiva, no se compensa para llegar a ser considerado como una terapia alternativa para la leishmaniasis. Aun así, se tomó en cuenta la elaboración de una comparación entre los dos extractos provenientes de la especie *S. nigrum* con el fin de dar a conocer cual solvente resultaría ser más efectivo de acuerdo a su actividad citotóxica y leishmanicida, infiriendo por los valores obtenidos, que pese a que el extracto de hojas y tallos en solvente acuoso de *S. nigrum* también muestra una actividad leishmanicida considerable, el extracto de hojas y tallos en solvente etanolico continua siendo más aceptable tanto por sus valores en la concentración efectiva como por los de la concentración letal (Figura 5).

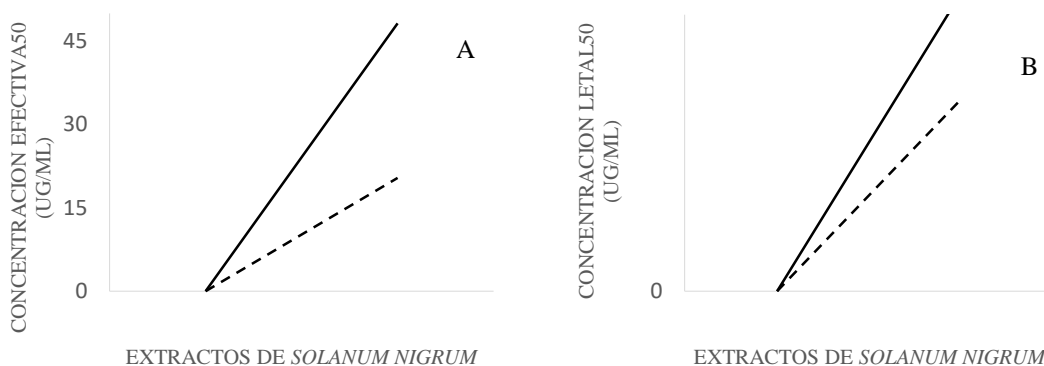


Figura 8. Comparación de los resultados de los extractos provenientes de la planta *Solanum nigrum*. A) Efecto citotóxico de los extractos. B) Actividad leishmanicida de los extractos. La línea punteada corresponde a el extracto de hoja en solvente etanolico de *Solanum nigrum*, mientras que la línea solida representa el extracto de hoja en solvente acuoso de la especie *Solanum nigrum*.

Cabe resaltarla que aquellos dos extractos que mostraron un resultado a considerar, extracto

de hojas en solvente etanolico de *Solanum nigrum* para actividad leishmanicida y extracto de tallo y hojas en solvente etanólico de *Uncaria tomentosa* para citotoxicidad, poseen la similaridad de haber sido extraídos a partir del etanol, asumiendo que probablemente este solvente con polaridad intermedia, posee la capacidad de formar enlaces y ceder electrones que permiten la atracción y asociación de iones de los compuestos orgánicos que al estar a temperaturas considerablemente altas en el procedimiento de la extracción, ayudaron a la penetración del solvente y a su vez a una posible mejora en la extracción de los metabolitos de las plantas. Demostrando esta especulación no solo en estos dos extractos sino en todos los que se elaboraron a partir de una extracción etanólica, que indicaron tener una mayor actividad leishmanicida de acuerdo con un valor más bajo en la concentración efectiva necesaria para la letalidad del parásito en comparación a los extractos en solvente acuoso correspondiente a la misma especie vegetal. Otro factor que se pondría

El IS en este caso, es el valor numérico que relaciona la actividad de la célula frente a la actividad del parásito, es decir, mientras este valor sea más alto, mayor concentración será necesaria para generar muerte celular en comparación con la concentración precisada para matar el parásito, por desgracia ninguno de los extractos manifestó un índice de selectividad notablemente alto, es decir, mayor 2 ug/mL, para considerar que alguno de los extractos que se llegó a evaluar, no pueda convertirse en un compuesto nocivo por un leve aumento de su concentración.

A pesar de que uno de los extractos en los que se observó un resultado significativo provenía de la extracción de hojas y tallos, no se puede llegar a sugerir que el origen del extracto sea en beneficio a la combinación que se hizo de las dos partes de la planta, pues aun cuando se esperaba que existiese una desigualdad entre los valores de citotoxicidad o actividad leishmanicida de los extractos desarrollados a partir de la hoja y el tallo a los extractos que se elaboraron con solo la hoja, el proyecto no arrojó una variación entre ellos.

7 conclusiones y perspectivas

- De los 7 extractos evaluados en el presente trabajo, solamente uno proveniente de las hojas en solución etanólica de la especie *Solanum nigrum*, evidenció un efecto leishmanicida sobre los promastigotes de *L. braziliensis*, pero una alta actividad citotóxica. Este resultado sugiere la existencia de propiedades leishmanicidas para dicha especie vegetal, pero descarta la posibilidad de estudios posteriores como alternativa de tratamiento para la leishmaniasis.
- Los extractos producidos a través de un solvente etanólico demostraron concentraciones más bajas, necesarias para la letalidad del parásito, lo que se atribuye a una mejor extracción de metabolitos por parte de solventes etanólicos.
- Con excepción del extracto de hojas de tallos de la especie *U. tomentosa*, todos los extractos resultaron poseer actividad citotóxica. En consecuencia, a esto, se excluye la oportunidad de usar dichos extractos para futuras investigaciones antiparasitarias, no obstante, no se excluye la eventualidad de estudiar estos extractos como potencial anticancerígeno dada su toxicidad.
- Ninguno de los extractos evaluados mostró ser lo suficientemente activo contra *L. braziliensis* y poco citotóxico, como para llegar a remplazar o competir con los fármacos existentes en el mercado a base de sales antimoniales pentavalentes.
- Los extractos no poseen las propiedades que se le atribuía a las especies de plantas medicinales en el saber popular, sin embargo, ninguno de ellos fue elaborado como el emplasto tradicional. Es por tal motivo que no se suprime la idea de evaluar dichas preparaciones tal y como se sugiere en la literatura.

8 Referencias

- Alvar, J., Velez, I. D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J & WHO Leishmaniasis Control Team. (2012). Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *PloS one*, 7(5), e35671.
- Bernal Gutiérrez, J. M., López Ortiz, A. F., Murillo Perea, E., & Méndez, J. J. (2014). Flora silvestre medicinal utilizada por los Kofan colombianos en el tratamiento de la leishmaniasis cutánea. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(4), 407-420
- Bustamante Rojas, C. Fases del desarrollo de un nuevo medicamento. Universidad de la Sabana, Colombia.
- Chappuis, F., Sundar, S., Hailu, A., Ghalib, H., Rijal, S., Peeling, R. W & Boelaert, M. (2007). Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. *Nature reviews microbiology*, 5(11supp), S7.
- CORTADI, A., ANDRIOLO, L., CAMPAGNA, M. N., MARTÍNEZ, M. L., Di SAPIO, O., BROUSSALIS, A., ... & GATTUSO, S. (2010). Estudio farmacobotánico de hojas, cortezas y leños de Simaroubaceae sensu lato de Argentina. Parte I. Alvaradoa subovata Cronquist, Picramnia parvifolia Engl., Picramnia sellowii Planch. y Castela coccinea Griseb. *Boletín Latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 9.
- Coy Barrera, C. A., Cuca Suárez, L. E., & Quintero Londoño, C. (2013). Farmacognosia y farmacobotánica de especies pertenecientes a los géneros Esenbeckia y Raputia (Rutaceae). *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(4), 638-653.
- De Medeiros, P. M., Ladio, A. H., Santos, A. M. M., & de Albuquerque, U. P. (2013). Does the selection of medicinal plants by Brazilian local populations suffer taxonomic influence?. *Journal of ethnopharmacology*, 146(3), 842-852.
- D'Suze, C., & García, C. (1993). Epidemiología de la Leishmaniasis. *Dermatología Venezolana*, 31.

- Fakhfakh, M. A., Fournet, A., Prina, E., Mouscadet, J. F., Franck, X., Hocquemiller, R., & Figadère, B. (2003). Synthesis and biological evaluation of substituted quinolines: potential treatment of protozoal and retroviral co-infections. *Bioorganic & medicinal chemistry*.
- Franciscone, P. (2014). Posíveis efeitos tóxicos e imunotóxicos da *Uncaria tomentosa* em ratos. Teses USP.
- Gaudio, G., Valderrama, A. M., & Ávila Cárdenas, J. (2016). Leishmaniasis cutánea. A propósito de un caso con buena respuesta al Fluconazol. *Medicina Cutánea Ibero-Latinoamericana*, 43(3), 226-228.
- Giraldo Vásquez, L. M., & Ramírez Aristizabal, L. S. (2013). Evaluación de la actividad antioxidante de extractos de *Palicourea guianensis* (Rubiaceae). *Revista Cubana de Farmacia*, 47(4), 483-491.
- González, M., Benito, F., García, L., & Iglesias, A. (2009). Leishmaniasis mucocutánea: una enfermedad importada con repercusión en ORL. *Acta Otorrinolaringológica Española*, 60(4), 298-300.
- Grevelink, S.A. y E.A. Lerner, Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*, 1996. 34(2 Pt 1): p. 257-72
- Guamán, I. G., Armijos, M. A., & Mancheno, J. S. (2017). Leishmaniasis Cutánea. *Revista Médica HJCA*, 5(2), 181-186.
- Hall LR, Titus RG. Sand fly vector saliva selectively modulates macrophage functions that inhibit killing of *Leishmania major* and nitric oxide production. *J Immunol* 1995; 155:3501-6.
- Henao, H. H., Osorio, Y., Saravia, N. G., Gómez, A., & Travi, B. (2004). Eficacia y toxicidad de los antimoniales pentavalentes (Glucantime y Pentostam) en un modelo animal de leishmaniasis cutánea americana: aplicación de la luminometría. *Biomédica*, 24(4), 393-402.
- Hepburn N, Nolan J, Fenn L, Herd R, Neilson J, Sutherland G, et al. Cardiac effects of sodium stibogluconate: Myocardial, electrophysiological and biochemical studies.

- QJM. 1994;87(8):465-472.
- Horák, M., Somerlíková, K., Kavenská, V., Cruz, L. G., Škrabáková, L., Tournon, J., ... & Pineda, N. A. C. (2015). Etnobotánica y fitoterapia en américa. *Brno-República Checa: Facultad de desarrollo regional y estudios internacionales*, 74-84.
- Iniesta, F. M., & Luengo, F. M. (1982). *Manual para el diagnóstico de leishmaniasis*. EDITUM.
- Jiménez, P. K. (2016). Leishmaniasis cutánea. *Revista Médica de Costa Rica y Centroamérica*, 73(618), 17-21.
- Journal of technology management & innovation, 8, 50-50.
- Koneman, E. W., & Allen, S. (2008). *Koneman. Diagnostico Microbiologico/Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/Text and Color Atlas*. Ed. Médica Panamericana
- Kumar, A. (2013). *Leishmania and leishmaniasis*. New York: Springer.
- Leishmania viannia in Colombia. *Am J Trop Med Hyg*, 2002. 66(6): p. 738-44.
- Manrique-Abril, R. A., & Manrique-Abril, F. G. (2006). ETNOBOTÁNICA DE LA RESERVA FORESTAL PROTECTORA “EL MALMO” MUNICIPIO DE TUNJA. *SALUD, HISTORIA Y SANIDAD ON-LINE*, 1(1).
- Ministerio de la Protección Social. Instituto Nacional de Salud. Organización Panamericana de la Salud. (2010). Guía para la atención clínica integral del paciente con leishmaniasis.
- Ministerio de Salud. Oficina General de Epidemiología. Módulos Técnicos. Serie de Monografías. Leishmaniasis. Lima, Perú. 2000:08-83
- Mishra, B. B., Kishore, N., Singh, R. K., & Tiwari, V. K. (2013). Scope of Alkaloids in Antileishmanial Drug Discovery and Development. In *Natural Products* (pp. 1263-1299). Springer, Berlin, Heidelberg.
- Montalvo Álvarez, A. M. (2010). Leishmaniasis.: Aspectos de interés sobre un parasitismo exótico para Cuba. *Revista Cubana de Higiene y Epidemiología*, 48(1), 0-0

- Muskus, C. E., & Villa, M. M. (2002). Metaciclologénesis: un proceso fundamental en la biología de Leishmania. *Biomedica*, 22(2), 167-77.
- Muthaura, C. N., Rukunga, G. M., Chhabra, S. C., Mungai, G. M., & Njagi, E. N. M. (2007).
- Myler, P.J. y N. Fasel, *Leishmania : after the genome*. 2008, Wymondham: Caister Academic. xiv, 306 p., [1] p. of plates
- Nógaló, A., Molina, S. G., Norry, G. A., Romano, S., & Lorenz, A. M. (2012). Leishmaniasis cutánea primaria. *Dermatología Argentina*, 18(3), 228-231.
- Padrón-Nieves, M., & Ponte-Sucre, A. (2013). Marcadores de resistencia en Leishmania. *Archivos Venezolanos de Farmacología y Terapéutica*, 32(2), 29-33.
- Perez-Molina, J. A., Díaz-Menéndez, M., Perez-Ayala, A., Ferrere, F., Monje, B., Norman, F., & Lopez-Velez, R. (2010). Tratamiento de las enfermedades causadas por parásitos. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica*, 28(1), 44-59.
- Quintana Arias, R. F. (2016). Estudio de plantas medicinales usadas en la comunidad indígena Tikuna del alto Amazonas, Macedonia.
- Ravi, V., Saleem, T. M., Patel, S. S., Raamamurthy, J., & Gauthaman, K. (2009). Anti-inflammatory effect of methanolic extract of *Solanum nigrum* Linn berries. *International Journal of Applied Research in Natural Products*, 2(2), 33-36.
- Reithinger, R., Dujardin, J. C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., & Brooker, S. (2007).
- Rodríguez-Echeverry, J. J. (2010). Uso y manejo tradicional de plantas medicinales y mágicas en el Valle de Sibundoy, Alto Putumayo, y su relación con procesos locales de construcción ambiental. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 34(132), 309-326.
- Rojas Cabrera, E., Paz, D., Aleida, V. O., Córdova Rojas, M., Rivero, G., & Miguel, J. (2017). Tratamiento combinado de Leishmaniasis mucosa posterior a falla terapéutica con tratamiento convencional: reporte de caso clínico. *Gaceta Médica Boliviana*, 40(1), 46-48. , 11(23), 5013-5023
- Saravia, N. G., Weigle, K., Navas, C., Segura, I., Valderrama, L., Valencia, A. Z., ... & McMahon-Pratt, D. (2002). Heterogeneity, geographic distribution, and

pathogenicity of serodemes of *Leishmania viannia* in Colombia. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 66(6), 738-744.

Souza, R. K. D., Mendonça, A. C. A. M., & Pessoa da Silva, M. A. (2013). Aspectos etnobotánicos, fitoquímicos y farmacológicos de especies de Rubiaceae en Brasil. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 18(1), 140-156

Suárez, J. F. S. (2011). Efecto leishmanicida e inmunomodulador in vitro de extractos y compuestos de plantas colombianas de las familias Lauraceae y Rutaceae.

Traditional phytotherapy of some remedies used in treatment of malaria in Meru district of Kenya. *South African Journal of Botany*, 73(3), 402-411.

Trujillo, W., & Betancourt, V. H. G. (2011). Plantas medicinales utilizadas por tres comunidades indígenas en el noroccidente de la amazonia (colombia). *Mundo amazónico*, 2, 283-306.

Universidad de California. (1973). Pamphlets on protozoology. Kofoid collection.

Vásquez de Ricciardi, L. (2009). Terapéutica antileishmania: revisando el pasado, el presente y el futuro. *Gaceta Médica de Caracas*, 117(2), 93-111.

Velez, I. D., Hendrickx, E., Robledo, S. M., & Agudelo, S. D. P. (2001). Leishmaniosis cutánea en Colombia y género. *Cadernos de Saúde Pública*, 17, 171-180.

World Health Organization. (2010). Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. In Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis.. World Health Organization.

Zijlstra, E.E. y A.M. el-Hassan, Leishmaniasis in Sudan. Visceral leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 2001. 95 Suppl 1: p. S27-58