

Inhibición de la Cruzaína: estrategia molecular en la búsqueda de nuevos fármacos para el Mal de Chagas

Jorge A. Huete-Pérez⁺, Ricardo A. Huete^{*}, Ivan Marín^{*}, y James H. McKerrow⁺

Resumen. - Las proteasas se manifiestan como factores patogénicos importantes de muchas enfermedades parasitarias, ya sea induciendo daños y facilitando la invasión en tejidos o salvando metabolitos a partir de las proteínas del hospedero. Dada la importancia de estas moléculas para la supervivencia de los parásitos, nuestro trabajo se ha centrado estratégicamente en procurar la inhibición de la proteasa clave de *T. cruzi*, el parásito que causa el mal de Chagas. Presentamos aquí un análisis sobre el rol de cada dominio de la proteasa en el procesamiento molecular y sorteo de la enzima hacia su comportamiento celular final.

Introducción

La síntesis de nuevos agentes quimioterapéuticos para tratar las enfermedades infecciosas es una de las prioridades de la investigación biológica moderna, pues en muchos casos, los agentes nocivos han desarrollado cepas resistentes a los fármacos actuales. El agente que provoca el mal de Chagas, se encuentra entre los que han logrado desarrollar cepas resistentes, pero se sigue tratando con fármacos diseñados en los años cincuenta, muy limitados en su eficacia y peligrosos por su alta toxicidad.

Hasta ahora, los científicos han descubierto los fármacos a través de un "método tradicional" de escrutinio aleatorio de compuestos naturales y sintéticos. Así se descubrieron los medicamentos con que se trata el Chagas: Nifurtimox y Benzanidazole. Esta enfermedad es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* y

representa un problema de salud muy grave que afecta a más de 25 millones de personas en Centro y Sudamérica. El ciclo de vida del parásito es muy complicado, con etapas de permanencia en humanos, animales vertebrados e insectos. De momento, las dos formas más estudiadas de este ciclo son trypomastigota y amastigota.

Los compuestos contra el Chagas solamente destruyen la forma trypomastigota del parásito, por lo que son efectivos solamente en la fase aguda de la enfermedad. Sin embargo, estos medicamentos no eliminan el parásito en la sangre humana y no tienen efecto en sus formas reproductivas e intracelulares. Además, tienen efectos colaterales tóxicos, lo que los hace insatisfactorios para el tratamiento del Chagas a largo plazo y son inútiles para prevenir el paso a la forma crónica de la enfermedad.

* Centro de Biología Molecular - UCA.

+ Universidad de California.

Se impone, por lo tanto, la búsqueda de nuevos medicamentos. Los hallazgos y avances científicos de las últimas dos décadas, abren posibilidades para la utilización de una estrategia enfocada y económicamente rentable en el diseño de mejores fármacos. Esta estrategia alternativa, conocida como "diseño basado en la estructura," se debe al cúmulo de información obtenida recientemente sobre las secuencias de genes que codifican moléculas de enzimas (McKerrow, 1993).

Con esta estrategia alternativa en la búsqueda de fármacos nuevos para tratar el Chagas y en colaboración con la Universidad de California de San Francisco, se ha implementado un trabajo multidisciplinario que mediante una combinación de tecnologías modernas usando biología molecular, cristalografía de rayos X, química orgánica, bioquímica y biología celular permite producir y ensayar un sinnúmero de compuestos químicos diseñados estratégica y específicamente para inhibir las enzimas cisteíno-proteasas de varios parásitos de humanos (McGrath, *et al.*, 1993).

Las proteasas son factores importantes de la patogenicidad de los parásitos que pueden inducir daños en los tejidos y facilitar la invasión de células hospederas. Además, con frecuencia permiten que los parásitos recuperen metabolitos a partir de proteínas del huésped. El trabajo que aquí se presenta parte de la premisa de que la acción de un nuevo fármaco debe dirigirse contra estas enzimas proteasas (McKerrow *et al.*, 1993).

La proteasa que se trata de inhibir o inactivar en el caso del parásito *Trypanosoma cruzi* es la molécula de "cruzaína", cuya participación se ha propuesto en muchos procesos, como el metabolismo celular del parásito, la interacción con los macrófagos y la invasión y adhesión a células hospederas. Se ha descubierto que la adición de inhibidores de cisteíno-proteasas genéricos impiden la replicación y la diferenciación (metamorfosis) de los parásitos *T. cruzi* en experimentos *in vitro*, lo que hace presumir la importancia de la cruzaína para el parásito..

La ilustración 1 muestra esquemáticamente la estrategia utilizada: El gene que codifica la proteasa cruzaína se clonó primeramente en un plásmido vector y se expresó en bacterias de *Escherichia coli* (Eakin *et al.*, 1993). Este avance permitió la producción de grandes cantidades de cruzaína. En los estudios preliminares se encontraron algunos compuestos inhibidores muy activos contra la cruzaína. Cuando se dispone de mucha cruzaína, es posible cristalizarla y determinar su estructura tridimensional. El conocimiento de la estructura permite la simulación de inhibidores por gráficos computarizados y el subsecuente diseño y elaboración de un sinnúmero de compuestos nuevos. Los compuestos que se consideran "prometedores" se prueban en ensayos *in vitro* y también por co-cristalización con la molécula de cruzaína, lo que nuevamente provee mayor información sobre la interacción de cruzaína con el inhibidor. Esto conlleva una vez más a la ronda de diseño-elaboración, ensayos *in vitro* y nuevamente co-cristalización.

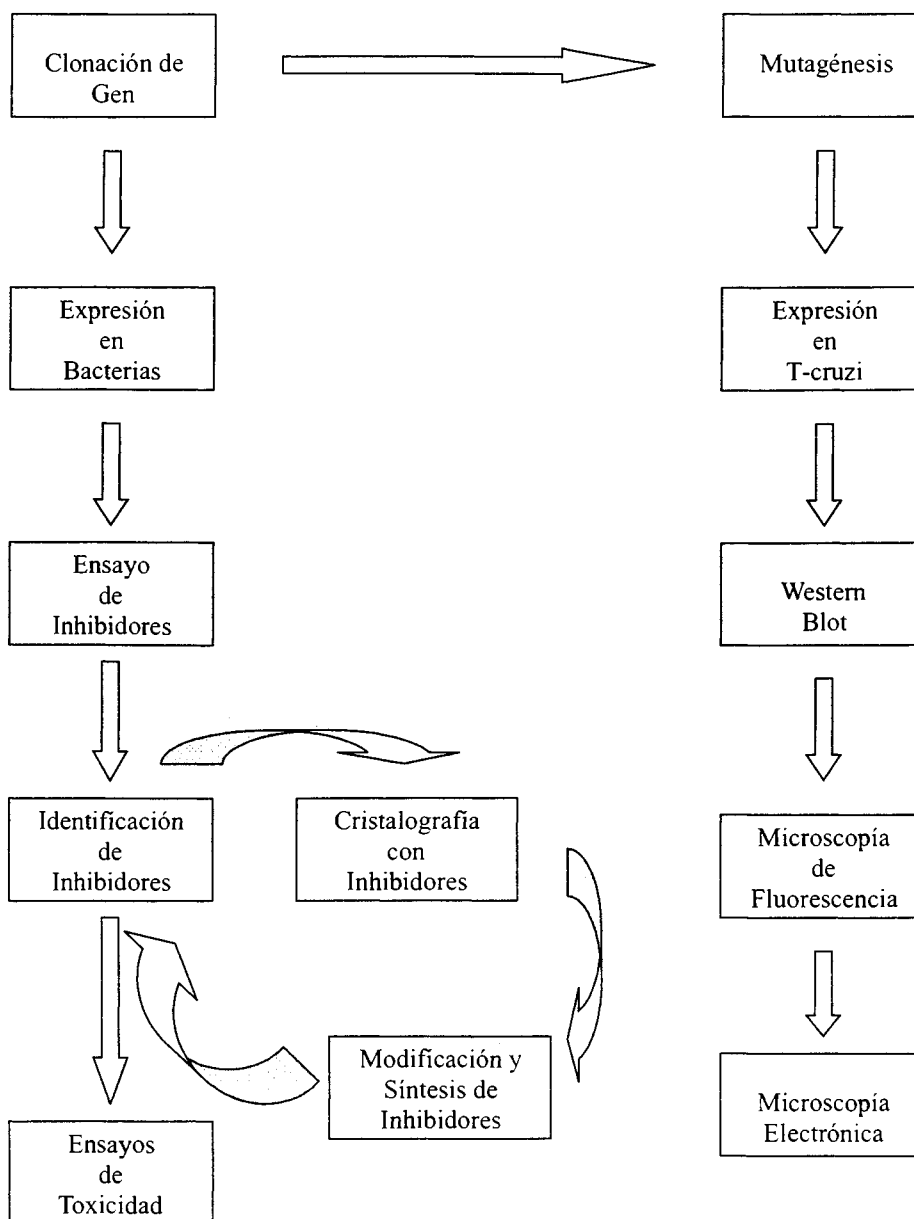


Ilustración 1. Estrategia alternativa de diseño basado en la estructura, dirigida contra la enzima Cruzaína de *T. cruzi*.

Todo compuesto inhibidor-prometedor se somete a un análisis riguroso de toxicidad en animales infectados experimentalmente. Los compuestos más prometedores con los que se cuenta son inhibidores reversibles e

irreversibles. A la fecha, el mejor compuesto irreversible, denominado K11002, es un seudo péptido análogo del sustrato de la enzima cruzaina (ilustración 2).

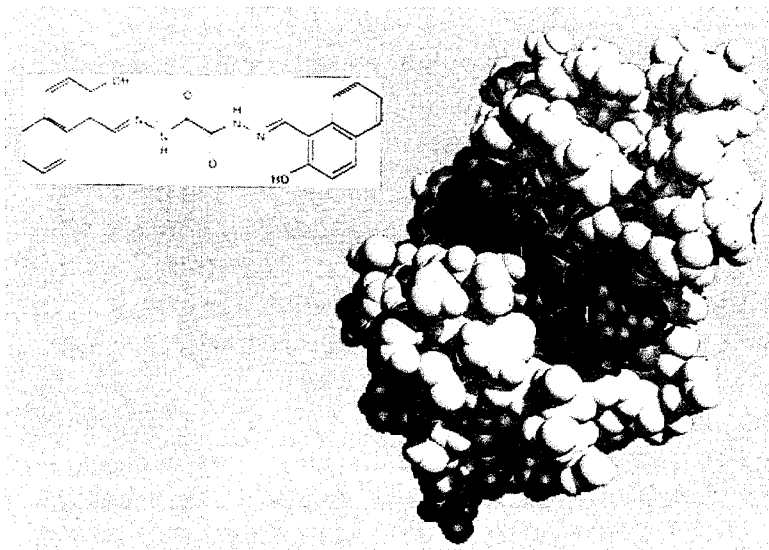


Ilustración 2. Molécula de cruzaina con el inhibidor irreversible (color oscuro), ligado en su sitio activo.

Un trabajo complementario que forma parte de la misma estrategia es la producción (expresión) y manipulación de la secuencia génica (mutagénesis) de la cruzaina, para expresar cruzaina alterada, ya no en bacterias de *Escherichia coli*, sino dentro del mismo parásito *Trypanosoma cruzi*. El objetivo es estudiar la interacción de las formas alteradas (mutantes) de cruzaina con los compuestos inhibidores-prometedores, así como también el comportamiento bioquímico y celular de las cruzainas mutantes, y específica-

mente su procesamiento y sorteo de compartimentos celulares.

Las cisteíno-proteasas de los parásitos trypanosomatidas se sintetizan en las células como proteasas precursoras que contienen un péptido señal hidrofóbico, un dominio amino-terminal de 100-120 aminoácidos de longitud, un dominio catalítico (parte activa) de 200-210 aminoácidos y un dominio terminal carboxílico de 100-130 aminoácidos de longitud (ilustración 3).

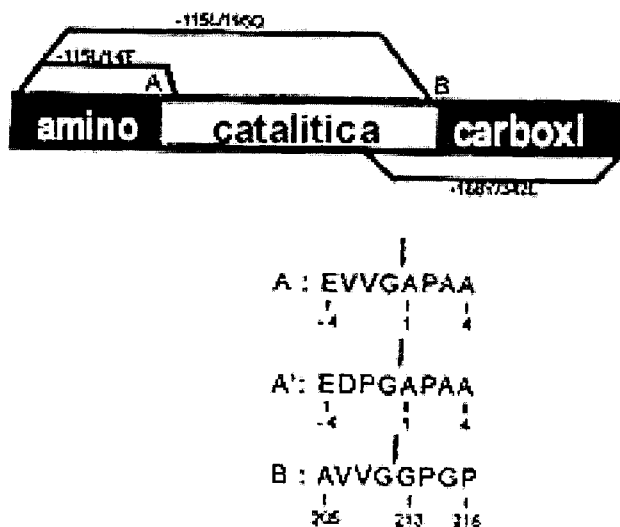


Ilustración 3. La molécula de cruzaina está formada por tres dominios: amino, catalítico y carboxi-terminal. En la ilustración, las regiones de corte autocatalítico están designadas A y B. A' muestra el área de mutación (ver métodos).

No se conoce la función específica del dominio carboxílico, extensión ausente en la mayoría de las cisteíno-proteasas conocidas. Por su parte, el dominio amino-terminal tiene dos funciones: mantener a la enzima precursora en su forma inactiva hasta alcanzar su ubicación precisa en el compartimento celular en donde será activada; y guiar el proceso de plegamiento tridimensional de la enzima. Esta investigación analiza el rol de los dominios de cruzaina en el procesamiento y sorteo de la enzima hacia el compartimento celular final.

Materiales y métodos

Cultivo de parásitos. Los parásitos (clon MHOM/BR/78/Sylvio-X10-CL7) se cultivaron en medio LIT que contiene triptosa/infusión de hígado y suero fetal bovino al 10%. La incubación se realizó a 27°C. Los parásitos se cosechaban a una densidad de $1-5 \times 10^7$ células/ml.

Amplificación de PCR. La reacción de la polimerasa en cadena (PCR) fue de 50 µl y contenía dos unidades de

polimerasa *Pwo*, 100 ng de primers y 2 ng de ADN plásmido. Se utilizó un termociclador Perkin-Elmer. Todas las reacciones de PCR se realizaban en no más de 25 ciclos, los cuales consistían en desnaturalización a 94°C por un minuto, emparejamiento a 55°C por un minuto y extensión a 72°C por dos minutos.

Construcción de plásmidos. Todos los plásmidos utilizados para la expresión de proteínas recombinantes en *T. cruzi* se originaron de los plásmidos pT (Kelly *et al.*, 1992) y pCheYTc (Eakin *et al.*, 1993). El primero es un vector específico para *T. cruzi* y el segundo contiene la secuencia entera del gen de cruzaina. Se sintetizaron los iniciadores tomando en cuenta las regiones génicas según el propósito previsto para cada plásmido. Todos los plásmidos incluyeron la secuencia del gen de la proteína de fluorescencia verde (GFP), que se utiliza como marcador de la expresión en este trabajo. El cuadro 1 muestra un listado de los plásmidos construidos y de las regiones de genes que se incluyeron (Huete-Pérez *et al.*, 1999).

Cuadro 1
PLÁSMIDOS UTILIZADOS EN TRANSFECCIONES DE *T. CRUZI*

Plásmidos	Proteínas expresadas
pT-GFP	Proteína de fluorescencia verde (GFP)
pT-Pro-GFP	Dominio amino-terminal + GFP
pT- ProCat-GFP	Dominios amino-terminal y catalítico + GFP
pT-GFP-Ctd	GFP + dominio carboxi-terminal
pT- Pro'Cat-GFP	Dominios amino- y catalítico (mutación) + GFP

Transfección. El procedimiento de transfección utilizado fue una modificación del protocolo de Higuchi *et al.* (1988). Cuatrocientos microlitros de parásitos se transfectaron con 10 µg de ADN de plásmido. Los parásitos transformantes se seleccionaron mediante la adición gradual de gentamicina G418 hasta una concentración final de 200 µg/ml.

Mutagénesis. Las mutaciones del gen de la cruzaina se realizaron por PCR usando ADN de plásmido y reinsertando los fragmentos de amplificación en los plásmidos correspondientes.

Detección de GFP/ Microscopía. La fluorescencia de GFP y de las proteínas ligadas a la GFP se determinó por microscopía de fluorescencia, usando la excitación y emisión de FTC. La microscopía electrónica se efectuó con pruebas de anticuerpos contra la GFP y contra cruzaina.

Resultados

El dominio amino-terminal de la cruzaina precursora es absolutamente necesario para el direccionamiento (sorteo) de la proteasa hacia su destino final los lisosomas. Los plásmidos pT-ProGFP y pT-ProCatGFP, - que contienen el dominio amino-terminal precediendo, respectivamente, a la proteína GFP y la región catalítica más la proteína GFP -, condujeron a ambas secuencias peptídicas hacia los lisosomas. Se observa la intensidad de la fluorescencia de GFP en los lisosomas de *T. cruzi*, los que se ubican en los extremos posteriores del parásito

(ilustración 4). También se confirmó la localización de las proteínas usando una sonda marcadora de fluorescencia para estructuras de bajo pH. Se confirmó, además, por microscopía inmuno-electrónica usando anticuerpos para GFP y para la región catalítica de cruzaina. No hubo sorteo hacia los lisosomas en los casos en que se usó la proteína GFP como control. Tampoco hubo sorteo cuando se usó el dominio carboxílico posterior a GFP (pT-GFP-Cat), pero sin incluir el dominio amino-terminal.

Se construyó un plásmido en el que se alteró el sitio de corte entre el dominio amino-terminal y el catalítico (ilustración 3). Por el método de Western Blot se comprobó que la cruzaina alterada en dicha región no permitió el corte para liberar la región catalítica. La ilustración 5 muestra que la eliminación del corte del dominio amino-terminal conlleva a una acumulación de la fluorescencia, esta vez no en los lisosomas sino en otro compartimento - el aparato de Golgi.

Las anomalías del aparato de Golgi causadas por la eliminación del corte se estudiaron por microscopía electrónica. En la ilustración 6 se observan grandes vesículas cercanas al núcleo, específicamente en la región del Golgi.

En este trabajo se hizo un alineamiento del dominio amino-terminal de cruzaina con el de proteasas homólogas de otros organismos. Se observa gran similitud entre éstas y la presencia de un fragmento de nueve aminoácidos altamente conservado. En la estructura tridimensional de esta región puede

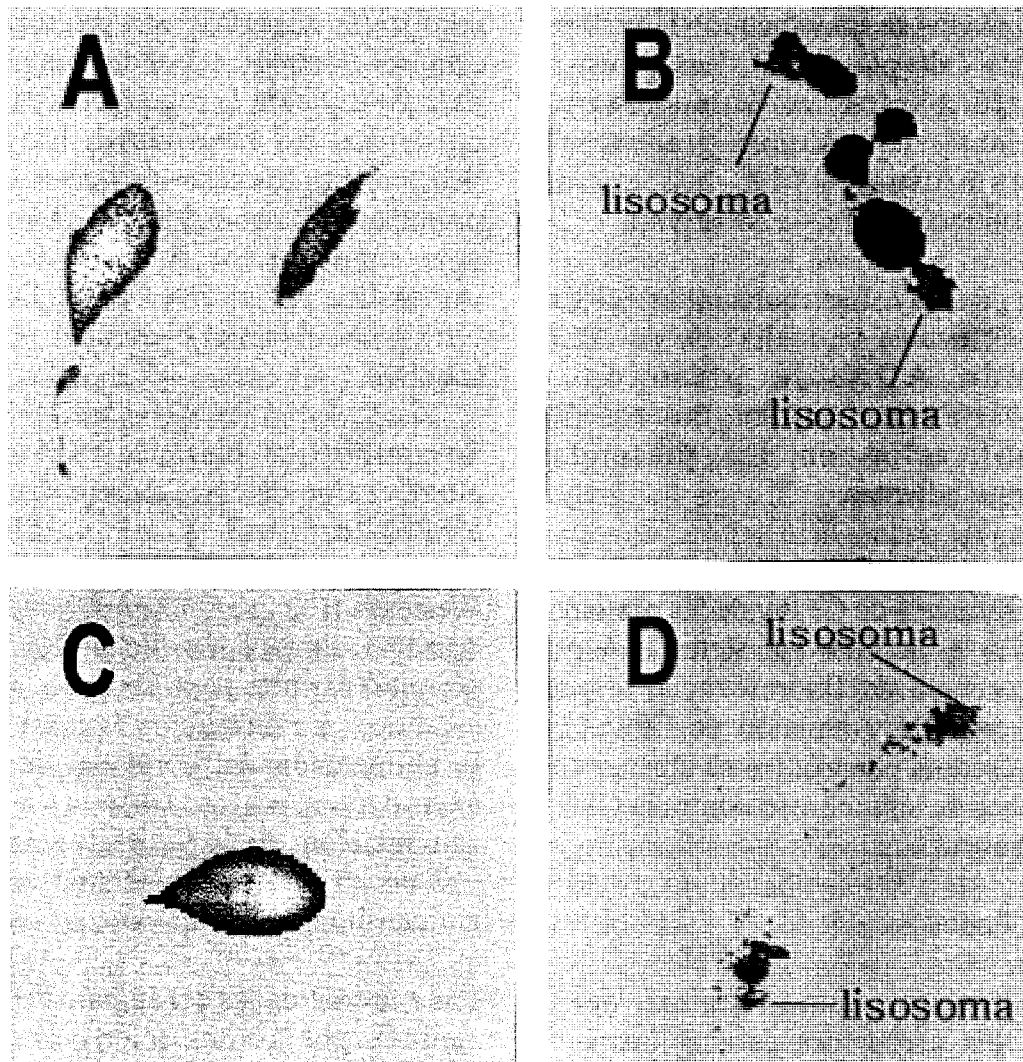


Ilustración 4. La localización de la fluorescencia de proteínas/GFP en los parásitos varió en dependencia de la inclusión/ausencia del dominio amino-terminal de cruzaina. A y D corresponden a los plásmidos pT-GFP y pT-GFP-Cat; B y D corresponden a los plásmidos pT-ProGFP y pT-ProCatGFP, respectivamente.

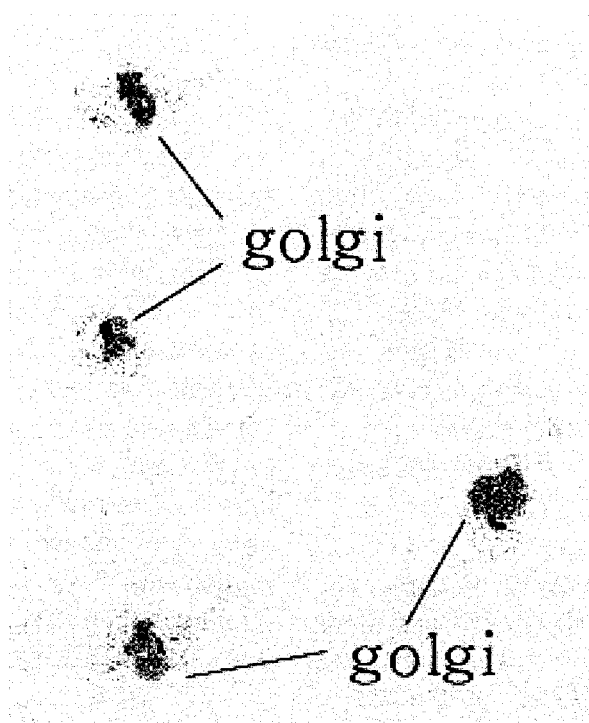


Ilustración 5. La localización de las proteínas (su fluorescencia) se localiza en la región del Golgi en los casos en que el sitio de corte autocatalítico se alteró para impedir el procesamiento de la cruzaina.

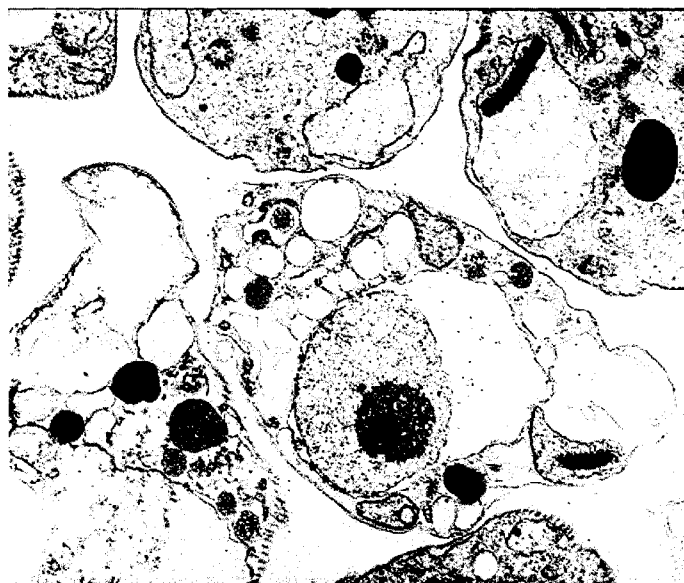


Ilustración 6. Células de T. cruzi mostrando alteraciones morfológicas en forma de vesículas grandes en la región del Golgi.

verse que dicho fragmento está ubicado entre dos hélices, en un lugar muy estratégico con gran posibilidad de interacción hacia el exterior de la molécula. En el caso de la proteasa catépsin L, este fragmento desempeña un rol importante para la asociación de la proteasa con membranas celulares. La hipótesis era de que el fragmento correspondiente en cruzaina podría también ser la parte de ligación de la cruzaina con un supuesto receptor (ilustración 7).

Se crearon mutaciones en algunos de los aminoácidos contenidos en el fragmento de nueve aminoácidos y se encontró que las mutaciones de los aminoácidos contenidos entre la lisina K44 y arginina R47 (numeración de cruzaina) conllevan a una falla del sorteo de proteínas hacia los lisosomas. Estos productos se desplazan más bien por todo el citoplasma y el flagelo, muy similar a lo que ocurre cuando la proteína GFP se expresa con los plásmidos controles.

Discusión

En los países subdesarrollados, los cambios demográficos y ambientales y, principalmente, la pobreza y la falta de voluntad política, agravan los problemas de salud que, en su mayoría, son enfermedades infecciosas. Estas enfermedades infecciosas emergentes y re-emergentes continúan siendo la causa principal de muerte en los países tropicales. La incidencia de muchas de estas enfermedades podría incrementarse hasta convertirse en un problema de salud pública mundial con repercusiones económicas incalculables.

Actualmente se plantean muchas dificultades para producir medicamentos nuevos, aunque su necesidad es evidente. Una dificultad se plantea porque los fondos internacionales para la investigación de las enfermedades originadas por parásitos son muy limitados, porque las grandes compañías farmacéuticas tienen muy poco interés en invertir en medicamentos para parasitosis. Otra dificultad es la capacidad de cambio y adaptación de los microorganismos por su sorprendente plasticidad genómica, que facilita el surgimiento de cepas y clones de parásitos altamente resistentes a los antibióticos.

Una estrategia moderna en la búsqueda de nuevos fármacos contra las enfermedades parasitarias incluye técnicas de biología molecular. Este estudio es parte de los trabajos que se llevan a cabo como parte del programa de investigaciones para dar respuesta al mal de Chagas en Nicaragua.

Se ha logrado demostrar que el dominio amino-terminal de cruzaina es necesario y suficiente para sortear la proteasa al compartimento correcto: los lisosomas. Este sorteo ocurre independientemente de la presencia o ausencia del dominio carboxi-terminal. Se demostró que esta región no es necesaria para el sorteo, al menos en la fase epimastigota que fue la que se utilizó en estos estudios.

El equipo investigador demostró que el dominio amino-terminal es removido del resto de la cruzaina por un proceso autocatalítico (Eakin *et al.*, 1993). Aquí se demuestra que, cuando este mismo dominio amino-terminal se queda unido al resto de la molécula, no ocurre el

sorteo de ésta hacia los lisosomas, en donde deberá realizar su función enzimática. La acción de este efecto se acompaña de una malformación a nivel del Golgi, probablemente debida a la acumulación de proteína precursora sin procesar.

Un fenómeno muy similar de aberración morfológica se encontró con la acción de algunos inhibidores (Engel *et al.*, 1998). Esta observación nos lleva a la conclusión de que los inhibidores reversibles o irreversibles de cruzaina pueden estar inhibiendo la cruzaina precisamente por impedir el corte autocatalítico, y que esta inhibición ocurre sin dudas en un compartimento post-Golgi de pH ácido.

Este hallazgo es muy importante para el diseño de fármacos a partir de inhibidores de la cruzaina.

En este trabajo se ha encontrado un fragmento de nueve aminoácidos que es la parte de la molécula de cruzaina que deberá actuar como enlace de un posible receptor de membranas. Este fragmento es altamente conservado. La cruzaina de *T. cruzi* y las moléculas homólogas de otros organismos utilizan este mecanismo de sorteo que es diferente del mecanismo dependiente de manosa-6-fosfato (M6P). Parte del trabajo en el Centro de Biología Molecular de la UCA está orientado a la detección y purificación de la supuesta molécula-receptora.

1	55				
-----M	ELLLLDVLC	LGTAIAIPKF	DQFFSAEWSQ	WRSTHRRLY	GT
-----N	KPDLILAAPC	LGIASAJLTF	DHSIEAQMTX	WKAMHNRLY	GN
NSGNARALEL	AAVLVVHACL	VPAATASLHA	ETTLTSQFAE	FRQKHGRVYE	SA
NATSRRAALCA	VAVVCVVLAA	ACAPARAIHV	GTPAALPEE	FRTYGRAYE	TL

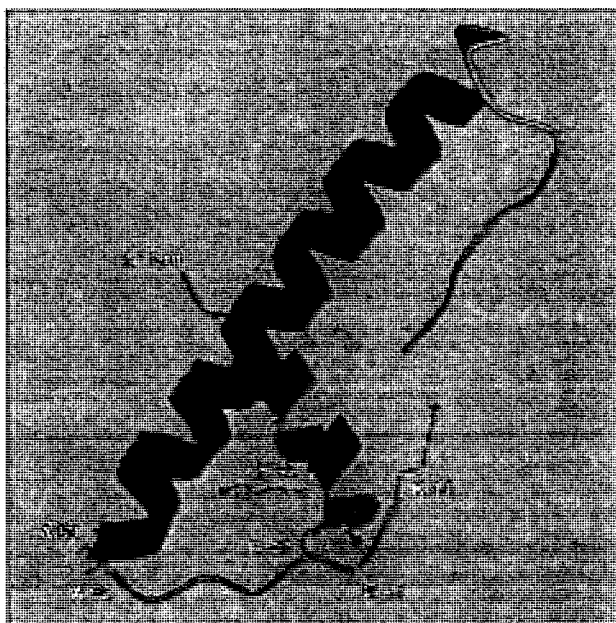


Ilustración 7. Alineamiento de la región amino-terminal de proteasas homólogas de varios organismos. Dentro del cuadro se muestra el fragmento de nueve amino ácidos implicado en el enlace con el receptor. Abajo se muestra la estructura tridimensional de esta región de cruzaina. Los amino ácidos alterados están ubicados en la región comprendida entre ambas hélices.

Un trabajo adicional también importante es el estudio de la acción de los inhibidores prometedores en las diferentes cepas de *T. cruzi* que se conocen, puesto que éstas presentan un alto nivel de polimorfismo. Particularmente, hay interés en las cepas del parásito que afectan a la población nicaragüense. Se realizan esfuerzos encaminados a investigar la eficacia de los fármacos nuevos contra las cepas del parásito existentes en el país.

Agradecimiento

Esta investigación contó con el apoyo de la Organización Mundial de la Salud (grant T16/181/404, ID-9703). El Centro de Biología Molecular de la UCA es financiado por la *Pew Charitable Trusts* (grant PO114SC).

Bibliografía

- EAKIN, A.E.; McGRATH, M.E.; McKERROW, J.H.; FLETTERICK, R.J. y CRAIK, C.S. (1993). "Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*". *J Biol Chem.* Mar 25;268(9):6115-8.
- ENGEL, J.C.; DOYLE, P.S.; PALMER, J.; HSIEH, I.; BAINTON, D.F. y McKERROW, J.H. (1998). "Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*". *J Cell Sci.* Mar;111:597-606.
- HIGUCHI, R.; KRUMMEL, B. y SAIKI, R. K. (1988) *Nucleic Acids Res.* 16, 7351-7367
- HUETE-PEREZ, J.A.; ENGEL, J.C.; BRINEN, L.S.; MOTTRAM, J.C. y McKERROW, J.H. (1999). "Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein Motif". *J Biol Chem.* Jun 4;274(23):16249-56.
- KELLY, J.M.; WARD, H.M.; MILES, M.A. y KENDALL, G. (1992). *Nucleic Acids Res.* 20, 3963-3969.
- McGRATH, M.E.; EAKIN, A.E.; ENGEL J.C.; McKERROW, J.H.; CRAIK, C.S. y FLETTERICK, R.J. (1995). " The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease". *J Mol Biol.* Mar 24;247(2):251-9.
- McKERROW, J.H. (1999). " Development of cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic diseases: insights on safety, target validation, and mechanism of action". *Int J Parasitol.* Jun;29(6):833-7. Review.