



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

III. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2019ko maiatzaren 27, 28 eta 29
Baiona, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

OSASUN ZIENTZIAK

***Selenozianato eta Diseleniuroak:
Leishmaniaren aurkako sendagai
eraginkor berriak***

*Mikel Etxebeste-Mitxelorena, Daniel
Plano, Esther Moreno, Antonio
Jiménez-Ruiz, Espuelas Socorro eta
Carmen Sanmartín*

24-30 or.
<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iii.04.03>



Selenozianato eta Diseleniuroak: Leishmaniaren aurkako sendagai eraginkor berriak

Etxebeste-Mitxelorena, Mikel^{1,3}; Plano, Daniel¹; Moreno, Esther^{1,3}; Jiménez-Ruiz, Antonio²; Socorro, Espuelas^{1,3} eta Sanmartín, Carmen^{1,3}

¹Nafarroako Unibertsitatea, Teknologia eta Kimika Farmazeutikoak Saila

²Alcala de Henareseko Unibertsitatea, Biokimika eta Biologia Molekularra Saila

³Nafarroako Unibertsitatea, ISTUN

metxebeste@alumni.unav.es

Laburpena

Lan honetan, selenozianato edo diseleniuro nukleoa barnean duten, 35 molekula berriren sintesia azaltzen da. Molekula hauek *Leishmania infantum* promastigote eta amastigote axenikoetan *in vitro* frogatu dira euren eraginkortasuna ezagutzeko. Bestalde, THP-1 zelula linean ere testatu dira, selektibotasun indize bat ezartzearen. Lortutako datuak (IC_{50}), erreferentziatzat erabiltzen diren farmakoen (edelfosina eta miltefosina) datuekin parekatu dira. Frogatutako hainbat molekulek erreferentziazko farmakoak baino IC_{50} hobe dute, selektibitate antzeko edota hobearekin. Hauek, makrofago infektatuen gain frogatu dira eta konposatu “liderraren” (2a) eragina kontrastezko mikroskopikopean behatu da.

Hitz gakoak: Leishmaniasia, selenioa, eraginkortasuna, selektibitatea

Abstract

In the presented work, 35 new molecules selenocyanate or diselenide moieties have been synthesized. The new compounds have been evaluated in vitro for their cytotoxicity activity against Leishmania infantum promastigotes and axenic amastigotes. In order to establish their selectivity indexes (SI) the cytotoxic effect of each compound was also assayed in THP-1 cell line. Some of the compounds presented a better activity (IC_{50}) than the reference drugs Edelfosine or Miltefosine, and similar or better SI. These compounds have also been tested against infected macrophages and the leader (2a) compound activity has been checked under contrast microscopy.

Keywords: Leishmaniasis, selenium, activity, selectivity

1. Sarrera eta motibazioa

Leishmaniasia, munduko osasun erakundeak klasifikatutako 17 ahaztutako gaixotasun tropikaletako bat, *Leishmania* generoko parasito protozario ezberdinek eragiten dute. Mundu mailako osasun arazo larri bat da, bereziki baliabide urri eta pobrezia handiko herrialdeetan. 88 herrialdeetan endemikoa da 12 milioi pertsona kalteturik. Urtero bi milioi kasu berri estimatzen ditu MOEak.(1,5,15)

Trypanosomatidae familiako *Leishmania* generoko espezie infektibo ezberdinen baitako kutsatzean, gaixotasunean hiru forma kliniko bereizten dira: Biszerala, larruazalekoa edo muko-kutaneoak. Guztira, 21 espezie ezberdinez kutsa daiteke gizakia, 30 flebotomoren ziztadaren eraginez. (4,6,8,25)

Gaixotasuna kontrolpean edukitzeko modua bektorearen eta gaixoen kudeaketan datza, transmisioa murriztearen, edota gaixoen tratamenduan, ez baitago eraginkorra den txertorik. Hala ere, gaur egun existitzen diren tratamendu edo sendagailak (Antimonio pentabalenteak, miltefosina, edelfosina, B anfoterizina, paramomizina, etab.) ondorio kaltegarri ugari sortzen dituzte. Hain zuzen ere arrazoi hauengatik, administratzeko errazak diren eta ondorio kaltegarri gutxi sortzen dituzte sendagai eraginkor berriak sortzea behar beharrezkoa izan beharko litzateke. (2,7,10,18,24)

Gure lan taldean sintetizatutako hainbat seleniodun konposaturen ahalmen antitumoralak ikusita, pentsatzekoa da droga hauek eraginkorrak izan daitezkeela, Leishmanisiaren aurka, gaur egun erabiltzen diren hainbat sendagai (Miltefosina, Edelfosina) minbiziaren tratamenduan erabiltzen baitziren. Taldean, aurrez sintetizatutako hainbat seleniodun molekulak aktibitate leishmanizida aurkeztu zuten. (9,11,12,13,17,19,21,22,23,26)

Bestalde, organoseleno konposatu ezberdinak parasitemiaren murrizketa suertatzen dutela demostratua da. Are gehiago, arratoietan manifestazio klinikoak eta heriotza-tasa murrizten dute. Beraz, selenioaren erabilera estrategi berri eta eraginkora izan liteke gaixotasun honen tratamenduan. Jakina da gainera, tripanosomatidoek, ugaztunek ez bezala, estres oxidatiboari aurre egiteko mekanismo ezberdina daukatela, zeinetan hainbat selenoproteina propiok hartzen duten parte, hala nola, Sel-Tryp izenekoa. (16)

2. Ikerketaren helburuak

Alor honetako ikerkuntzaren egoera ikusita, ondorengo helburuak proposatu dira proiektu honetan:

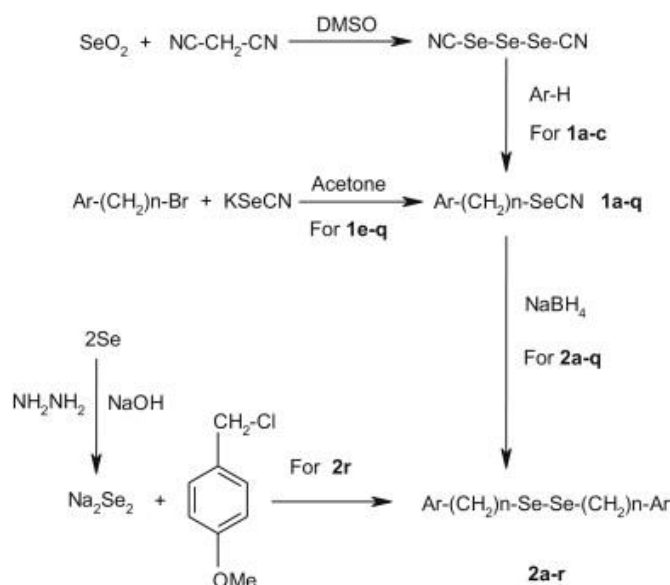
- 35 seleniodun molekula berriren sintesia.
- Kimika organikoan ohikoak diren teknikak erabiliz (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C, analisi elementala, masa espektrometria eta fusio puntua) konposatu berriak karakterizatzea.
- Leishmania infantum promastigote eta amastigote axenikoetan konposatu berrien eraginkortasuna behatzea eta selektibotasun indize bat lortzea THP-1 zeluletan duten eraginkortasunarekin alderatuta.
- Konposatu eraginkor eta selektiboenak, makrofago infektatuetan duten eragina frogatu.
- Konposatu liderraren eragina mikroskopikoki ikusi.

3. Ikerketaren muina eta ondorioak

1) Kimika

1. Irudian irudikatua dagoen moduan, selenozianato eta diseleniuroak sintetizatze bidea single eta pauso gutxikoa da. Amaierako produktuen sintesia, aurrez sintetizatutako aminen eta haloarenoen arteko erreakzioaren bidez burutzen da.

1. irudia. I. serieko konposatuak



Selenozianato deribatuak ezberdinak bi modu ezberdinez lortu dira. 1a-c molekulak sintetizatzeke, malononitriloa eta selenio dioxidoak eratutako triseleniuroaren gainean aminoaril ezberdinak gehitzen dira. Erreakzioa DMSO disolbatzailean burutzen da, 25 graduan, 24 orduz irabiatuz. Beste konposatuak (1e-q) lortzeko, dagozkion haloareno ezberdinak potasio selenozianatoarekin erreakinatuz lortu dira. Aldiz, 2a-q konposatuen erapena, dagozkien 1 serieko analogoen erredukzioaren bidez burutu da, borohidruro sodikoaren laguntzaz.

2) Biologia

L. infantum amastigote axenikoak, 10% FCS, 1g/L β -alanina, 100mg/L *L*-asparagina, 200 mg/L sakarosa, 50mg/L sodio pirubato, 320 mg/L azido maleiko, 40mg/L azido fumariko, 70mg/L azido sukziniko, 200mg/L azido zetoglutariko, 300mg/L azido zitriko, 1.1 g/L bikarbonato sodiko, 5g/L MES, 0.4 mg/L hemina, 10mg/L gentamizina osatutako M199 (Invitrogen, Leiden, The Netherlands) ingurunean hazi ziren 5.4 pHan, 37 °Ctan. THP-1 zelulak, Dr. Michele hornituta, 10% FCS, 1nM HEPES antibiotiko, 2nM glutamina eta 1nM sodio pirubatoaz osatutako ingurunean hazi ziren, 7.2ko pHan, 37°Ctan eta %5eko CO₂ atmosferan.

Lehenik eta behin, konposatuen eragina promastigoteen gain frogatu zen, 25 μ M-eko kontzentrazioan. Parasitoen hazkundearen % 50 eragozteko lortu zutenak, hurrengo faserako aukeratuak izan ziren. Hogei konposatu hauekin amastigote axenikoetan egindako tratamendua, parasitoen hazkunde fase logaritmikoan zehar egin zen, 10⁶ parasito/ml-ko kontzentrazioan 37°Ctan, 24 orduz. THP-1 monozito zelulen tratamendua berriz, hauen hazkunde fase logaritmikoan egin zen 4x10⁵ zelula/ml-ko kontzentrazioan, 37°Ctan, %5-eko CO₂ atmosferan, 24 orduz. 0.08, 0.4, 2.0, 10.0 eta 50.0 μ M kontzentrazioak bahetu ziren.

Bizirik geratutako zelulen portzentajea propidio ioduroaren (PI) eskusio metodoaz neurtu zen, fluxu zitometriaren bidez. Zelulen ebaluaketa mikroskopikorako parasitoen zuzeneko behaketa burutu zen 96 platertxoko plaketan, kontrastezko mikroskopia edo mikroskopia fluoreszente bidez. (1,3,20)

Esperimentua burutzean jasotako amastigoteetarako eta THP-1 zeluletarako IC₅₀ (zelulen hazkundearen %50a galarazten duen dosia) datuak 1. taulan ikus daitezke.

1.taula. Konposatuen IC₅₀ Promastigote, Amastigote eta THP-1 zeluletan eta SI balorea

Erreferentzia	-Ar-	IC ₅₀ Promastigote $\pm$ errorea (μ M)	IC ₅₀ Amastigote $\pm$ errorea (μ M)	IC ₅₀ THP-1 $\pm$ errorea (μ M)	SI
1a	4-aminofenil	11.2 $\pm$ 1.10	9.29 $\pm$ 1.16	>50	>5
1b	4-(N,N-dimetilamino)-fenil	9.24 $\pm$ 0.33	2.79 $\pm$ 0.17	44.7 $\pm$ 3.4	16
1e	4-Nitrofenil	4.30 $\pm$ 0.74	0.68 $\pm$ 0.08	16.8 $\pm$ 1.8	25
1f	3-Nitrofenil	4.18 $\pm$ 1.06	0.57 $\pm$ 0.08	9.32 $\pm$ 0.1	16
1g	2-Nitrofenil	3.32 $\pm$ 0.16	0.34 $\pm$ 0.19	7.10 $\pm$ 0.2	21
1h	4-Bromofenil	11.6 $\pm$ 0.60	7.95 $\pm$ 1.02	28.9 $\pm$ 3.9	4
1i	4-Trifluorometilfenil	11.3 $\pm$ 0.40	2.14 $\pm$ 1.05	19.8 $\pm$ 2.7	9
1j	4-Metiltiofenil	11.6 $\pm$ 0.70	3.02 $\pm$ 0.59	17.0 $\pm$ 0.2	6
1k	4-Metilfenil	11.8 $\pm$ 0.30	3.33 $\pm$ 0.79	24.0 $\pm$ 2.2	7
1l	4-Zianofenil	4.14 $\pm$ 0.23	0.55 $\pm$ 0.21	7.97 $\pm$ 1.0	15
1m	3-Zianofenil	6.06 $\pm$ 1.70	0.53 $\pm$ 0.11	7.60 $\pm$ 2.0	14
1n	2-Zianofenil	7.75 $\pm$ 0.20	3.16 $\pm$ 0.02	17.1 $\pm$ 1.1	5
1o	Fenil	7.95 $\pm$ 0.34	2.58 $\pm$ 0.21	25.0 $\pm$ 2.9	10
1p	Naftil	11.2 $\pm$ 1.20	3.72 $\pm$ 1.08	16.8 $\pm$ 3.1	5
1q	4-Nitrobenzil	11.9 $\pm$ 0.90	3.80 $\pm$ 0.27	17.2 $\pm$ 2.2	5
2a	4-aminofenil	0.96 $\pm$ 0.07	0.65 $\pm$ 0.02	15.3 $\pm$ 0.8	24
2b	4-(N,N-dimetilamino)	3.18 $\pm$ 0.23	0.77 $\pm$ 0.03	22.1 $\pm$ 1.4	29

-fenil					
2e	4-Nitrofenil	4.04 ± 0.38	0.38 ± 0.03	29.1 ± 2.3	77
2g	2-Nitrofenil	12.5 ± 2.80	0.29 ± 0.10	2.42 ± 0.1	8
2o	Fenil	17.8 ± 1.90	0.63 ± 0.05	32.2 ± 2.5	51
Edelfosina	-	3.65 ± 0.19	0.82 ± 0.13	4.96 ± 0.16	6
Miltefosina	-	15.0 ± 0.80	2.84 ± 0.10	18.5 ± 0.60	7

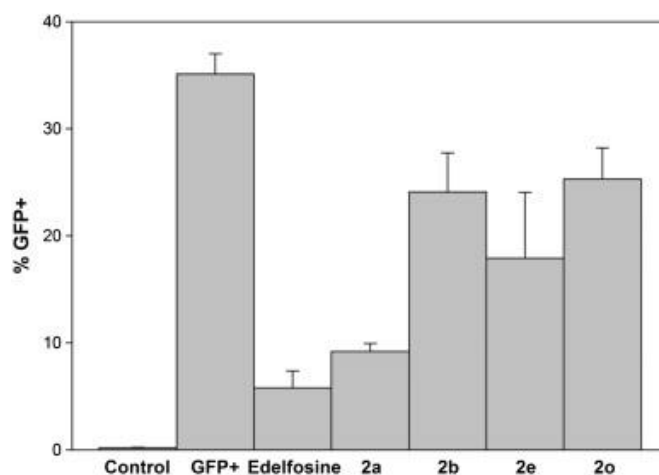
Taulan ikusgai den moduan, sintetizatutako 14 konposatuk 3tik beherako IC₅₀ dute, gaur egun erabiltzen den Miltefosina sendagailaren aktibitatearen ordenan. Selektibotasun indizeak, orokorrean erreferentziatzat hartutako sendagailenak baino hobeak dira 15 kasutan, 10 aldiz handiagoa izaki 2e konposatuarentzat adibidez.

Konkretuki, 13 konposatuk (1a, 1e, 1f, 1g, 1i, 1l, 1m, 1o, 2a, 2b, 2e, 2g eta 2o) Miltefosina baino eraginkortasun handiagoa dute (IC₅₀ = 0.29-2.79 µM) eta horietatik hamarrek (1e, 1f, 1g, 1l, 1m, 2a, 2b, 2e, 2g eta 2o) Edelfosinak baino hobeak (IC₅₀ = 0.29-0.77 µM).

Nahiz eta dauzkagun datuekin ezin den estruktura-eraginkortasun korrelazio on bat egin, bai ikus daiteke, orokorrean, diseleniuroak (2 seriea) eraginkorragoak direla, 1 µM azpiko IC₅₀ baloreak erakutsita. Gainera, 2a, 2b, 2e eta 2o konposatuak dira selektibotasun altuena erakutsi dutenak. Hau dela eta, konposatu hauen eraginkortasuna makrofago infektatuen gain frogatu da.

Honetarako, THP-1 zelula monozitarioak, makrofagoetan transformatu dira PMA-ren eraginez. Ondoren, eratutako makrofago hauek *L. infantum* amastigote fluoreszenteekin (GFP+) infektatu dira. 24 ordu ostean, behin infekzioa garatuta, makrofago infektatu hauek aukeratutako 4 konposatuekin tratatu dira 48 orduz eta zitometroaren bidez, bizirik geratutako parasito fluoreszente kopurua neurtu da. Edelfosina sendagaia kontrol positibotzat hartuta, haren IC₅₀ balioaren dosian hau da 3 µM, erabili dira konposatuak ere.

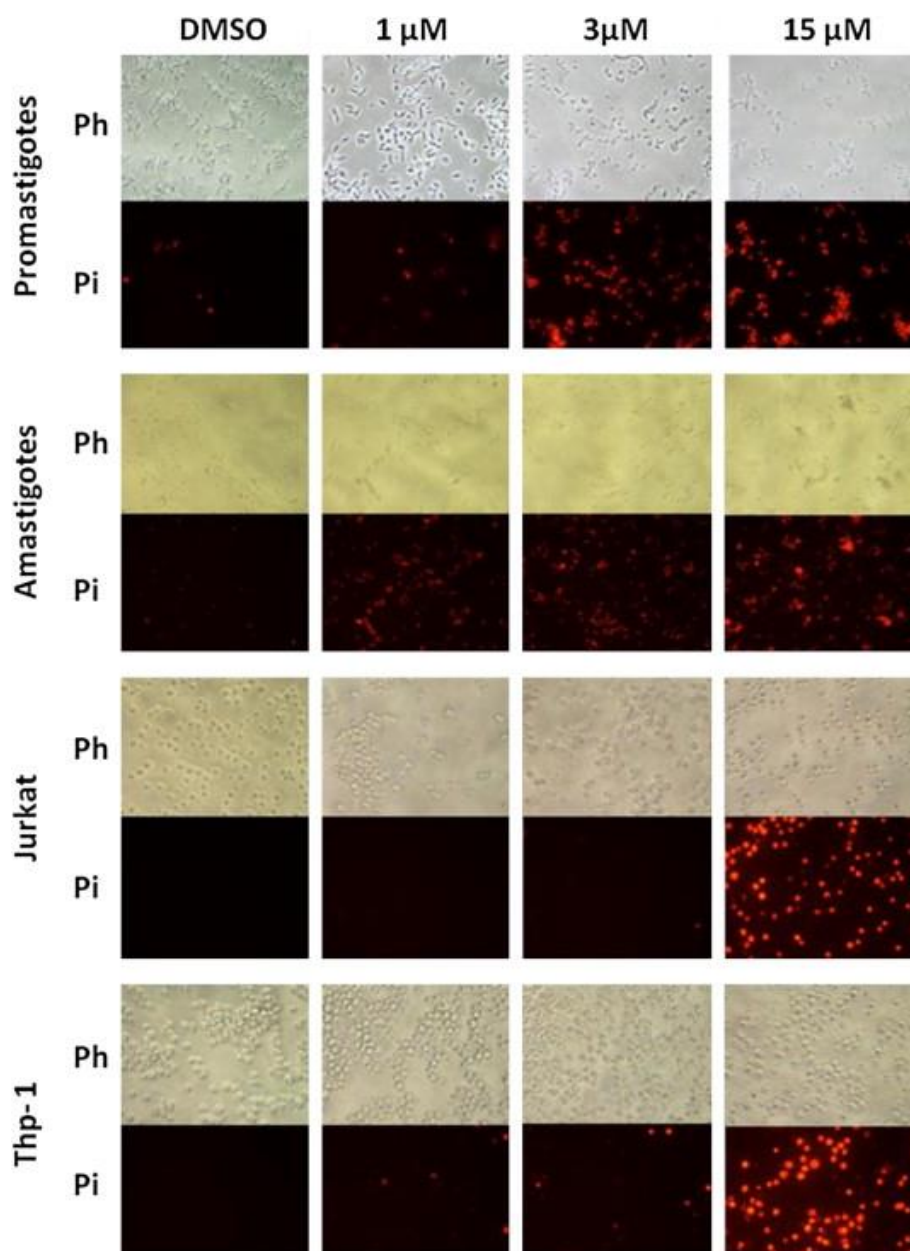
2. irudia. 2a, 2b, 2e eta 2c konposatuen eraginkortasuna GFP+ parasitoen aurka



Taulan ondo ikus daitekeen bezala, 2a konposatuaren tratamenduak 48 orduren ostean, parasitoen % 74 hil egin zuen, egungo sendagailaren pare, baina hare selektiboagoa izaki.

Azkenik, konposatu honen (2a) eraginkortasuna mikroskopikoki ere behatu da. Promastigoteak, amastigoteak, THP-1 zelulak eta Jurkat zelula monozitarioak, konposatu honen 1 µM, 3 µM eta 15 µM dosiekin tratatu dira. Ondoren ioduro propidioa gehitu eta kontrastezko mikroskopioan behatu dira. Bertan erraz ikusi daiteke ez dagoela inongo zitotoxizitaterik 1 eta 3 µM dosietan giza zelulendako. Aldiz, amastigoteen % 100-a hiltzen du 3 µMean.

3. irudia. 2a konposatuaren eraginkortasuna mikroskopikoki behatuta Promastigote, Amastigote, Jurkat eta THP-1 zelulen gain.



4. Etorkizunerako planteatutako norabidea

- Konposatu guztien eraginkortasuna, zepa ezberdinetako promastigote eta amastigoteetan frogatu.
- Konposatu liderrak, eraginkorrek eta selektiboak baldin badira, *in vivo* testatu leishmaniadun arratoietan, bai toxizitatea bai eraginkortasuna.
- Konposatuen nanoformulazioa eraginkortasuna eta selektibitatea hobetzeko.

5. Erreferentziak

1. Alzate JF, Álvarez-Barrientos A, González VM, Jiménez-Ruiz A. (2006) Heat-induced programmed cell death in *Leishmania infantum* is reverted by Bcl-X(L) expression *Apoptosis* 11:161-171.
2. Alzate JF, Arias A, Mollinedo F, Rico E, De la Iglesia-Vicente J, Jimenez-Ruiz A. (2008) Edelfosine induces an apoptotic process in *Leishmania infantum* that is regulated by the ectopic expression of Bcl-XL and Hrk. *Antimicrob Agents Chemother* 52:3779-3782.
3. Alzate JF, Arias A., Moreno-Mateos D, Alvarez-Barrientos A, Jiménez-Ruiz A. (2007) Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *L. infantum*. *Mol. Biochem. Parasitol.* 152:192-202
4. Bates, P.A. (2007). "Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies". *Int J Parasitol* 37(10): 1097-1106.
5. Bern C, Maguire JH, Alvar J. (2008) Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 2:313.
6. Botero, D., Restrepo, M. Colombia (1992). "Parasitosis humanas". *Corporación para Investigaciones Biológicas*. Segunda edición.
7. Cabrera-Serra MG, Valladares B, Piñero JE. (2008) In vivo activity of perfosine against *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop* 108:20-25.
8. David CV, Craft N. (2009) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther* 22:491-502.
9. Fernandez-Rubio C, Campbell D, Vacas A, Ibañez E, Moreno E, Espuelas S, Calvo A, Palop JA, Plano D, Sanmartin C, Nguewa P. (2015) Leishmanicidal activities of novel mmethylseleno-imidocarbamates. *ACC* 59:5705-5713.
10. Frézard F, Demicheli C, Ribeiro RR. (2009) Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. *Molecules* 14:2317-2336.
11. Ibañez E, Agliano A, Prior C, Nguewa P, Redrado M, Gonzalez-Zubeldia I, Plano D, Palop JA, Sanmartin C, Calvo A. (2012) The Quinoline Imidoselenocarbamate EI201 Blocks the AKT/m TOR Pathway and targets cancer stem cells leading to a strong antitumor activity. *Current Medicinal Chemistry* 19:3031-3043.
12. Ibañez E, Plano D, Font M, Calvo A, Prior C, Palop JA, Sanmartin C. (2011) Synthesis and antiproliferative activity of novel symmetrical alkylthio- and alkylseleno-imidocarbamates. *European Journal of Medicinal Chemistry* 46:265-274.
13. Ibañez E, Stoedter M, Hofmann P, Plano D, Calvo A, Nguewa P, Palop JA, Sanmartin C, Schomburg L. (2010) Structure- and cell-specific effects of imidoselenocarbamates on selenoprotein expression and activity in liver cells in culture. *Metallomics* 4:1297-1307.
14. Iriepa I, Villasante FJ, Galvez E, Bellanato J, Martín A, Gomez-Sal P. (2004) Synthesis, spectroscopic and crystallographic study of some carbamates from an azabicyclic chloroformate and primary heterocyclic amines. *New J. Chem.* 28:618-624.
15. Lindoso JA, Lindoso AA. (2009) Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 51:247-253.
16. Lobanov AV, Gromer S, Salinas G, Gladyshev VN. (2006) Selenium metabolism in *Trypanosoma*: characterization of selenoproteomes and identification of Kinetoplastida-specific selenoproteins. *Nucleic Acids Res* 34:4012-4024.
17. Moreno D, Plano D, Baquedano Y, Jimenez-Ruiz A, Palop JA, Sanmartin C. (2010) Antileishmanial activity of imidothiocarbamates and imidoselenocarbamates. *Parasitol Res* 108:233-239.
18. Palumbo E. (2008) Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. *Braz J Infect Dis* 12:2-4.
19. Plano D, Baquedano Y, Ibañez E, Jimenez I, Palop JA, Spallholz J, Sanmartin C. (2010) Antioxidant-prooxidant properties of a New Organoselenium Compound Library. *Molecules* 15:7292-7312.
20. Plano D, Baquedano Y, Moreno-Mateos D, Font M, Jimenez-Ruiz A, Palop JA, Sanmartín C. (2011) Selenocyanates and diselenides: A new class of potent antileishmanial agents. *Eur J Med Chem* 46:3315-3323.
21. Plano D, Ibañez I, Calvo A, Palop JA, Sanmartin C. (2001) Novel library of selenocompounds as Kinase Modulators. *Molecules* 16:6349-6364.

22. Plano D, Sanmartin C, Moreno E, Prior C, Calvo A, Palop JA. (2007) Novel potent organoselenium compounds as cytotoxic agents in prostate cancer cells. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 17:6853-6859.
23. Romano B, Font M, Encío I, Palop JA, Sanmartín C. (2014) Synthesis and antiproliferative activity of novel methylselenocarbamates. *Eur. J. Med. Chem.* 83:674-684.
24. Rosenthal E, Delaunay P, Jeandel PY, Haas H, Pomares-Estran C, Marty P. (2009) Liposomal amphotericin B as treatment for visceral Leishmaniasis in Europe. *Med Mal Infect* 39:741-744.
25. Sharma U, Singh S. (2008) Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45:255-272.
26. Zuazo A, Plano D, Ansó E, Lizarraga E, Font M, Martínez de Irujo J. (2012) Cytotoxic and proapoptotic activities of imidoselenocarbamate derivatives are dependent on the release of methylselenol. *Chem Res Toxicol* 25:2479-2489.