

EFFECTO ANTIPARASITARIO DE INHIBIDORES DE CISTEIN PROTEASAS *IN VITRO* E *IN VIVO* EN LA ENFERMEDAD DE CHAGAS EXPERIMENTAL

JUAN C. ENGEL, PATRICIA S. DOYLE, JAMES H. McKERROW

Department of Pathology, University of California and Veterans Administration Medical Center, San Francisco, 94143, USA

Resumen El mal de Chagas, endémico en la mayoría de los países de América, causa una alta morbilidad y mortalidad. Aunque evidencias experimentales y clínicas muestran la importancia de la quimioterapia tanto en la fase aguda como crónica de la enfermedad, el tratamiento de los pacientes se ve limitado por la toxicidad de las drogas disponibles. En esta revisión se describe el diseño, evolución y selección de péptidos miméticos capaces de interrumpir el ciclo intracelular de *T. cruzi* y de curar infecciones experimentales agudas en animales de laboratorio. Los péptido-miméticos inhiben específicamente la actividad enzimática de cruzaina, una cisteín proteasa de *T. cruzi*, y causan alteraciones en el complejo de Golgi y retículo endoplásmico, acumulación de enzima no procesada en cisternas del complejo de Golgi, y disminución de la enzima acumulada en lisosomas. El compuesto más efectivo, N-Pip-F-hF-VS ϕ , cura infecciones letales agudas en animales experimentales. No se observan lesiones miocárdicas, infiltración linfocitaria, o nidos de amastigotes intracelulares en animales tratados con el compuesto. Estudios toxicológicos y farmacocinéticos preliminares indican la ausencia de toxicidad asociada a altas dosis y tratamientos prolongados. Los inhibidores de proteasas podrían constituir en el futuro buenas alternativas quimioterapéuticas para el tratamiento del Chagas agudo y crónico.

Abstract *Trypanocidal effect of cysteine protease inhibitors in vitro and in vivo in experimental Chagas disease.* Endemic in most American countries, Chagas' disease causes high morbidity and mortality. Recent experimental and clinical evidence shows the importance of chemotherapy in both the acute and chronic phases of this disease. However, treatment is yet limited by the toxicity associated to available drugs. This review describes the design, evolution, and selection of dipeptides that interrupt the intracellular cycle of *T. cruzi* and cure acute experimental infections in laboratory animals. Peptide-mimetic inhibitors specifically bind cruzain, a *T. cruzi* cysteine protease. The inhibitors cause alterations in the Golgi complex and ER, accumulation of unprocessed enzyme within Golgi cisternae, and decrease of mature cruzain within lysosomes. The most effective compound, N-Pip-F-hF-VS ϕ , cured an acute lethal infection in experimental animals. Myocardial lesions, lymphocyte infiltration and intracellular amastigote clusters were absent in treated animals. Preliminary toxicology and pharmacokinetic analyses suggest the lack of toxicity associated to high doses and prolonged treatment regimes. Protease inhibitors may soon become good chemotherapeutic alternatives for acute and chronic Chagas' disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, cruzain, cysteine protease inhibitors

Alrededor de 16-18 millones de personas en América están infectadas con *Trypanosoma cruzi* y se calcula que más de 90 millones de residentes de zonas endémicas están expuestos a contraer la infección con el parásito¹. La enfermedad de Chagas se subdivide en dos fases, aguda y crónica. La fase aguda dura alrededor de 90 días y se caracteriza por la presencia de parásitos circulantes. Aunque la miocarditis aguda causa una alta mortalidad, la mayoría de los pacientes muere durante la fase crónica^{2, 4}. La quimioterapia tradicional con nifurtimox y benznidazol es efectiva en alrededor del 60% de los casos y se restringe en general a la fase aguda debido a su

alta toxicidad^{5, 7}. Sin embargo, existen nuevas evidencias experimentales y clínicas que confirman la correlación entre cardiopatía y carga parasitaria en el músculo cardíaco en ambas fases de la enfermedad^{8, 12}. Por ejemplo, el tratamiento de pacientes crónicos con benznidazol trajo una disminución tanto de la cardiopatía como de las alteraciones electrocardiográficas asociadas¹¹. Estos resultados recalcan la importancia de los estudios destinados al desarrollo de nuevas terapéuticas para la enfermedad de Chagas.

Cruzaína (cruzipaina, gp 51/57) es una cisteín proteasa perteneciente a la familia de las catepsinas L.

Abreviaturas:

Descrita inicialmente por Cazzulo y colaboradores¹³, cruzaina es la proteasa más abundante en todos los estadios de *T. cruzi*. Varios grupos científicos en distintos países han caracterizado la enzima a nivel bioquímico, molecular e inmunológico^{13, 21}. Nosotros establecimos estrechas colaboraciones tendientes al desarrollo de quimioterapia para la enfermedad de Chagas basada en la síntesis de inhibidores reversibles e irreversibles específicos contra cruzaina. El diseño de péptidos miméticos (CPI) capaces de bloquear específicamente el sitio activo de la proteasa permitió el desarrollo de inhibidores sumamente efectivos. Los dipéptidos iniciales²⁰ se modificaron *a posteriori* con el propósito de aumentar su afinidad por el sitio catalítico de la enzima y vida media *in vivo*, incrementar la solubilidad en soluciones acuosas y por ende posibilitar su uso en regímenes orales de tratamiento y, finalmente, de minimizar la toxicidad asociada a tratamientos prolongados²¹.

Los CPI se seleccionaron primero en base a resultados obtenidos en ensayos enzimáticos en los que se evaluó la capacidad inhibitoria de la actividad de cruzaina recombinante utilizándose Z-F-R-AMC como sustrato²⁵. Aquellos compuestos efectivos a concentraciones nanomolares, se evaluaron en cultivos de células *in vitro*. A tal efecto, diseñamos un método sencillo que consiste básicamente en irradiar macrófagos de una línea celular para detener su ciclo celular e infectarlos con tripomastigotes de cultivo de la cepa Y de *T. cruzi*, con o sin el agregado de inhibidores a distintas concentraciones en el medio de cultivo. Los cultivos se observan a diario durante 30 días. En estas condiciones, el ciclo intracelular del parásito se completa en 4-5 días en controles no tratados. El grado de efectividad de los compuestos se determina en base a su capacidad de prolongar y/o interrumpir el ciclo intracelular de *T. cruzi*, o sea de impedir la multiplicación intracelular de amastigotes y la liberación de tripomastigotes. Este segundo método de selección permite descartar inhibidores con buena actividad en ensayos enzimáticos que no son efectivos en cultivos de células por diversas razones incluyendo baja solubilidad, toxicidad para la célula huésped y escasa permeabilidad a través de la membrana celular.

Para determinar la acción parasiticida de los CPI, estudiamos a continuación diversos aspectos de las alteraciones inducidas por el tratamiento de epimastigotes y amastigotes intracelulares a nivel celular y ultraestructural^{23, 24}. Mu-F-hF-VS ϕ fue uno de los compuestos más efectivos e indujo la muerte de ambos estadios de *T. cruzi*. El tratamiento del parásito con este inhibidor trajo aparejadas: alteraciones en la morfología del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico, acumulación de precursores enzimáticos no procesados en dilataciones periféricas de las cisternas del complejo de Golgi y, finalmente, disminución en la cantidad de enzima transportada a los lisosomas. Se observó también una marca-

da disminución en la cruzaina expresada en la superficie celular del estadio amastigote²⁴. Para confirmar la internalización de los inhibidores y su interacción con cruzaina en células vivas, se incubaron epimastigotes y amastigotes intracelulares con inhibidor radioactivo. Se detectaron bandas radioactivas en el perfil electroforético consistentes con los M_r descritos para cruzaina que se abolieron específicamente con inhibidor no radioactivo. En resumen, el efecto tripanocida de los CPI se puede atribuir al bloqueo del tráfico normal de proteínas celulares y del proceso de autoactivación de precursores de cruzaina que tiene lugar durante su paso por el complejo de Golgi^{23, 26}. Es importante notar que se observaron alteraciones ultraestructurales similares en amastigotes aislados de músculo cardíaco de ratones infectados con *T. cruzi* y tratados con CPI, lo que sugiere que el mecanismo de acción de los inhibidores en animales es similar al observado *in vitro*²⁴.

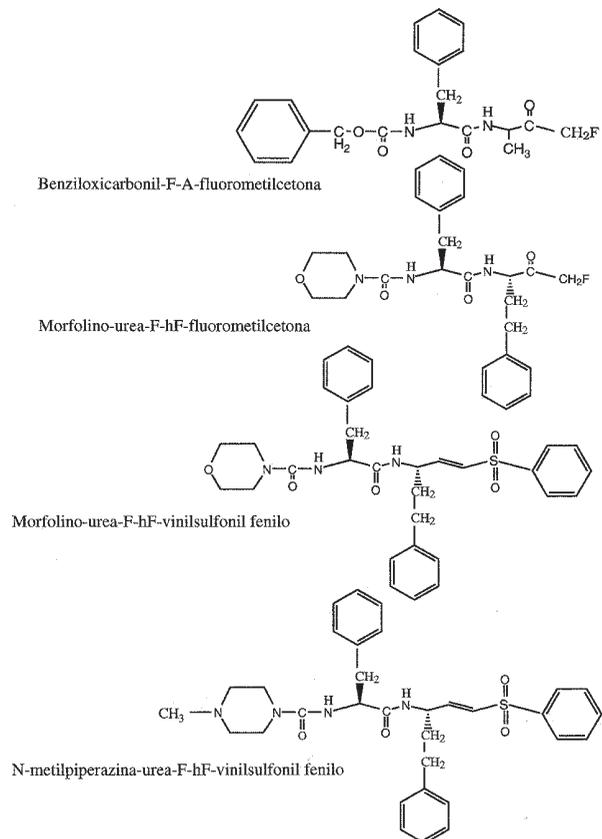


Fig. 1.— Evolución de la estructura química de algunos inhibidores irreversibles de cruzaina. En esta figura se muestra el diseño sucesivo de compuestos a partir de uno de los inhibidores irreversibles de cruzaina. Las modificaciones químicas se introdujeron con la finalidad de incrementar la solubilidad, reducir la toxicidad y, finalmente, aumentar la vida media de los compuestos.

TABLA 1.— Evaluación en un modelo animal del efecto terapéutico de inhibidores irreversibles de cruzaina durante la infección aguda con *Trypanosoma cruzi*

Tratamiento ¹	Estructura	Sobrevida de los animales (días) ²
Control (DMSO)	-	8-10
P34081	Mu-F-hF-FMK	16-18
P35027	Mu-F-hF-OCH	> 24
K11002	Mu-F-hF-VSf	> 180
K11777	N-Pip-F-hF-VSf	240-340 ³

¹ P34081, P35027 se administraron en 2 dosis diarias de 1 mg i.p. durante 12 días. K11777 y K11002 se administraron en 3 dosis diarias de 0.7 y 1 mg i.p., respectivamente, durante 21 días

² En estos experimentos, los ratones C3H se infectaron con 10^5 (controles, P34081 y P35027) y 10^6 (K11777 y K11002) tripomastigotes de la cepa Y de *T. cruzi*

³ Los animales se sacrificaron y evaluaron histopatológicamente

A continuación, evaluamos en animales experimentales aquellos CPI considerados promisorios tanto en ensayos preliminares de actividad enzimática como en cultivo de células²⁴. La evolución en el diseño de algunos inhibidores de cruzaina y su efecto en la supervivencia de animales infectados con 10 y 100 veces la DL_{50} de *T. cruzi* se detallan en la Fig. 1 y Tabla 1. El más efectivo de los compuestos analizados inicialmente durante la fase aguda de la infección en animales infectados con la cepa Y de *T. cruzi* fue Mu-F-hF-VS ϕ . En experimentos posteriores, este inhibidor se sustituyó con el derivado N-Pip-F-hF-VS ϕ diseñado por J. Palmer (Axys Pharmaceuticals, San Francisco, CA) con el objeto de aumentar la solubilidad en soluciones acuosas sin alterar la afinidad por el sitio activo de la enzima. N-Pip-F-hF-VS ϕ curó una infección letal experimental en ratones de laboratorio en dosis de 0.7 mg administrados tres veces al día i.p. (dosis equivalente a 100 mg/kg de peso/día) por un lapso de 21 días (Tabla 1). Los animales tratados no sólo sobrevivieron la infección letal, sino que 6/10 animales sobrevivieron > 340 días post-infección y presentaron cultivos de sangre reiteradamente negativos, mientras que la totalidad de los controles no tratados murió rápidamente²⁴. La ausencia de parásitos en los ratones tratados se confirmó por hibridación con sondas fluorescentes específicas para *T. cruzi* (FISH) (C. Thompson, comunicación personal). La observación histopatológica de varios órganos de animales tratados con N-Pip-F-hF-VS ϕ en dosis de hasta 400 mg/kg peso/día durante lapsos prolongados demostró la ausencia de alteraciones debidas al tratamiento, confirmando la baja toxicidad del compuesto.

Estos resultados se confirmaron recientemente en un modelo animal que reproduce algunas de las características de la fase aguda de la enfermedad de Chagas tales como cardiopatía, esplenomegalia y edema (Fig. 2). Ra-

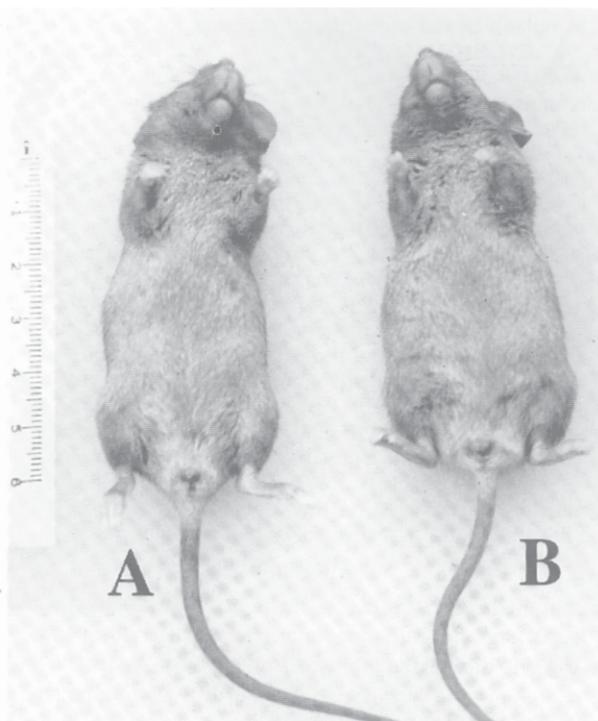


Fig. 2.— Aspecto comparativo de ratones C3H infectados con una dosis letal de *T. cruzi* y tratados o no con CPI. A. Animal tratado por vía intraperitoneal con 0.5 mg de N-Pip-F-hF-VS ϕ dos veces al día durante 21 días. B. El animal no tratado presenta un notorio edema generalizado.

tones C3H infectados con una dosis letal de tripomastigotes del clon CA-1/72 desarrollan la típica cardiopatía chagásica con gran número de parásitos e intensa infiltración (Fig. 3A y 4A) y mueren 25-30 días post-infección. Los animales tratados por vía intra-peritoneal con 0.5 mg de N-Pip-F-hF-VS ϕ dos veces al día (dosis equivalente a 50 mg/kg de peso) durante un total de 21 días no presentan parásitos y sólo se observan pequeñas zonas de cicatrización en el músculo cardíaco (Figs. 3B y 4B) y esquelético. Dichas cicatrices son consecuencia de la infección primaria previa al tratamiento.

En este sentido, cabe mencionar que nuestros estudios preliminares sobre el tratamiento de ratones en fase crónica de infección con N-Pip-F-hF-VS ϕ son también promisorios. Asimismo están en progreso varios estudios paralelos sobre metabolismo y toxicidad en ratas de laboratorio y en perros. En estos últimos, el inhibidor no presenta toxicidad en dosis orales de hasta 1 g/kg de peso.

Los inhibidores de cisteín proteasas son compuestos parasiticidas efectivos aun para parásitos resistentes a la quimioterapia tradicional con nifurtimox y benznidazol, según comprobamos recientemente en tripanosomas resistentes a estas drogas. Inversamente, desarrollamos parásitos resistentes a CPI los que son sensibles a nifurtimox y benznidazol y en los que estamos caracteri-

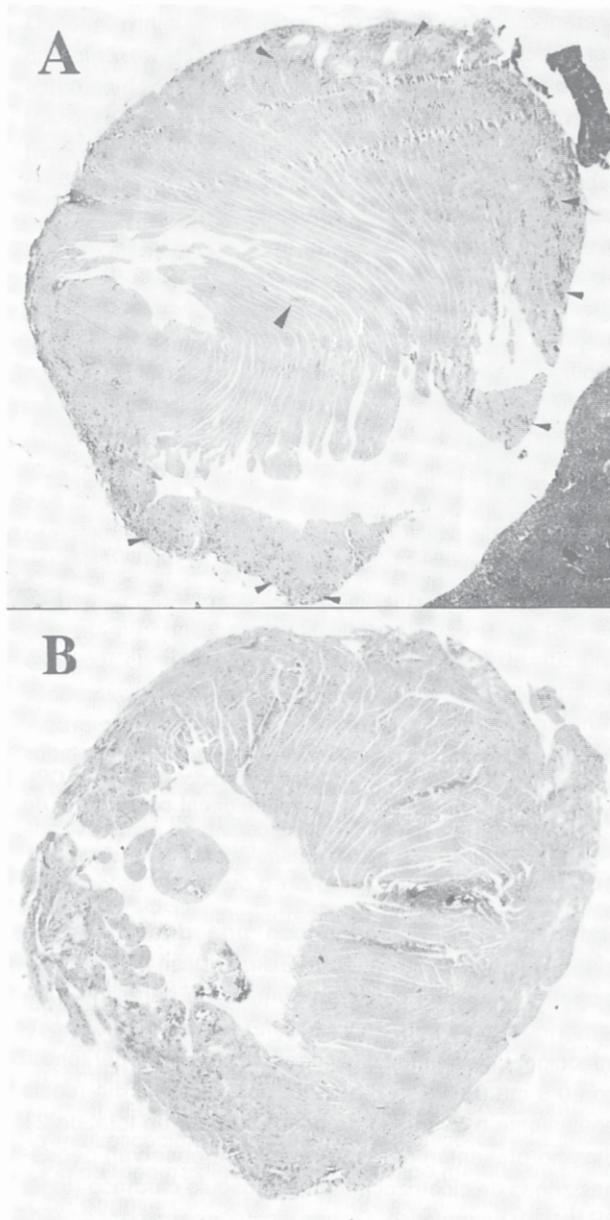


Fig. 3.- Vista general del músculo cardíaco de ratones C3H infectados con una dosis letal de *T. cruzi*. A. Los animales no tratados (controles) presentan una intensa infiltración difusa generalizada (▲). B. En los animales tratados con N-Pip-F-hF-VS ϕ se nota escasa infiltración linfocitaria (Aumento 4X).

zando los mecanismos celulares involucrados en la resistencia a estos compuestos²⁷. En base a estos resultados que sugieren que las drogas serían buena alternativa quimioterapéutica, nuestros grupos de investigación continúan con el diseño y evaluación de nuevos compuestos en búsqueda de inhibidores reversibles e irreversibles de más potencia y especificidad que sean efec-

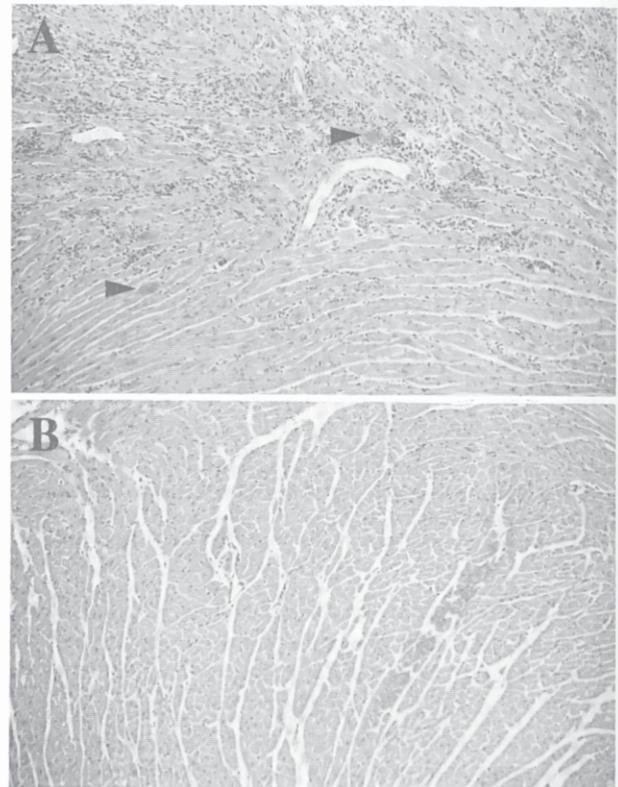


Fig. 4.- Histopatología del músculo cardíaco de ratones tratados con CPI durante la fase aguda de la enfermedad de Chagas. A. En los animales no tratados se destacan numerosos nidos de amastigotes intracelulares (▲) y una intensa infiltración celular. B. Se nota la ausencia de parásitos intracelulares y de infiltración linfocitaria en los animales tratados (Aumento 20X).

tivos para el tratamiento no sólo de la enfermedad de Chagas en sus fases aguda y crónica, sino de parasitosis relacionadas tales como leishmaniasis²⁸, tripanosomiasis africana²⁹, toxoplasmosis (S. Reed, comunicación personal) y malaria³⁰.

Agradecimientos: Los autores agradecen a los Drs. James Palmer (Axys Pharmaceuticals, San Francisco, CA), Mary Zimmerman y Robert Smith (Prototek II, Dublin, CA) que proveyeron los inhibidores de cruzaina utilizados en este trabajo. Se agradece al Dr. Curtis Thompson, University of Alburquerque, NM, quien realizó los estudios de FISH. Esta investigación fue financiada con subsidios de los National Institutes of Health (AI35707-1), de la American Heart Association (N° 93 015 380) y del Academic Senate, University of California, San Francisco. JH McKerrow es Docente en Parasitología de la Organización Burroughs Wellcome.

Bibliografía

- Godal T, Nagera J. Tropical Diseases. In WHO Division of Control in Tropical Diseases, 12-13. World Health Organization; Geneva, Switzerland 1990.

2. The National Foundation of Brazil. Etiological treatment for Chagas' disease. Brasília, Brazil. *Parasitol Today* 1996; 13: 127-8.
3. Parada H, Carrasco HA, Anez N, Inglessis I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int J Cardiology* 1997; 60: 49-54.
4. Chagas C. Chagas Carlos: Coletanea de trabalhos científicos. Editora Universidade de Brasília 1981; 6: 247-58.
5. Filardi LS, Brener Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Trans Royal Soc Trop Med Hyg* 1987; 81: 755-9.
6. Gorla NB, Ledesma OS, Barbieri GP, Larripa IB. Assessment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. *Mutation Research* 1988; 206: 217-20.
7. Kirchhoff LV. American Trypanosomiasis (Chagas' disease)- A tropical disease now in the United States. *New Engl J Med* 1993; 329: 639-44.
8. Andrade SG, Magalhaes JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull WHO* 1985; 63: 721-6.
9. Tarleton RL, Zhang L. Chagas' disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today* 1999; 15: 94-9.
10. Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. *Mem Inst Osw Cruz* 1991; 86: 187-200.
11. Viotti R, Vigliano C, Armenti H, Segura EL. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serological evolution of patients with long-term follow up. *Am Heart J* 1994; 127: 151-62.
12. Sosa Estani S, Segura EL, Ruiz AM, Velazquez E, Porcel BM, Yampotis C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am J Trop med Hyg* 1998; 59: 526-9.
13. Cazzulo JJ, Cazzulo Franke MC, Martínez J, Franke de Cazzulo BM. Some kinetic properties of a cysteine proteinase (cruzipain) from *T. cruzi*. *Biochem Biophys Acta* 1990; 1037: 186-91.
14. Ashall F, Angliker H, Shaw E. Lysis of trypanosomes by peptidyl fluoromethyl ketones. *Biochem Biophys Res Comm* 1990; 170: 923-9.
15. Cazzulo JJ, Stoka V, Turk V. Cruzipain, the major cysteine proteinase from the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. *Biol Chem* 1997; 378: 1-10.
16. Eakin AE, McGrath ME, McKerrow JH, Fletterick RJ, Craik CS. Production of crystallizable cruzain, the major cysteine protease from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1993; 9: 6115-8.
17. Eakin AE, McKerrow JH, Craik CS. A cysteine protease is a target for the enzyme structure-based design of antiparasitic drugs. *Drug Inf J* 1995; 92: 1501S-17S.
18. McGrath ME, Eakin AE, Engel JC, McKerrow JH, Craik CS, Fletterick RJ. The crystal structure of cruzain: A therapeutic target for Chagas' disease. *J Mol Biol* 1995; 247: 251-9.
19. Meirelles MN, Juliano L, Carmona E, Silva SG, Costa EM, Murta ACM, Scharfstein J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/51) impair host cell invasion arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Mol Biochem Parasitol* 1992; 52: 175-84.
20. Harth GN, Andrews N, Mills AA, Engel JC, Smith R, McKerrow JH. Peptide-fluoromethyl ketones arrest intracellular replication and intercellular transmission of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol* 1993; 58: 17-24.
21. McKerrow JH, McGrath ME, Engel JC. The cysteine protease of *Trypanosoma cruzi* as a model for antiparasite drug design. *Paras Today* 1995; 11: 279-82.
22. McKerrow JH, James MNG. Cysteine proteases: Evolution, function and inhibitor design. In: *Perspectives in Drug Discovery and Design* 1996; vol. 6, ESCOM, Leiden
23. Engel JC, Doyle PS, Palmer J, Hsieh I, Bainton DF, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors alter Golgi complex ultrastructure and function in *Trypanosoma cruzi*. *J Cell Sci* 1998; 111: 597-606.
24. Engel JC, Doyle PS, Hsieh I, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors cure an experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med* 188: 725-34.
25. Roush WR, Gwaltney SL II, Chebg J, Scheidt KA, McKerrow JH, Hansel E. Vinyl sulfonate esters and vinylsulfonamides: Potent, irreversible, inhibitors of cysteine proteases. *J Am Chem Soc* 1999; 120: 10994-5.
26. Huete-Pérez JA, Engel JC, Brinen LS, Mottram JC, McKerrow JH. Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif. *J Biol Chem* 1999 (In press)
27. McKerrow JH, Engel JC, Caffrey CR. Cysteine protease inhibitors as chemotherapy for parasitic infections. *Bioorg Med Chem* 1999; 6: 1-6.
28. Seltzer P, Pingel S, Hsieh I, Ugele B, Chan VJ, Engel JC, Russel D, Sakanari JA, McKerrow JH. Cysteine protease inhibitors arrest growth of *Leishmania major* in vitro and in vivo. *Proc Nat Acad Sci* 1999. (Sometime a publicación).
29. Scory S, Caffrey CR, Stierhoff YD, Ruppel A, Steverding D. *Trypanosoma brucei*: killing of blood-stream forms in vitro and in vivo by the cysteine proteinase inhibitor Z-F-A-CHN2. *Exp Parasitol* 1999. (Sometime a publicación).
30. Semenov A, Olson JE, Rosenthal P. Antimalarial synergy of cysteine and aspartic protease inhibitors. *Antimicrob Ag Chemother* 1998; 42: 2254-8.