

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

**Evaluación de citotoxicidad y actividad leishmanicida de
compuestos derivados de Pirazolonas en macrófagos murinos
RAW 264.7 y *Leishmania mexicana***

Daniel Sebastian Vallejo Vera

Ingeniería en Biotecnología

Trabajo de fin de carrera presentado como requisito
para la obtención del título de
Ingeniero en Biotecnología

Quito, 18 de diciembre de 2024

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Ciencias Biológicas y Ambientales

HOJA DE CALIFICACIÓN DE TRABAJO DE FIN DE CARRERA

**Evaluación de citotoxicidad y actividad leishmanicida de compuestos
derivados de Pirazolonas en macrófagos murinos RAW 264.7 y *Leishmania
mexicana***

Daniel Sebastian Vallejo Vera

Nombre del profesor, Título académico

Patricio Rojas Silva, M.D., Ph.D.

Quito, 18 de diciembre de 2024

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombres y apellidos: Daniel Sebastian Vallejo Vera

Código: 00321851

Cédula de identidad: 0925757296

Lugar y fecha: Quito, 18 de diciembre de 2024

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following capstone project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

RESUMEN

El género *Leishmania* es responsable de la leishmaniasis, una enfermedad parasitaria con alto impacto en salud pública, particularmente en áreas endémicas de América Latina. Este estudio evaluó la actividad leishmanicida y citotóxica de derivados de pirazolonas contra *Leishmania mexicana*, un modelo relevante debido a su prevalencia en la región. Se utilizaron ensayos de colorimetría mediante la reducción de MTT in vitro para determinar los parámetros IC50 (Concentración Inhibitoria 50%), CC50 (Concentración Citotóxica 50%) e índice de selectividad (SI), utilizando promastigotes de *L. mexicana* y macrófagos murinos RAW 264.7. Entre los compuestos probados, PIR 12, PIR 19 y PIR 10 destacaron por su actividad antiparasitaria y selectividad tras 72 horas de exposición, alcanzando SI superiores a 7. Los resultados indican que el aumento del tiempo de exposición mejora la eficacia y selectividad de los compuestos. Compuestos como PIR 09 mostraron una excelente actividad leishmanicida con baja citotoxicidad, mientras que otros, como PIR 14 y PIR 16, exhibieron actividad moderada pero mejoraron significativamente en tiempos prolongados. Estos hallazgos subrayan el potencial de los derivados de pirazolonas como candidatos terapéuticos para la leishmaniasis, ofreciendo una alternativa prometedora frente a las limitaciones de los tratamientos actuales. Su perfil favorable en términos de síntesis, costo y eficacia podría contribuir al desarrollo de terapias más accesibles y sostenibles para las comunidades más afectadas por esta enfermedad.

Palabras clave: *Leishmaniasis, Leishmania mexicana, MTT, Pirazolonas, Actividad leishmanicida, Citotoxicidad, Macrófagos RAW 264.7*

ABSTRACT

The genus *Leishmania* is responsible for leishmaniasis, a parasitic disease with a significant public health impact, particularly in endemic areas of Latin America. This study evaluated the leishmanicidal and cytotoxic activity of pyrazolone derivatives against *Leishmania mexicana*, a relevant model due to its prevalence in the region. Colorimetric assays using MTT reduction in vitro were employed to determine the IC₅₀ (50% Inhibitory Concentration), CC₅₀ (50% Cytotoxic Concentration), and Selectivity Index (SI) parameters, using *L. mexicana* promastigotes and RAW 264.7 murine macrophages. Among the tested compounds, PIR 12, PIR 19, and PIR 10 stood out for their antiparasitic activity and selectivity after 72 hours of exposure, achieving SIs greater than 7. The results indicate that increased exposure time enhances the efficacy and selectivity of the compounds. Compounds such as PIR 09 exhibited excellent leishmanicidal activity with low cytotoxicity, while others, such as PIR 14 and PIR 16, showed moderate activity but improved significantly with prolonged exposure. These findings highlight the potential of pyrazolone derivatives as therapeutic candidates for leishmaniasis, offering a promising alternative to current treatment limitations. Their favorable profile in terms of synthesis, cost, and efficacy could contribute to the development of more accessible and sustainable therapies for communities most affected by this disease.

Keywords: Leishmaniasis, Leishmania mexicana, MTT, Pyrazolones, Leishmanicidal activity, Cytotoxicity, RAW 264.7 macrophages.

TABLA DE CONTENIDO

Introducción	10
Métodos.....	14
Cultivo celular de RAW 264.7.....	14
Cultivo in vitro de <i>Leishmania mexicana</i>	14
Evaluación actividad citotóxica en macrófagos murinos RAW 264.7	14
Evaluación actividad leishmanicida en <i>L. mexicana</i>	15
Evaluación de viabilidad celular con ensayos MTT	15
Resultados	16
Discusión.....	18
Conclusiones	22
Tablas.....	23
Figuras.....	25
Referencias bibliográficas.....	27

ÍNDICE DE TABLAS

Tablas.....	23
Tabla 1. Bioactividad encontrada a las 48 horas.....	23
Tabla 2. Bioactividad encontrada a las 72 horas.....	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figuras.....	25
Figura 1. Comparación del IC ₅₀ vs CC ₅₀ evaluado a 48 horas.....	25
Figura 2. Comparación del IC ₅₀ vs CC ₅₀ evaluado a 72 horas.....	26

INTRODUCCIÓN

El género *Leishmania* comprende protozoos parásitos de la familia *Trypanosomatidae*, responsables de la leishmaniasis, una enfermedad de gran relevancia en salud pública a nivel mundial. Este género comprende más de 20 especies patógenas que afectan tanto a humanos como a animales. La transmisión ocurre a través de la picadura de hembras infectadas de flebótomos de los géneros *Phlebotomus* (Viejo Mundo) y *Lutzomyia* (Nuevo Mundo). En su ciclo de vida digenético, *Leishmania* alterna entre promastigotes flagelados en el vector y amastigotes intracelulares en macrófagos del huésped mamífero. Esta capacidad de invadir y sobrevivir dentro de macrófagos permite a los parásitos evadir la respuesta inmune, lo que contribuye al desarrollo de infecciones crónicas y potencialmente graves (Hashiguchi et al., 2020).

La leishmaniasis se presenta en tres formas clínicas principales: leishmaniasis cutánea (LC), que genera úlceras dérmicas; leishmaniasis mucocutánea (LMC), asociada con destrucción de mucosas; y leishmaniasis visceral (LV), que afecta órganos internos como el hígado y el bazo, con alta mortalidad si no se trata. En América Latina, *Leishmania mexicana* es una de las especies responsables de la leishmaniasis cutánea, una forma generalmente localizada pero incapacitante debido a las cicatrices permanentes que produce (Hashiguchi et al., 2020). En Ecuador, la leishmaniasis es una enfermedad endémica que afecta predominantemente a las provincias amazónicas, donde las condiciones ecológicas y climáticas favorecen su transmisión. Solo en el último lustro, el país reportó un promedio anual de 1085 casos de leishmaniasis, destacándose por su persistencia en regiones de difícil acceso. En 2023, las provincias con mayor incidencia fueron Morona Santiago (99 casos), Orellana (88 casos) y Pastaza (48 casos), que juntas concentraron aproximadamente el 66% de los casos notificados a nivel nacional. Estas cifras reflejan el impacto de factores como la interacción humana con

los vectores en actividades como agricultura, minería y expansión de asentamientos humanos (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2024).

En la región andina, aunque la incidencia es significativamente menor, Pichincha reportó 28 casos en 2023, vinculados principalmente a migraciones desde zonas endémicas y a cambios en el uso del suelo en áreas rurales y periurbanas. A nivel nacional, la leishmaniasis sigue siendo un desafío de salud pública, especialmente en comunidades con acceso limitado a diagnóstico, tratamiento y recursos sanitarios, lo que dificulta el control de la enfermedad (Ministerio de Salud Pública del Ecuador, 2024). A pesar de ser endémica desde inicios del siglo XX, la enfermedad sigue siendo un desafío en Ecuador. Factores como la pobreza, el desplazamiento poblacional y el cambio climático han exacerbado la transmisión. Las actividades humanas en áreas selváticas, como la minería, la agricultura y la expansión de asentamientos humanos, han incrementado el riesgo de exposición al vector. Además, la vigilancia y control de la leishmaniasis enfrentan limitaciones debido a desigualdades en el acceso a recursos, diagnóstico y tratamiento oportuno (Hashiguchi et al., 2016).

El tratamiento de la leishmaniasis se basa principalmente en el uso de antimoniales pentavalentes, anfotericina B y miltefosina, cada uno con mecanismos de acción específicos. Los antimoniales, como el antimonio de meglumina, inhiben enzimas esenciales en el metabolismo energético del parásito, mientras que la anfotericina B altera la membrana celular al unirse al ergosterol, provocando muerte celular (Mesquita, Tempone & Reimão, 2014; Vásquez de Ricciardi, 2009). Por su parte, la miltefosina, un derivado de fosfocolina, afecta la biosíntesis de lípidos y la señalización celular en el parásito. Sin embargo, estos tratamientos presentan limitaciones significativas. La alta toxicidad de los antimoniales y la anfotericina B, que puede causar nefrotoxicidad y hepatotoxicidad, junto con los regímenes prolongados y costosos, dificultan la adherencia al tratamiento. Además, la miltefosina, aunque menos tóxica,

tiene costos elevados, requiere acceso constante a centros de salud, lo que la hace poco accesible para poblaciones de bajos recursos en áreas endémicas, y solo está aprobada para su uso en leishmaniasis visceral (Ferreira et al., 2023; Benaim, G., & Paniz-Mondolfi, A. (2024)).

A estas limitaciones se suma la problemática del desarrollo de resistencia. El uso extensivo y prolongado de los antimoniales en regiones endémicas ha resultado en la aparición de cepas resistentes, disminuyendo la eficacia de los tratamientos tradicionales. Este escenario demuestra la urgente necesidad de desarrollar nuevas opciones terapéuticas que combinen eficacia contra el parásito con un perfil de toxicidad más favorable (Proaño-Bolaños et al., 2024). Por esta razón, los compuestos derivados de pirazolonas han surgido como candidatos prometedores debido a su potencial leishmanicida y propiedades farmacológicas únicas que pueden ofrecer una alternativa segura y accesible frente a la resistencia creciente (segundo archivo).

Las pirazolonas constituyen una clase de compuestos heterocíclicos ampliamente estudiados en farmacología por su versatilidad. Entre sus aplicaciones terapéuticas más conocidas destacan su uso como analgésicos y antiinflamatorios, siendo el metamizol un ejemplo representativo (Angarita Rueda, 2016). Estas moléculas tienen características químicas que posibilitan su modificación lo que abre paso a la investigación de nuevos efectos terapéuticos. Recientes investigaciones han identificado ciertos derivados de pirazolonas con actividad antiparasitaria, lo que sugiere su capacidad para interactuar con enzimas específicas o inducir estrés oxidativo en parásitos como *Leishmania*. El estudio de nuevos derivados es esencial para evaluar su eficacia específica contra *Leishmania* y su citotoxicidad en células del huésped. Su fácil síntesis y bajo costo abre la posibilidad de diseñar compuestos con mayor afinidad por blancos moleculares del parásito, reduciendo el impacto en células de mamíferos,

los convierte en una opción viable para enfrentar los desafíos actuales del tratamiento de la leishmaniasis (Licto Iler, 2016; Araujo, 2020).

Los macrófagos murinos de la línea celular RAW 264.7 son una herramienta clave en estudios *in vitro*, ya que representan un modelo confiable del sistema inmunitario. *Leishmania* invade macrófagos en el huésped mamífero, lo que hace de estas células un modelo esencial para evaluar tanto la actividad leishmanicida como la citotoxicidad de los compuestos en estudio. La línea RAW 264.7, derivada de células murinas, permite estudiar las interacciones huésped-parásito bajo condiciones controladas. Evaluar la citotoxicidad en estos macrófagos es crucial para garantizar que los compuestos derivados de pirazolonas sean seguros y selectivos, minimizando los efectos adversos en células del sistema inmunitario del huésped (Rodrigues et al., 2021).

Por esto, dentro de este estudio se comprende el análisis de los efectos citotóxicos de estos compuestos en macrófagos RAW 264.7, la determinación de su efectividad contra *Leishmania mexicana* y la determinación de su potencial como alternativas terapéuticas. Estos objetivos poseen una gran relevancia en el contexto de la búsqueda de tratamientos innovadores y accesibles para la leishmaniasis, que puedan superar las limitaciones de las terapias actuales al ofrecer mayor seguridad y eficacia. Este enfoque busca contribuir al desarrollo de opciones terapéuticas sostenibles, especialmente dirigidas a las poblaciones más afectadas por esta enfermedad.

MÉTODOS

Cultivo celular de RAW 264.7

Se descongeló las células preservadas criogénicamente. Luego, se sembró las células en frascos de cultivo T25, utilizando el medio DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) (Corning), suplementado con 1 % de antibiótico Pen-Strep (Gibco™) y un 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Gibco™). Se incubó las células a 37°C, con 100% de humedad y 5% de CO₂. Se lavó con PBS 1X y se realizó cambios de medio cada 48 horas. Finalmente, se llevó a cabo pases al alcanzar 80% de confluencia celular.

Cultivo in vitro de *Leishmania mexicana*

Se descongeló los parásitos preservados criogénicamente. Posteriormente, se sembró en frascos T25 utilizando medio RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute medium) (Lonza Bio-Whittaker), suplementado con 1 % de antibiótico Pen-Strep (Gibco™) y 10 % de suero fetal bovino (FBS) (Gibco™). Se incubó a 25 °C, se lavó con PBS 1X y se realizaron cambios de medio cada 48 horas. Para promover la diferenciación hacia su forma amastigota, se recolectó la suspensión de parásitos y se absorbió a través de una jeringa para su transferencia a un tubo cónico. Luego, se transfirió al agar sangre de oveja y, tras 48 horas de incubación a 25 °C, se cultivó en frascos T25. Este proceso se repitió cada 4-5 días para mantener el crecimiento e infectividad del parásito.

Evaluación actividad citotóxica en macrófagos murinos RAW 264.7

Primero, se realizó un lavado completo de las células. Luego, se añadió sDMEM (DMEM suplementado) y se desprendieron las células mediante un raspador celular, para transferirlas a un tubo cónico. Se contó las células con azul de tripán en una cámara de Neubauer para preparar una solución con una densidad celular de 60.000 células/mL. Se

dispensó 100 μ L en cada pocillo y se colocó la placa en un agitador durante diez minutos. Se incubó la placa durante 16 horas y pasado este tiempo, se dispensó 100 μ L en triplicado las soluciones de interés (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M y 0.01 μ M), agitando la placa después. Se incluyó los controles negativos (sDMEM), positivo (sDMEM con saponina a 4 mg/mL) y de crecimiento (sDMEM con DMSO al 1%).

Evaluación actividad leishmanicida en *L. mexicana*

Primero, se centrifugó y se lavó las células con PBS 1x. Luego, se resuspendió el pellet en sRPMI (RPMI suplementado), se filtró su contenido y se lo transfirió a un tubo cónico. A partir de esto, se contó los parásitos en una cámara de Neubauer para preparar una solución con una densidad de 10.000.000 parásitos/mL. Se dispensó 100 μ L en cada pocillo y se colocó la placa en un agitador durante diez minutos. Inmediatamente, se dispensó 100 μ L en triplicado de las soluciones de interés (100 μ M, 10 μ M, 1 μ M, 0.1 μ M y 0.01 μ M), y se agitó la placa. Finalmente, se incluyó los controles negativo (sRPMI), positivo (sRPMI con AmpB a 2 μ M) y de crecimiento (sRPMI con DMSO al 1 %).

Evaluación de viabilidad celular con ensayos MTT

La placa se incubó durante 48/72 horas. Pasado este tiempo, se añadió 20 μ L de solución de MTT (5 mg/mL), y se agitó durante 10 minutos protegida de la luz. Se incubó durante 2 horas con sus respectivas condiciones y tras la incubación, se centrifugó la placa a 4000 RPM por 10 minutos. Se retiró el sobrenadante de cada pocillo con una punta de 200 μ L conectada a un aspirador. Se añadió 100 μ L de DMSO, y la placa se agitó durante 5 minutos. Finalmente, se homogeneizó cada pocillo y se midió las absorbancias ($A_{570-630}$) utilizando el lector de placas BioTek ELx808.

RESULTADOS

Se evaluó la actividad leishmanicida y citotóxica de una serie de compuestos derivados de PIR (PIR 02, PIR 09, PIR 10, PIR 11, PIR 12, PIR 14, PIR 16, PIR 19 y PIR 22) a 48 horas mediante ensayos de viabilidad celular utilizando promastigotes de *Leishmania mexicana* y macrófagos murinos RAW 264.7. Los ensayos se realizaron para determinar la concentración inhibitoria media (IC₅₀) y la concentración citotóxica media (CC₅₀), así como el índice de selectividad (SI), con el fin de evaluar la efectividad y especificidad de cada compuesto.

Entre los compuestos evaluados, como se observa en la **Tabla 1**. PIR 12 mostró la mayor actividad leishmanicida con un IC₅₀ de 19,03 µg/mL (IC_{95%}: 13,44-32,08 µg/mL) y una CC₅₀ de 20,70 µg/mL (IC_{95%}: 13,44-32,08 µg/mL), lo que resultó en un SI de 1,09. Por otro lado, otros compuestos como PIR 02 y PIR 10 también mostraron actividad moderada con IC₅₀ de 40,23 µg/mL (IC_{95%}: 17,51-53,06 µg/mL) y 35,58 µg/mL (IC_{95%}: 17,15-45,32 µg/mL), respectivamente. Sin embargo, sus índices de selectividad fueron inferiores a 1 (0,76 y 0,78, respectivamente), lo que evidencia una actividad citotóxica significativa en células hospedadoras y una baja especificidad hacia los parásitos. En el caso de PIR 09, se observó un IC₅₀ más alto (80,72 µg/mL; IC_{95%}: 48,66-83,09 µg/mL) y un CC₅₀ de 63,38 µg/mL (IC_{95%}: 48,66-83,09 µg/mL), resultando en un SI de 0,79, lo que refuerza su limitada utilidad en términos de selectividad, como se observa en la **Figura 1**. Algunos compuestos, como PIR 14 y PIR 16, no mostraron actividad detectable dentro de los rangos probados (>100 µg/mL), indicando una baja o nula efectividad leishmanicida bajo las condiciones experimentales.

En la exposición a 72 horas, a partir de la **Tabla 2**. se observó que PIR 02 presentó una reducción significativa en su IC₅₀, pasando de 40,23 µg/mL a 6,11 µg/mL (IC_{95%}: 0,02-168,11 µg/mL), con un incremento en su CC₅₀ a 48,12 µg/mL (IC_{95%}: 8,55-65,95 µg/mL), lo que

resultó en un SI de 7,87. Esto sugiere que el compuesto presenta una mayor selectividad hacia los parásitos con una menor exposición citotóxica a 72 horas.

Por su parte, también se vió en la **Tabla 2.** que PIR 09 mostró una mejora importante en su IC₅₀ a 6,96 µg/mL (IC95%: 0,33-56,75 µg/mL), aunque no se pudo determinar su CC₅₀ por la ausencia de toxicidad detectable (CC₅₀ > 100,00 µg/mL). Este comportamiento indica una excelente actividad leishmanicida y baja citotoxicidad, sugiriendo un potencial significativo para futuros estudios. PIR 10 y PIR 11 también mostraron mejoras sustanciales, con IC₅₀ de 13,21 µg/mL (IC95%: 0,33-183,00 µg/mL) y 12,24 µg/mL (IC95%: 0,21-213,20 µg/mL), respectivamente. Los valores de CC₅₀ también aumentaron (78,36 µg/mL y 59,83 µg/mL, respectivamente), resultando en índices de selectividad de 5,93 para PIR 10 y 4,89 para PIR 11. Estos datos se visualizan en la **Figura 2.** y confirman que ambos compuestos mejoran su especificidad y reducen su toxicidad con el tiempo de exposición prolongado.

En cuanto a PIR 19, a partir de la **Tabla 2.** se destacó con un IC₅₀ de 8,46 µg/mL (IC95%: 25,64-337,93 µg/mL) y una CC₅₀ de 81,91 µg/mL (IC95%: 14,61-117,07 µg/mL), lo que resultó en un SI de 9,68, posicionándose como uno de los compuestos más prometedores en términos de actividad y selectividad. Mientras que PIR 22 mostró un comportamiento más moderado, con un IC₅₀ de 23,30 µg/mL (IC95%: 13,98-180,66 µg/mL) y un CC₅₀ de 107,50 µg/mL (IC95%: 6,58-96,04 µg/mL), lo que resultó en un SI de 4,61. PIR 14 y PIR 16 demostraron una mejora notable a 72 horas, mostrando una reducción en sus IC₅₀ a 12,05 µg/mL (IC95%: 251,50-150,17 µg/mL) y 13,05 µg/mL (IC95%: 193,07-283,51 µg/mL), respectivamente. Al mismo tiempo, se observó en la **Figura 2.** una disminución en su citotoxicidad, con valores de CC₅₀ >100 µg/mL en ambos casos.

DISCUSIÓN

En este estudio, se evaluó la actividad leishmanicida y citotóxica de los compuestos PIR contra *Leishmania mexicana*, un modelo relevante en la investigación de nuevos tratamientos para la leishmaniasis. El objetivo fue determinar la eficacia de los compuestos PIR en la inhibición del crecimiento parasitario, así como su toxicidad sobre las células hospedadoras. Para ello, se calcularon parámetros como el IC₅₀ (Concentración Inhibitoria 50%), el CC₅₀ (Concentración Citotóxica 50%) y el índice de selectividad (SI).

El IC₅₀ es el valor de la concentración de un compuesto que inhibe el 50% de la viabilidad de las células o el parásito. Este parámetro es crucial para evaluar la eficacia de un compuesto en su capacidad de reducir el crecimiento parasitario. Por otro lado, el CC₅₀ se refiere a la concentración de un compuesto que causa la muerte de las células hospedadoras en un 50%, lo que permite medir la toxicidad de los compuestos en las células no infectadas. El índice de selectividad (SI) es una relación que se calcula dividiendo el CC₅₀ entre el IC₅₀ ($SI = CC_{50}/IC_{50}$) (Reis et al., 2021). Un valor de SI superior a 10 indica una alta selectividad del compuesto para el parásito y una baja toxicidad para las células hospedadoras. El EC₅₀, que mide la concentración de un compuesto que reduce la carga parasitaria en un 50%, es otro parámetro relevante que se podría evaluar en investigaciones futuras para obtener un perfil más completo de la eficacia de los compuestos (Koutsoni, Karampetsou & Dotsika, 2019; Badirzadeh et al., 2020).

Los compuestos PIR evaluados mostraron diversas respuestas frente a *Leishmania mexicana* y las células RAW 264.7. Entre los compuestos probados, PIR 12 destacó como el más prometedor, mostrando un IC₅₀ de 19.03 μ M y un CC₅₀ de 20.70 μ M, lo que resultó en un índice de selectividad (SI) de 1.09. Aunque este SI es superior a los de otros compuestos evaluados, no alcanzó el valor mínimo ideal de 10, lo que sugiere que la selectividad para el

parásito no es lo suficientemente alta para ser considerado un candidato adecuado para el desarrollo de terapias. Otros compuestos como PIR 02, PIR 10 y PIR 09 mostraron un IC_{50} más alto, indicando menor eficacia en la inhibición del crecimiento parasitario. En el caso de PIR 09, el IC_{50} fue de $80.72 \mu M$, con un SI de 0.79, lo que implica una mayor toxicidad para las células hospedadoras. Además, compuestos como PIR 14 y PIR 16, con valores de IC_{50} superiores a $100 \mu M$, no demostraron una actividad leishmanicida significativa (Croft & Coombs, 2003; Wilkinson & Kelly, 2009).

Es importante remarcar el aumento de la actividad leishmanicida observada con la exposición prolongada. Al aumentar el tiempo de exposición a 72 horas, varios compuestos mostraron una disminución considerable en sus valores de IC_{50} . Este comportamiento fue particularmente evidente en PIR 02, PIR 09 y PIR 19, que tuvieron una reducción en el IC_{50} a 72 horas, lo que podría estar relacionado con una mayor afinidad de los compuestos por los parásitos o una mayor capacidad de internalización en los parásitos en comparación con las células hospedadoras. Este hallazgo sugiere que algunos compuestos, aunque no sean tan efectivos a corto plazo, pueden volverse más eficaces con exposiciones más largas. Este comportamiento podría deberse a una acumulación selectiva de los compuestos en los parásitos, lo que hace que sean más efectivos con el tiempo (Lemke, Kiderlen & Kayser, 2005; Veiga-Santos, Salomão & De Castro, 2012)

Por otro lado, algunos compuestos que inicialmente no mostraron una actividad significativa a las 48 horas, como PIR 14 y PIR 16, exhibieron una mejora en su actividad a las 72 horas. Este cambio podría indicar que estos compuestos actúan de manera más gradual y que, por lo tanto, un tiempo de exposición más largo podría ser necesario para observar su plena eficacia. Esta observación resalta la importancia de considerar el tiempo de exposición como un factor crucial en la evaluación de la actividad leishmanicida de los compuestos (Mutiso et al., 2011; Tomiotto-Pellissier et al., 2018).

En cuanto a los valores de CC_{50} , los compuestos con baja selectividad, como PIR 02 y PIR 10, presentaron un riesgo elevado de toxicidad hacia las células hospedadoras, lo que limita su potencial como tratamientos terapéuticos para la leishmaniasis. Aunque algunos compuestos demostraron una actividad leishmanicida aceptable, su alta toxicidad para las células RAW 264.7 indica que la optimización de la estructura química es un paso fundamental para reducir la toxicidad y mejorar la selectividad hacia el parásito. En particular, la modificación de la estructura química de los compuestos PIR podría ser una estrategia clave para mejorar la relación entre la actividad leishmanicida y la toxicidad hacia las células hospedadoras, logrando una mayor eficacia terapéutica con menor riesgo de efectos adversos (Donlin & Meyers, 2022; Lorenzo Romero, 2022).

Aunque los resultados obtenidos en el proyecto son prometedores, se deben realizar investigaciones adicionales para evaluar el mecanismo de acción de los compuestos derivados de pirazolonas. Los datos preliminares sugieren que la actividad leishmanicida podría estar relacionada con la inducción de estrés oxidativo en los parásitos, lo que puede llevar a la alteración de la membrana celular y a la muerte del parásito. Sin embargo, se requieren estudios adicionales para confirmar este mecanismo, que podría implicar la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y su efecto sobre la integridad celular de *Leishmania mexicana* (Reverte, Snäkä & Fasel, 2022). Además, la identificación de las dianas moleculares de los compuestos sería un paso crucial para comprender su modo de acción y para optimizar su eficacia. De igual manera, se destaca la importancia de la determinación del EC_{50} en investigaciones futuras. Aunque este parámetro no fue evaluado en el presente estudio, es esencial para obtener una mejor comprensión de la eficacia terapéutica de los compuestos PIR en modelos más fisiológicos. La determinación del EC_{50} permitirá obtener datos más completos sobre la eficacia de los compuestos en condiciones más cercanas a la infección real (Coelho et

al., 2014). Esta información será clave para decidir si los compuestos PIR tienen el potencial de convertirse en tratamientos viables para la leishmaniasis.

CONCLUSIONES

Los resultados demostraron que los compuestos derivados de pirazolonas tienen un potencial significativo al evaluar su citotoxicidad y actividad leishmanicida en *Leishmania mexicana* y macrófagos murinos RAW 264.7. Los compuestos PIR 02, PIR 09 y PIR 12 fueron identificados como los más prometedores debido a su actividad leishmanicida, aunque con variaciones en selectividad y citotoxicidad. PIR 12 destacó inicialmente con un IC_{50} de 19,03 $\mu\text{g/mL}$ y un índice de selectividad (SI) de 1,09, lo que muestra un balance entre eficacia y toxicidad. PIR 02 y PIR 09, por su parte, mostraron mejoras a las 72 horas, reduciendo sus valores de IC_{50} y aumentando la selectividad hacia los parásitos, lo que minimizó la toxicidad en las células hospedadoras. Algunos compuestos, como PIR 14 y PIR 16, no presentaron actividad leishmanicida significativa hasta las 72 horas, lo que sugiere que su mecanismo de acción puede requerir un mayor tiempo para ser efectivo. Esto puede implicar que estos compuestos necesitan una interacción más prolongada con las células del parásito o que su acción es más lenta, lo cual requeriría mayores concentraciones o condiciones específicas para generar un mayor efecto en menos tiempo. Además, la exposición a 72 horas mejoró la eficacia de varios compuestos, como PIR 02, PIR 09, PIR 10 y PIR 11, aumentando sus índices de selectividad y reduciendo la toxicidad en las células hospedadoras. Finalmente, los derivados de pirazolonas muestran un potencial prometedor como alternativas terapéuticas para la leishmaniasis, debido a su eficacia leishmanicida y la seguridad que presentan en células del huésped. Sin embargo, es necesario realizar estudios adicionales que incluyan la optimización de dosis, modificaciones estructurales y un análisis más profundo de los mecanismos de acción, con el fin de maximizar su especificidad y reducir los efectos adversos en futuros ensayos preclínicos.

TABLAS

Tabla 1. Bioactividad encontrada a las 48 horas

Compuesto	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ 95% CI (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ 95% CI (µg/ml)	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
PIR 02	40,23	17,51 a 53,06	30,44	17,51 a 53,06	0,76
PIR 09	80,72	48,66 a 83,09	63,38	48,66 a 83,09	0,79
PIR 10	35,58	17,15 a 45,32	27,82	17,15 a 45,32	0,78
PIR 11	43,75	10,13 a 26,63	16,21	10,13 a 26,63	0,37
PIR 12	19,03	13,44 a 32,08	20,70	13,44 a 32,08	1,09
PIR 14	> 100.00	ND	ND	ND	ND
PIR 16	> 100.00	ND	ND	ND	ND
PIR 19	40,21	14,15 a 40,19	23,85	14,15 a 40,19	0,59
PIR 22	24,23	14,52 a 39,90	23,98	14,52 a 39,90	0,99

Descripción: La tabla presenta los valores de IC₅₀, CC₅₀, y los intervalos de confianza (95% CI) para diversos derivados de pirazolonas a las 48 horas de exposición. Compuestos como PIR 12 y PIR 22 destacan por su actividad leishmanicida con índices de selectividad (SI) cercanos o superiores a 1, mientras que PIR 14 y PIR 16 no mostraron actividad significativa en este tiempo.

Tabla 2. Bioactividad encontrada a las 72 horas

Compuesto	IC ₅₀ (µg/ml)	IC ₅₀ 95% CI (µg/ml)	CC ₅₀ (µg/ml)	CC ₅₀ 95% CI (µg/ml)	SI (CC ₅₀ /IC ₅₀)
PIR 02	6,11	0,02 a 168,1	48,12	8,55 a 65,95	7,87
PIR 09	6,96	0,33 a 56,75	> 100.00	> 100.00	ND
PIR 10	13,21	0,33 a 183,00	78,36	8,79 a 76,52	5,93
PIR 11	12,24	0,21 a 213,20	59,83	5,22 a 60,61	4,89
PIR 12	13,13	1,23 a 177,35	47,08	0,94 a 37,20	3,59
PIR 14	12,0465	251,5 a 150,2	54,605	0,0003 a 39,5	4,53
PIR 16	13,045	193,1 a 283,5	> 100.00	> 100.00	ND
PIR 19	8,46	25,6 a 337,9	81,91	14,6 a 117,1	9,68
PIR 22	23,30	13,98 a 180,7	107,50	6,58 a 96,04	4,61

Descripción: La tabla muestra los resultados de IC50, CC50 y SI para los compuestos evaluados a las 72 horas. Se observa un aumento en la actividad y selectividad en comparación con las 48 horas, destacando PIR 19 y PIR 02 con los valores de SI más altos, mientras que PIR 09 y PIR 16 exhiben mejoras notables en sus parámetros.

FIGURAS

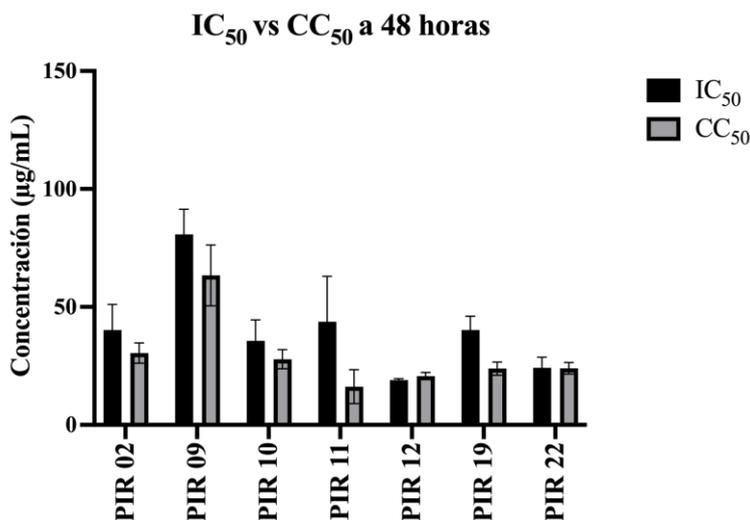


Figura 1. Comparación del IC₅₀ vs CC₅₀ evaluado a 48 horas

Descripción: La figura muestra los valores de IC₅₀ y CC₅₀ tras 48 horas de tratamiento. El IC₅₀ es notablemente mayor que el CC₅₀ para 5 compuestos (02, 09, 10, 11, 19 y 22), lo que indica que la actividad inhibitoria para *Leishmania mexicana* es mayor que la citotoxicidad en las RAW 264.7. El compuesto 22 posee una concentración inhibitoria similar a la citotóxica. El compuesto con mejor selectividad se observa en el 12, cuya concentración inhibitoria es menor que la citotóxica.

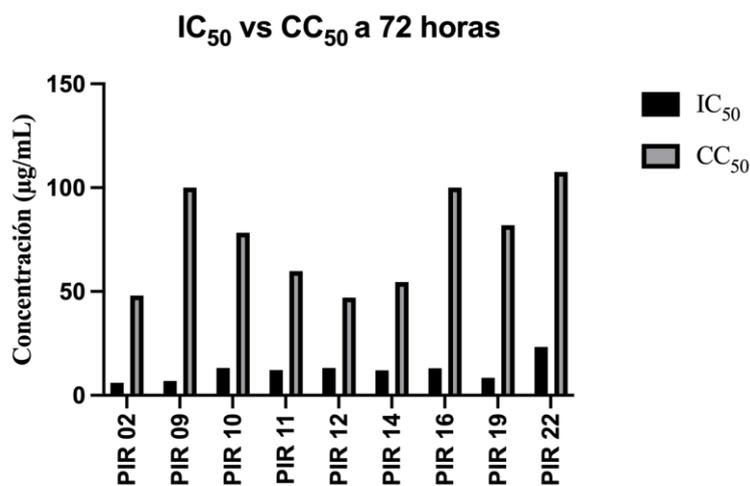


Figura 2. Comparación del IC₅₀ vs CC₅₀ evaluado a 72 horas

Descripción: En esta figura se comparan los valores de IC₅₀ y CC₅₀ después de 72 horas de exposición. Los valores de IC₅₀ tienden a disminuir respecto a las 48 horas, indicando mayor eficacia inhibidora. El CC₅₀ es elevado, mostrando baja citotoxicidad incluso con un tiempo de tratamiento prolongado.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Angarita Rueda, F. A. (2016). *Estudio de la síntesis de cloroformilazoles como precursores para la obtención de nuevos azoles con potencial antifúngico* (Trabajo de grado, Universidad de los Andes). Universidad de los Andes.
<https://repositorio.uniandes.edu.co/server/api/core/bitstreams/a8970616-4e86-4359-b3e9-40ee0d83249a/content>
- Araújo, J. S. (2020). *Estudo de compostos bioativos como potenciais agentes terapêuticos para Leishmaniose* (Tesis doctoral, Repositorio Fundação Oswaldo Cruz). Fundação Oswaldo Cruz. <https://www.arca.fiocruz.br/handle/icict/43249>
- Badirzadeh, A., Heidari-Kharaji, M., Fallah-Omrani, V., Dabiri, H., Araghi, A., & Salimi Chirani, A. (2020). Antileishmanial activity of *Urtica dioica* extract against zoonotic cutaneous leishmaniasis. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, *14*(1), e0007843.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0007843>
- Benaim, G., & Paniz-Mondolfi, A. (2024). Unmasking the Mechanism behind Miltefosine: Revealing the Disruption of Intracellular Ca²⁺ Homeostasis as a Rational Therapeutic Target in Leishmaniasis and Chagas Disease. *Biomolecules*, *14*(4), 406.
<https://doi.org/10.3390/biom14040406>
- Coelho, A. C., Trinconi, C. T., Costa, C. H., & Uliana, S. R. (2014). In vitro and in vivo miltefosine susceptibility of a *Leishmania amazonensis* isolate from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis. *PLoS neglected tropical diseases*, *8*(7), e2999.
<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002999>
- Croft, S. L., & Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends in parasitology*, *19*(11), 502-508.
<https://doi.org/10.1016/j.pt.2003.09.008>

- Donlin, M. J., & Meyers, M. J. (2022). Repurposing and optimization of drugs for discovery of novel antifungals. *Drug discovery today*, 27(7), 2008-2014.
<https://doi.org/10.1016/j.drudis.2022.04.021>
- Ferreira, B. A., Coser, E. M., Saborito, C., Yamashiro-Kanashiro, E. H., Lindoso, J. A. L., & Coelho, A. C. (2023). In vitro miltefosine and amphotericin B susceptibility of strains and clinical isolates of *Leishmania* species endemic in Brazil that cause tegumentary leishmaniasis. *Experimental parasitology*, 246, 108462.
<https://doi.org/10.1016/j.exppara.2023.108462>
- Hashiguchi, Y., Gomez, E. A., Velez, L. N., Villegas, N. V., Kubo, M., Mimori, T., Hashiguchi, K., & Kato, H. (2020). Anthropophilic phlebotomine sand fly *Lutzomyia* species and search for the natural *Leishmania* infections in an area endemic for cutaneous leishmaniasis in Ecuador. *Acta tropica*, 203, 105287.
<https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2019.105287>
- Koutsoni, O. S., Karampetsou, K., & Dotsika, E. (2019). In vitro screening of antileishmanial activity of natural product compounds: Determination of IC50, CC50 and SI values. *Bio-protocol*, 9(21), e3410-e3410. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.3410>
- Lemke, A., Kiderlen, A. F., & Kayser, O. (2005). Amphotericin B. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(2), 151–162. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-1955-9>
- Licto Iler, S. L. (2016). *Evaluación de la actividad leishmanicida y citotóxica de 4, 4'-(arilmetileno)-bis-(1-fenil-3-metil-1H-pirazol-5-oles) frente a leishmania mexicana* (Tesis de Grado, Repositorio UDLA). Universidad de las Américas.
<https://dspace.udla.edu.ec/handle/33000/6438>
- Lorenzo Romero, R. (2022). *Diseño de nuevos agentes terapéuticos frente a Leishmania spp: síntesis de análogos de withanolidas de origen natural*. (Trabajo de grado). Universidad de La Laguna.

<https://riull.ull.es/xmlui/bitstream/handle/915/28447/Diseno%20de%20nuevos%20agentes%20terapeuticos%20frente%20a%20Leishmania%20spp%20Sintesis%20de%20analogos%20de%20withanolidas%20de%20origen%20natural.pdf>

Mesquita, J. T., Tempone, A. G., & Reimão, J. Q. (2014). Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania (Leishmania) infantum* intracellular amastigotes. *Acta tropica*, *130*, 112-116. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.003>

Ministerio de Salud Pública del Ecuador. (2024). *Enfermedades transmitidas por vectores: Semana epidemiológica 49*. <https://www.salud.gob.ec/wp-content/uploads/2024/12/Enfermedades-Transmitidas-por-Vectores-SE-49.pdf>

Mutiso, J. M., Macharia, J. C., Barasa, M., Taracha, E., Bourdichon, A. J., & Gicheru, M. M. (2011). In vitro and in vivo antileishmanial efficacy of a combination therapy of diminazene and artesunate against *Leishmania donovani* in BALB/c mice. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, *53*, 129-132. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652011000300003>

Reis, T. A. R., Oliveira-da-Silva, J. A., Tavares, G. S. V., Mendonça, D. V. C., Freitas, C. S., Costa, R. R., Lage, D. P., Martins, V. T., Machado, A. S., Ramos, F. F., Silva, A. M., Ludolf, F., Antinarelli, L. M. R., Brito, R. C. F., Chávez-Fumagalli, M. A., Humbert, M. V., Roatt, B. M., Coimbra, E. S., & Coelho, E. A. F. (2021). Ivermectin presents effective and selective antileishmanial activity in vitro and in vivo against *Leishmania infantum* and is therapeutic against visceral leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, *221*, 108059. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2020.108059>

Reverte, M., Snäkä, T., & Fasel, N. (2022). The dangerous liaisons in the oxidative stress response to leishmania infection. *Pathogens*, *11*(4), 409. <https://doi.org/10.3390/pathogens11040409>

- Rodrigues, R. R. L., Nunes, T. A. L., de Araujo, A. R., Marinho Filho, J. D. B., da Silva, M. V., de Amorim Carvalho, F. A. A., Pessoa, O. D. L., Freitas, H. P. S., Rodrigues, K. A. F., & Araújo, A. J. (2021). Antileishmanial activity of cordiaquinone E towards *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *International Immunopharmacology*, *90*, 107124. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2020.107124>
- Tomiotto-Pellissier, F., Alves, D. R., Miranda-Sapla, M. M., de Moraes, S. M., Assolini, J. P., da Silva Bortoleti, B. T., Gonçalves, M. D., Depieri Cataneo, A. H., Kian, D., Bervelier Madeira, T., Megumi Yamauchi, L., Nixdorf, S. L., Costa, I. N., Conchon-Costa, I. & Pavanelli, W. R. (2018). Caryocar coriaceum extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion: Leishmanicidal effect of Caryocar coriaceum leaf extracts. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, *98*, 662-672. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2017.12.083>
- Vásquez de Ricciardi, L. (2009). Terapêutica antileishmania: revisando el pasado, el presente y el futuro. *Gaceta Médica de Caracas*, *117*(2), 93-111. https://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0367-47622009000200002
- Veiga-Santos, P., Salomão, K., & De Castro, S. L. (2012). Insights into the mode of action of trypanocidal drugs. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, *84*(2), 377–393. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652012005000042>
- Wilkinson, S. R., & Kelly, J. M. (2009). Trypanocidal drugs: mechanisms, resistance and new targets. *Expert Reviews in Molecular Medicine*, *11*, e31. <https://doi.org/10.1017/S146239940900121X>