



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

II. IKERGAZTE

NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2017ko maiatzaren 10, 11 eta 12
Iruñea, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

Metilselenokarbamatoen aktibitate antileishmaniala

Mikel Etxebeste

34-38 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.ii.05.05>

ANTOLATZAILEA:



ELKARLANEAN:



LAGUNTZAILEAK:



UDALBILTZA



Metilselenokarbamatoen aktibitate antileishmaniala

Etxebeste-Mitxelorena Mikel^{1,3}, Romano B¹, Jiménez-Ruiz A², Plano D¹, Nguewa P³, Sanmartín, C¹.

¹Nafarroako Unibertsitatea, Kimika Organikoa eta Farmazeutikoa Saila

²Alcala de Henareseko Unibertsitatea, Biokimika eta Biologia Molekularra Saila

³Nafarroako Unibertsitatea, ISTUN

metxebeste@alumni.unav.es

Laburpena

Lan honetan, metilselenola barnean duten, 11 karbamato alifatiko, aromatiko eta heteroaromatikoren sintesia azaltzen da. Molekula hauek *Leishmania infantum* amastigote axenikoetan bahetu dira. Bestalde, THP-1 zelula linean ere testatu dira, selektibotasun indize bat ezartzearen. Lortutako datuak (IC₅₀), erreferentziatza erabiltzen diren farmakoek (edelfosina eta miltefosina) datuekin parekatu dira. Frogatutako hainbat molekulek erreferentziak farmakoak baino IC₅₀ hobea dute, selektibitate antzeko edota hobegoarekin.

Abstract

In this work, 11 aliphatic, aromatic, and heteroaromatic carbamate derivatives containing a metilselenol moiety have been synthesized. The new compounds have been evaluated in vitro for their cytotoxicity activity against Leishmania infantum 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 than the reference drugs Edelfosine or Miltefosine, and similar or better SI.

Sarrera eta motibazioa

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

Leishmaniasiarenean gaixotasunean hiru forma kliniko bereizten dira: Biszerala, larruazalekoa edo mukokutaneoak. Gaixotasun forma hauek Trypanosomatidae familiako *Leishmania* generako espezie infektibo ezberdinen baitan dago. 21 espezie ezberdinez kutsa daiteke gizakia, 30 flebotomoren zitzadaren eraginez. (4,6,8,25)

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

Gure lan taldean sintetizatutako metilselenokarbamato ezberdinen ahalmen antitumoralak ikusita, pentsatzekoa da droga hauek eraginkorrak izan daitezkeela Leishmaniasiarenean aurka, gaur egun erabiltzen diren hainbat sendagai (Miltefosina, Edelfosina) minbiziaren tratamenduan erabiltzen baitziren. Taldean, aurrez sintetizatutako imidoselenokarbamato batzuk ere aktibitate leishmanizida aurkeztu zuten. (9,11,12,13,17,19,21,22,27)

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

Ikerketaren helburuak

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

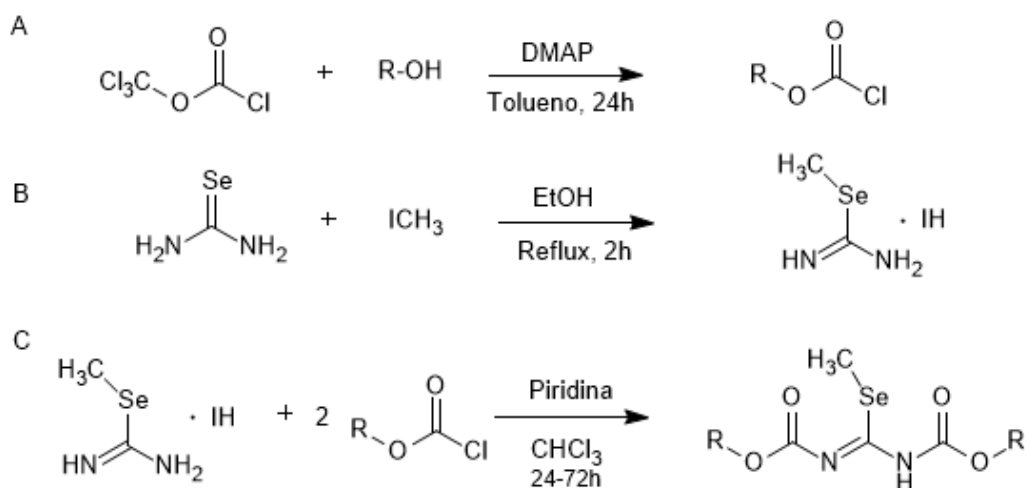
- 11 metilselenocarbamato ezberdinen sintesia.
- Kimika organikoan ohikoak diren teknikak erabiliz (IR, RMN-¹H, RMN-¹³C, analisi elementala, masa espektrometria eta fusio puntua) konposatu berriak karakterizatzea.
- Leishmania infantum amastigote axenikoetan konposatu berrien zitotoxitateak bahetzea eta selektibotasun indize bat lortzea THP-1 zeluletan duten eraginkortasunarekin alderatuta.

Ikerketaren muina eta ondorioak

1) Kimika

Irudian ikus daitekeen bezala, selenokarbamatoak sintetizatzeko bidea simple eta pauso gutxikoa da. Amaierako produktuen sintesia, aurrez sintetizatutako kloroformiatoen eta aurrez sintetizatutako Se-metilselenourearen arteko erreakzioaren bidez burutzen da. Hainbat kasuetan, kloroformiatoak ere komertzialak izan daitezke. (12, 14, 26)

1. irudia. I. serieko konposatuak



C Erreakzioa, 24-72 orduz agitazioan mantentzen da, 1:2 ratio molarra erabiliaz, kloroformo erreakzio ingurunean, piridinaren presentzian. Kasu batzuetan, DMAP (dimetilaminopiridina) erabiltzen da base katalizatzaile moduan. Erreakzioa gertatuta, urarekin garbitu eta diklorometanoaz erauzi. Disolbatzailea atmosfera negatiboan xurgatu eta hauspeakina eter etilikoaz garbitzen da. (23)

2) Biologia

L. infantum amastigote axenikoak, 10% FCS, 1g/L b-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. Michelek 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.

Sintetizatutako konposatuekin amastigote axenikoetan buruturiko 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 burutu zen 4x10⁵ zelula/ml-ko kontzentrazioan, 37°Ctan, %5-eko CO2 atmosferan, 24 orduz. 0.08, 0.4, 2.0, 10.0 and 50.0 µM kontzentrazioak bahetu ziren.

Bizirik geratutako zelulen portzentajea iodopropidioaren (PI) eskusio metodoaz neurtu zen, fluxu zitometriaren bidez. Zelulen ebaluaketa mikroskopikorako parasitoen zuzeneko behaketa burutu zen 96 platerxoko plakatan, 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 Amastigote eta THP-1 zeluletan

Erreferentzia	R	IC ₅₀ Amastigote ± errorea	IC ₅₀ THP-1± errorea	SI
1	Propil	2.76±0.07	>25	>9
2	Butil	2.81±0.07	15.78±0.24	5.63
3	Hexil	2.79±0.11	5.54±0.76	1.99
4	Isobutil	4.12±0.15	21.49±0.89	5.21
5	Alil	2.58±0.16	11.8±1.04	4.57
6	Fenil	2.98±0.05	8.02±0.38	2.69
7	4-metoxifenil	2.98±0.11	11.27±1.09	3.79
8	4-klorofenil	3.26±0.26	3.7±0.14	1.13
9	4-fluorofenil	2.98±0.04	13.84±1.36	4.64
10	Benzil	11.3±0.41	8.93±0.38	0.79
11	4-nitrobenzil	4.75±0.35	13.06±1.09	2.75
Edelfosina	-	0.82±0.13	4.96±0.16	6
Miltefosina	-	2.84±0.1	18.5±0.6	7

Taulan ikusgai den moduan, sintetizatutako 7 konposatuk 3tik beherako IC₅₀ dute, gaur egun erabiltzen den Miltefosina sendagailaren ordenan. Selektibotasun indizeak, orokorrean erreferentziatzat hartutako sendagailenak baino zertxobait baxuagoak dira, 1 konposatuaren kasuan izan ezik, non selektibotasuna 9tik gorakoa den.

Kate alifatikoak dituzten konposatuetan ikusi daiteke, katearen luzerak ez duela eraginkortasunean eraginik, baina hauen bolumenak bai, eragozpen esteriko handikoak (4. Konposatuak) eraginkortasun urriagoa du eta.

Bestalde, eraztun aromatikoak dituzten konposatuetan auresan daiteke, erradikal elektroerakargarriak (NO₂) eraginkortasuna murrizten dutela eta eraztun aromatiko eta karbamatoaren artean bereizle (CH₂) bat sartzeak ere eraginkortasuna nabarmenki gutxitzen duela.

Talde honetan aurrez egindako ikerketa batean, imidoselenokarbamato serie bat sintetizatu eta metodologia berdina erabiliaz *L. infantum* amastigoteetan bahetu ziren (15). Lan honen bidez egiaztatu da, karbamatoaren oxigeno atomo horren gehitzeak, eraginkortasunaren hobetzea dakarrela.

Etorkizunerako planteatutako norabidea

- Konposatu guztiak, zepa ezberdinetako promastigote eta amastigoteetan bahetu.
- Konposatu liderrak, eraginkorrak eta selektiboak baldin badira, *in vivo* testatu leishmaniadun arratoietan.
- Konposatu liderren sufrezko analogoak sintetizatu eta testatu.
- Konposatuen formulazioa eraginkortasuna eta selektibitatea hobetzeko.

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 perifosine 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 Eruope. *Med Mal Infect* 39:741-744.
25. Sharma U, Singh S. (2008) Insect vectors os *Leishmania*: distribution, physiology and their control. *J Vector Borne Dis* 45:255-272.
26. Terraza CA, Tagle LH, Leiva A, Vega JC. (2004) Synthesis and characterization of 4,4'-(dimethylsylene)bis(phenyl chloroformate) and 4,4'-(dimethylgermylene)bis(phenyl chloroformate) and their use in the synthesis of poly(urethanes). *Polym. Bull.* 52:101-107.
27. 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.