



IKER
GAZTE
NAZIOARTEKO
IKERKETA EUSKARAZ

IV. IKERGAZTE NAZIOARTEKO IKERKETA EUSKARAZ

2021eko ekainaren 9, 10 eta 11a
Gasteiz, Euskal Herria

ANTOLATZAILEA:
Udako Euskal Unibertsitatea (UEU)

ZIENTZIAK ETA NATURA ZIENTZIAK

RBM15, BM18, BM29, BM36, BM39
konposatuen jarduera
leishmanizidaren azterketa

Aroia Burguete eta Paul Nguewa

111-114 or.

<https://dx.doi.org/10.26876/ikergazte.iv.05.14>



BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 konposatu jarduera leishmanizidaren azterketa

Burguete-Mikeo, A.¹, Nguewa, P.¹

¹Nafarroako Unibertsitatea, ISTUN Osasun Tropikaleko Institutua, Mikrobiologia eta parasitologia saila, IdiSNA (Nafarroako Osasun Ikerketa Institutua). Irunlarrea 1, PK 31008 Iruñea

aburguetem@unav.es

Laburpena

Orain arte frogatu gabeko hogeita hamar konposatu baino gehiagoren jarduera leishmanizida aztertu zen. Horietatik hamahiruk 35 μ M baino IC₅₀ baxuagoa erakutsi zuten, eta emaitza hoberenak aurkeztu zituzten bost konposatuekin jarraitu zen lanean. Lan honetan BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 konposatuaren emaitzak aurkezten dira *Leishmania major* promastigote eta amastigoteetan, baita arratoiaren makrofago peritonealetan neurtutako zitotoxikotasuna ere. BM15 konposatua interesgarria suertatu zen amastigoteetan zuen jardueragatik, makrofagoen infekzioa eta makrofago bakoitzeko amastigoteen kopurua nabarmen murriztuz.

Hitz gakoak: leishmaniasia, parasitoak, zitotoxikotasuna

Abstract

*More than thirty novel compounds were studied for their potential leishmanicidal activity. Thirteen of them showed an IC₅₀ less than 35 μ M and further assays were performed with five of the most promising compounds. In this work, the results of compounds BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 in *L. major* promastigotes and amastigotes as well as their cytotoxicity in murine peritoneal macrophages are presented. The compound BM15 showed most promising results for its activity in amastigotes, significantly reducing the infection of macrophages and the number of amastigotes per macrophage.*

Keywords: leishmaniasis, parasites, cytotoxicity

1. Sarrera eta motibazioa

Leishmaniasia flebotomo emeek transmititutako *Leishmania* generoko parasito protozoarioek eragindako gaixotasun talde bat da. Gaur egun, leishmaniasia osasun-arazo garrantzitsua da garapen bidean dauden herrialde askotan. Osasunaren Mundu Erakundearen (OME) datuen arabera, infekzio horiek endemikoak dira mundu osoko 98 herrialdeetan. Urtero milioi bat leishmaniasi kasu inguru erregistratzen dira eta kalkulaturako hilkortasuna 20.000 heriotza baino gehiagokoa da¹⁻³.

Ornodunetan, Leishmaniak aflagelatuak (amastigoteak) eta intrazelularrak dira, eta ornogabeetan aldiz, flagelatuak (promastigoteak) eta estrazelularrak. Hogei espezie patogeno baino gehiago daude, eta eragindako gaixotasunak hainbat forma kliniko ditu, esaterako, larruazaleko lesio lokalizatuak eta leishmaniasi biszeralera edo kala-azar. Azkeneko hau gaixotasunaren formarik larriena da, eta ia beti hilgarria, tratatzen ez bada¹⁻³.

Europan, gaixotasuna hipoendemikoa da Mediterraneoko arroko herrialdeetan. Albania, Bosnia, Bulgaria, Zipre, Kroazia, Espainia, Frantzia, Grezia, Italia, Ipar Mazedonia, Malta, Montenegro, Portugal eta Turkian kasuak aurkitu dira⁵.

2015ean leishmaniasia Espainian nahitaez aitortu beharreko gaixotasun gisa sailkatu bazen ere autonomia-erikidego guztientzat, azpideklarazio garrantzitsu bat susmatzen da, % 25-40koa leishmaniasi biszeralaren kasuan eta ia % 100ekoa larruazaleko leishmaniasian⁶. Euskal Herriari dagokionez, 1998-2018 denboraldian, gutxienez giza leishmaniasia 54 kasu deskribatu dira, adin guztietako

pertsonetan, eta zenbait kasutan GIB/HIESaren koinfekzioarekin lotuta. Kasu horietako hogeitaz Nafarroan jakinarazi ziren eta hogeita hamalau Euskadin. Ipar Euskal Herriari buruzko informaziorik ez da lortu^{7,8}.

Une honetan, ez dago giza txerto eraginkorrik, eta emandako tratamendu nagusiak, besteak beste, antimonial pentabalenteak, B anfoterizina, paromomizina eta miltefosina dira⁹. Guztiek hainbat desabantaila dituzte, hala nola toxikotasuna eta kostu ekonomiko handia, administratzeko zailtasuna edo erresistentzien agertzea. Horregatik, egungo erronketako bat diana terapeutikoak eta tratamendu aktibo, seguru eta eskuragarri berriak aurkitzea da^{10,11}.

2. Arloaren egoera eta ikerketaren helburuak

Lehen aipatutakoa kontuan hartuta, honako helburu hauek proposatu dira lan honetarako:

- Jarduera leishmanizida duten konposatu berriak bilatzea.
- Etorkizun handieneko konposatuen zitotoxikotasuna aztertzea arratoien makrofago peritonealetan.

3. Ikerketaren muina

3.1. Konposatuak

Orain arte frogatu gabeko 30 konposatu baino gehiagoren jarduera leishmanizida zehaztu zen. Guztiek disolbagarritasun ona erakutsi zuten uretan eta konposatuen kontzentrazio gero eta handiagoak gehitu zitzaizkien parasitoei 0,19-64 μ M tartearen barruan. Horietako hamahiruk 13-35 μ M arteko IC₅₀ (% 50eko kontzentrazio inhibitzailea) aurkeztu zuten. Honek, prozesu biologiko edo biokimiko baten % 50a inhibitzen duen dosia definitzen du, eta emaitza hoberenak aurkeztu zituztenekin jarraitu zen lanean, BM15, BM18, BM29, BM36, eta BM39 hain zuzen ere.

3.2. Konposatuen jarduera *Leishmania major* espeziearen promastigoteen aurrean

Lanerako erabili ziren parasitoak hazkundearen fase logaritmikoan zeuden *Leishmania major* (*L. major*) espezieko promastigote proziklikoak izan ziren eta M199 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) medio osatuan hazi ziren¹⁰. Esperimenturako, 96 plater txoko plaketan erein ziren, eta konposatuen kontzentrazio gero eta handiagoak gehitu ziren 26 °C-tan 48 orduz. Inkubazioaren ondoren, konposatuen IC₅₀ zehaztu zen parasitoetan (hazkundearen % 50a inhibitu zuen kontzentrazioa) 3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) -2,5-difeniltetrazolio bromuro metodoa (MTT) erabiliz.

3.3. Konposatuen zitotoxikotasuna arratoien makrofago peritonealetan

Ikerketarako, BALB/c arratoien makrofago peritonealak erabili ziren. Animaliekin egindako prozedura guztiak Nafarroako Unibertsitateko Animaliak Zaintzeko Etika Batzordeak onartu zituen. Makrofagoak DMEM (Gibco, USA) medioan erein ziren, % 0,5 penizilina/estreptomizina 10.000 U/mL eta % 10 HIFBSz osatua 96 plater txoko plaketan eta konposatuen kontzentrazio bakarra gehitu zitzaien (promastigoteetan neurtutako IC₅₀), 37°C-tan eta % 5 CO₂ atmosferan. 48 orduko tratamenduaren ondoren, makrofagoen ehuneko biziraupen tasa zehaztu zen MTT metodoa erabiliz. Hurrengo taulan (1. taula), *L. Major* parasito promastigoteekin eta arratoien makrofago peritonealekin egindako saiakuntzetan lortutako emaitzak jasotzen dira.

1. Taula. BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 konposatuen IC₅₀ *L. major* espezieko promastigoteetan eta zitotoxikotasuna arratoien makrofago peritonealetan.

Konposatua	IC ₅₀ promastigote ± SD (µM)	Makrofago peritonealen % biziraupen tasa
BM15	17,77 ± 1,17	86
BM18	34,60 ± 0,84	93
BM29	28,69 ± 1,32	90
BM36	15,82 ± 0,05	94
BM39	14,77 ± 0,61	85
Paromomizina	84,01 ± 6,83	100
B Anfoterizina	0,19 ± 0,02	~100
Miltefosina	6,10 ± 0,44	~100

Konposatu guztiek paromomizina baino IC₅₀ baxuagoa aurkeztu zuten. Makrofagoen zitotoxikotasunari dagokionez, kasu guztietan biziraupen tasa % 85 baino altuago izan zen.

3.4. Konposatuen jarduera *L. major* amastigoteetan

Makrofagoak DMEM medioan erein ziren (3.3 atalean bezala osatua) 8 platertxoko plaka berezietan (Lab-Tek Chamber Slide System, Merck, Darmstadt, Germany) eta parasito infektiboak gehitu zitzaizkien, 1:20ko proportzioan (20 parasito makrofago bakoitzeko), eta 24 orduz inkubatu ziren 37°C-tan. Behin makrofagoak infektatuta, hautatutako konposatuekin tratatu ziren eta berriro inkubatu ziren 37°C-tan eta % 5 CO₂ atmosferan. 24 orduko tratamenduaren ondoren, makrofagoen infekzio-ehunekoa eta makrofago bakoitzeko zenbat amastigote zeuden zehaztu zen mikroskopio optikoarekin kontatuz. Lortutako emaitzak 2. taulan ageri dira.

2. Taula. BM15, BM18, BM29, BM36, BM39 konposatuen jarduera *L. major* amastigoteetan.

Konposatua	Konposatuaren kontzentrazioa (µM)	Infekzio-ehunekoa ± SD	Amastigote/makrofago ± SD
BM15	8,88	36,25 ± 2,50	2,45 ± 0,08
BM18	34,60	38,24 ± 0,30	2,89 ± 0,20
BM29	28,69	28,40 ± 3,40	2,05 ± 0,08
BM36	15,82	69,89 ± 5,20	3,87 ± 0,60
BM39	14,77	74,35 ± 3,00	4,43 ± 1,90
Tratatu gabea	0,00	61,19 ± 8,45	3,87 ± 0,60

BM15, BM18 eta BM29 konposatuek nabarmen murriztu zuten makrofagoen infekzio-ehunekoa, bai eta makrofago bakoitzeko amastigoteen kopurua ere, kontrol gisa erabili ziren tratatu gabeko kultiboekin alderatuta. Bestalde, BM36 eta BM39 konposatuek ez zuten jarduerarik erakutsi saiaturako kontzentrazioetan. Nabarmentzekoa da BM15ek infekzioaren ehunekoa % 36,25era eta makrofago bakoitzeko amastigoteen kopurua 2,45era murriztu zuela, promastigoteetan neurtutako IC₅₀ (17,77 µM) kontzentrazioaren erdia erabiliz.

4. Ondorioak

Aztertutako konposatuetako hamahiruk Leishmaniaren aurrean aktibitatea erakutsi zuten kontzentrazio baxuetan, eta horietako bosten zitotoxikotasuna probatzean, toxikotasun baxua hauteman zen. BM15 konposatua interesgarria suertatu zen amastigoteetan zuen jardueragatik, makrofagoen infekzioa eta makrofago bakoitzeko amastigoteen kopurua nabarmen murriztuz. Guzti hau kontuan

hartuta, ondorioztatu da, konposatuen jarduera leishmanizida aztertzea, bai gaur egun beste gaixotasun batzuen aurrean erabiltzen diren farmakoak, bai formulazio berriak, estrategia ona dela egungo erronkak lortzeko, hala nola leishmaniasiaren aurkako tratamendu berriak aurkitzea.

5. Etorkizunerako planteatzen den norabidea

- Konposatu gehiagoren jarduera leishmanizida zehaztea, konposatu aktiboen bankua handitzeko.
- Ikertutako konposatu aktiboen antzeko egitura duten konposatuak bilatzea.
- Konposatuek izan ditzaketen ekintza-mekanismoak aztertzea, eta jardueran parte hartzen duten geneak aztertzea.

6. Erreferentziak

1. Sundar, S. eta Rai M. (2002): "Laboratory diagnosis of visceral leishmaniasis" *Clin Diagn Lab Immunol*, 9(5):951-958.
2. Alvar, J. et al. (2012): "Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence" *PLoS One*, 7(5).
3. Ruiz-Postigo, J. A. et al (2020): "Global leishmaniasis surveillance, 2017–2018, and first report on 5 additional indicators", *Wkly Epidemiol Rec.*, 95:281-300.
4. Sesma, B. eta Barricarte, A. (2009): "Leishmaniasis in Navarra: review of activities", *An Sist Sanit Navar.*, Nafarroa, 20(2).
5. Fernández Martínez, B. et al (2019): "La Leishmaniasis En España: Evolución de los casos notificados a la Red Nacional De Vigilancia Epidemiológica desde 2005 a 2017 y resultados de la vigilancia de 2014 a 2017" *Cent Nac Epidemiol Inst Salud Carlos III Red Nac Vigil Epidemiológica*, Madril, 27(2):15-31.
6. Madrilgo erkidegoa (2018): Dirección General de Salud Pública. Consejería de Sanidad. Red de Vigilancia Epidemiológica de la Comunidad de Madrid. Enfermedades de Declaración Obligatoria Protocolo de Vigilancia de la Leishmaniasis.
7. Nafarroako Osasun Publikoko Buletinak (1998-2018). [http://www.navarra.es/home_es/Gobierno+de+Navarra/Organigrama/Los+departamentos/Salud/Organigrama/Estructura+Organica/Instituto+Navarro+de+Salud+Publica/Publicaciones/Publicaciones+profesionales/Epidemiologia/Boletin+ISP.htm]
8. EAEko osasun publikoari buruzko txostenak eta aldizkari epidemiologikoak (1998-2018). [<https://www.euskadi.eus/informacion/informe-de-salud-publica/web01-a3vipub/es/>]
9. OMS (2010): "Control de las leishmaniasis: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis", *Ser Inf Técnicos*, Geneva, 949.
10. Fernández-Rubio, C. et al. (2019): "Leishmanicidal activity of isoselenocyanate derivatives", *Antimicrob Agents Chemother*, 63(2):e00904-18.
11. Vacas, A. et al (2020): "LmjF.22.0810 from *Leishmania major* Modulates the Th2-Type Immune Response and Is Involved in Leishmaniasis Outcome", *Biomed*, Nafarroa, 8(11):452.

7. Eskerrak eta oharrak

Eskerrak eman nahi dizkiegu La Caixa fundazioari (LCF/PR/PR13/11080005) eta Nafarroako Kutxaren Fundazioari, Nafarroako Osasun Gobernuari (12/2017), Roviralta Fundazioari, Ubesol fundazioari, Laser Ebrori eta Inversores Garcilaso de la Vega SLri. Mila esker Maite Loperena aholku eta zuzenketa guztiengatik.