

Trans-SIALIDASA DE *Trypanosoma cruzi*: UN BLANCO POTENCIAL PARA EL TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS

Dr. Carlos A. Buscaglia

Instituto de Investigaciones Biotecnológicas. Instituto Tecnológico de Chascomús (IIB-INTECH).

Universidad Nacional de General San Martín y Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Enfermedad de Chagas

El parásito protozoario *Trypanosoma cruzi* es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, que afecta a 18 millones de personas en América Latina y constituye un grave problema sanitario y económico.¹ Varias especies de insectos triatomíneos hematófagos actúan como sus vectores de transmisión, siendo el más importante en Argentina el *Triatoma infestans*, conocido vulgarmente como “vinchuca”. La enfermedad comienza con una etapa aguda caracterizada por altos niveles de parasitemia. El tratamiento en esta etapa es efectivo aunque la vaguedad de los síntomas asociados (hepatoesplenomegalia, fiebre, encefalitis, inflamación de nódulos linfáticos, etc.) a menudo dificulta el diagnóstico. La mayoría de los pacientes sobreviven la etapa aguda y progresan hacia una fase subclínica y asintomática (llamada fase indeterminada) en la cual los parásitos son difícilmente detectables en circulación. Al cabo de varios años, un 30% de los pacientes desarrollan lesiones a nivel de miocardio y/o tracto digestivo, características de la fase crónica de la enfermedad.¹ Se han desarrollado algunas drogas para el tratamiento de estos pacientes, tales como el Benznidazol o Nifurtimox² y el D0870.³ Estas drogas, sin embargo, tienen una eficacia limitada y presentan cierta toxicidad.¹ Por último, el debate todavía abierto acerca de un cierto componente autoinmune en el progreso de la fase crónica atenta contra el desarrollo de posibles vacunas.^{4, 5}

La incidencia de nuevos casos ha disminuido notablemente en los últimos años, sobre todo debido al control del insecto vector.¹ Sin embargo, y

Abreviaturas:

GPI, glicosil fosfatidilinositol; ADN, ácido desoxirribonucleico; IPTG, isopropyl β -tiogalactopiranosido; SAPA, shed acute-phase antigen (antígeno secretado de fase aguda).

dado que se trata de una infección crónica, la transmisión puede también ocasionarse por transfusiones sanguíneas y por vía transplacentaria. El desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos y confiables para el rastreo de los bancos de sangre se torna así en una necesidad aún en países no endémicos para esta enfermedad. En este sentido, la irrupción de la *biología molecular* permitió la identificación, clonado y expresión recombinante de antígenos con un gran potencial diagnóstico (*Figura 1*).⁶⁻⁸ Un segundo factor a considerar es que, además del ser humano, una gran variedad de vertebrados domésticos y salvajes pueden también ser parasitados por *T. cruzi* y, por lo tanto, actuar como reservorios de la enfermedad.¹

El desarrollo de métodos de diagnóstico rápidos y confiables para el rastreo de los bancos de sangre se torna así en una necesidad aún en países no endémicos para esta enfermedad.

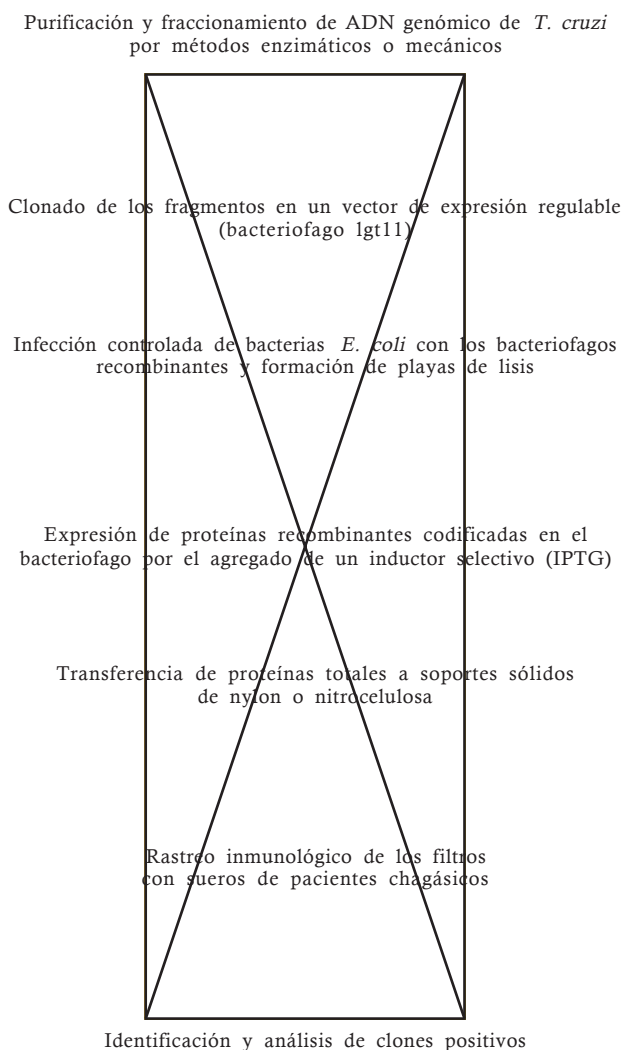
Identificación de moléculas de *T. cruzi* candidatas para quimioterapia: la trans-sialidasa

Una alternativa promisoriosa para el control de la enfermedad de Chagas es el diseño de drogas o reactivos específicamente dirigidos contra el parásito, de manera tal que presenten, a priori, muy bajos o nulos niveles de toxicidad. Para ello, es necesario identificar moléculas que difieran en sus propiedades

estructurales y/o funcionales con las correspondientes del huésped humano o, mejor aún, que sean exclusivas del agente patógeno. Ejemplos de este tipo de moléculas han surgido sobre todo a partir del estudio de ciertas vías metabólicas de *T. cruzi* como ser la biosíntesis de poliaminas y esteroides o la degradación proteica mediada por cisteín proteinasas.^{1, 9}

En nuestro laboratorio se ha identificado y estudiado exhaustivamente uno de estos blancos potenciales: la *trans-sialidasa* (*Figura 2*). Esta molécula se encuentra localizada en la superficie del parásito, unida a la membrana celular por un ancla de glicosil

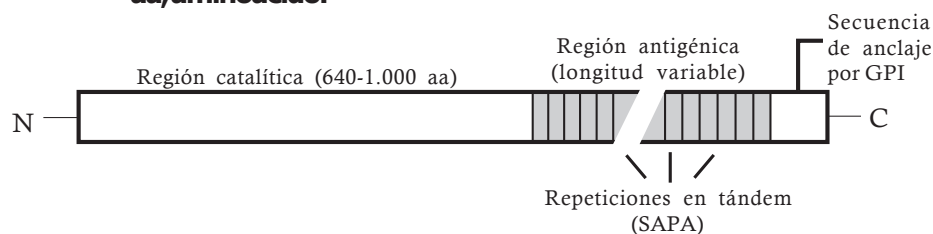
Figura 1: Esquema del protocolo de aislamiento e identificación de secuencias de *T. cruzi* antigénicamente relevantes durante la infección. IPTG, isopropyl- β -tiogalactopiranosido.



fosfatidilinositol (GPI), que promueve su secreción al medio extracelular por acción de fosfolipasas específicas (Figura 2).¹⁰ A diferencia de las neuraminidasas o sialidasas clásicas que hidrolizan los residuos de ácido siálico presentes en glicoproteínas y/o glicolípidos, la *trans*-sialidasa es capaz de catalizar la transferencia de estos residuos de ácido siálico entre glicoconjugados.¹⁰ Los organismos superiores sintetizan este azúcar a partir de precursores simples y, luego de activarlo por conjugación al citidín monofosfato, lo transfieren a sus glicoproteínas y glicolípidos a medida que éstos se producen. *T. cruzi*, en cambio, es genéticamente incapaz de sintetizar este azúcar *de novo*, y por ello utiliza la *trans*-sialidasa para “robar” el producto maduro de los glicoconjugados presentes en el huésped infectado y transferirlo a moléculas aceptoras del tipo mucina en su propia superficie.¹⁰⁻¹² La *trans*-sialidasa, por lo tanto, constituye en sí misma una vía metabólica novedosa, exclusiva de *T. cruzi* y otros parásitos protozoarios relacionados.¹⁰

La captación de ácido siálico confiere al parásito resistencia al ataque por proteínas del complemento¹³ y por anticuerpos con capacidad citolítica.¹² Por otro lado, las mucinas y otras moléculas sialiladas presentes en la superficie del parásito participan directamente en el reconocimiento e invasión de las células del hospedador infectado.¹⁰ Como consecuencia, líneas celulares deficientes en la síntesis de ácido siálico son muy pobremente infectadas por el parásito.¹⁴ Todas estas evidencias sugieren fuertemente que la *trans*-sialidasa constituye una molécula clave en el establecimiento y mantenimiento de la infección por *T. cruzi*. De hecho, la vacunación de animales de experimentación con *trans*-sialidasa (como proteína o como ADN desnudo) o la transferencia pasiva de anticuerpos capaces de neutralizar la actividad enzimática tienen un efecto protector, reduciendo los niveles de parasitemia y mortalidad en ratones.^{15,16} Estos anticuerpos neutralizantes aparecen normalmente en los pacientes Chagásicos al final de la etapa aguda,¹⁷ coincidiendo con el momento de declinación en los niveles de parasitemia, y podrían ser utilizados como un método de diagnóstico sumamente sensible para esta enfermedad.¹⁸

Figura 2: Representación esquemática de la *trans*-sialidasa de *T. cruzi* N y C, extremos amino y carboxilo terminal, respectivamente. aa, aminoácido.



En los últimos años se ha abierto un nuevo e interesante campo de investigación en *trans*-sialidasa: la *inducción de inmunopatologías definidas* en el hospedador infectado. Si bien las bases moleculares no han sido descifradas, experimentos *in vitro* e *in vivo* sugieren que esta molécula *per se* es capaz de inducir hiperga-

mmaglobulinemia y apoptosis de células tímicas, dos fenómenos característicos de la fase aguda de la enfermedad.^{19, 20}

Problemas y posibles soluciones para la inhibición de la *trans*-sialidasa

Como ya se ha mencionado, existen numerosas evidencias experimentales que sugieren que la *trans*-sialidasa constituye un factor de virulencia. Por lo tanto, es esperable suponer que el parásito haya desarrollado estrategias con el propósito de prevenir su neutralización. Por ejemplo, se ha identificado en el genoma de *T. cruzi* una batería compuesta por unos 140 genes que codifican para la *trans*-sialidasa y otras proteínas altamente relacionadas pero enzimáticamente inactivas.²¹ La función de estas últimas proteínas es incierta, aunque podrían expresarse simultáneamente y actuar como una "pantalla de humo", titulando los anticuerpos neutralizantes o bien induciendo un estado de anergia en los linfocitos T reactivos por presentación simultánea de antígenos levemente variables.²² Un segundo grupo de genes compuesto por más de 700 miembros codifica para proteínas con niveles de homología algo menores a la *trans*-sialidasa y que presentan otro tipo de actividades, ya sea como factores de clivaje de proteínas del complemento o ligandos de proteínas y/o azúcares presentes en la matriz extracelular.¹⁰ Esta complejidad genética dificulta la construcción y posterior evaluación de un parásito deficiente en *trans*-sialidasa (noqueado genotípica o fenotípicamente) así como el uso de la *trans*-sialidasa como blanco de una eventual terapia genética.

Como un mecanismo alternativo de autoprotección, la *trans*-sialidasa activa cuenta con un dominio repetitivo altamente inmunogénico en su extremo C-terminal (*Figura 2*).^{23, 24} Este dominio llamado SAPA (por Shed Acute-Phase Antigen) permitió su aislamiento por medio de un rastreo inmunológico (*Figura 1*) y podría participar en la evasión de la respuesta inmune²⁵ y en la diseminación sistémica de la enzima.²⁶ Más recientemente, hemos demostrado la existencia de una red de epitopes B cross-reativos en la *trans*-sialidasa,²⁷ que retrasa específicamente la inducción de anticuerpos neutralizantes en el hospedador infectado.²⁸

Tomando en consideración todo lo expuesto, resulta evidente que la *trans*-sialidasa constituye un atractivo blanco para el desarrollo de inhibidores de posible acción terapéutica. La síntesis de estos inhibidores se está llevando a cabo a través de dos

grandes estrategias: el análisis cristalográfico de la *trans*-sialidasa y otras proteínas relacionadas²⁹ y la obtención de anticuerpos monoclonales. El primero de estos métodos permite visualizar la estructura tridimensional de las moléculas, aportando una invaluable ayuda para la identificación de los aminoácidos expuestos en superficie, el entendimiento de su mecanismo catalítico y, eventualmente, el diseño de inhibidores "a medida". Estos estudios sirvieron, por ejemplo, para el mapeo racional de los determinantes antigénicos de la *trans*-sialidasa²⁷ y para predecir las modificaciones en su secuencia de aminoácidos que bastarían para reprimirle la capacidad de transferasa de ácido siálico, transformándola entonces en una sialidasa convencional.^{29, 30}

Por otro lado, utilizando combinadamente técnicas de biología e inmunología molecular se intentará la producción a gran escala del único inhibidor natural conocido hasta el momento de la *trans*-sialidasa: el anticuerpo neutralizante. La inmortalización de un linfocito productor de este tipo de anticuerpos, obtenido a partir de un animal infectado con *T. cruzi* o inmunizado con la enzima, permitiría disponer de una fuente inagotable de este inhibidor. Estos anticuerpos monoclonales y los inhibidores específicos de la *trans*-sialidasa que puedan desarrollarse (siguiendo las estrategias mencionadas u otras más novedosas), serían de gran utilidad para el estudio, prevención y, eventualmente, para el tratamiento de la enfermedad.

Agradecimientos

El autor agradece al Dr. Alberto C. Frasch (IIB-INTECH) por su lectura crítica del manuscrito.

Bibliografía

1. WHO (1997) World Health Organization. Tropical Disease Research, progress 1995-96, (Geneva).
2. Sgambatti de Andrade AL, Zicker F, de Oliveira RM, et al. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early Trypanosoma cruzi infection. Lancet 1996; 348: 1407-13.
3. Urbina JA, Payares G, Molina J, et al. Cure of short- and long-term experimental Chagas' disease using D0870. Science 1996; 273: 969-71.
4. Tarleton RL, Zhang L. Chagas' disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? Parasitol Today 1999; 15:94-9.
5. Kierszenbaum F. Chagas' disease and the auto-immune hypothesis. Clin Microbiol Rev 1999; 12: 210-23.

Los anticuerpos monoclonales y los inhibidores específicos de la *trans*-sialidasa que puedan desarrollarse serían de gran utilidad para el estudio, prevención y, eventualmente, para el tratamiento de la enfermedad.

6. Reyes MB, Lorca M, Muñoz P, Frasch ACC. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. Proc Natl Acad Sci USA 1990; 8: 2846-50.
7. da Silveira JF, Umezawa ES, Luquetti AO. Chagas' disease: recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens for serological diagnosis. Trends Parasitol 2001; 17: 286-91.
8. Di Noia JM, Buscaglia CA, De Marchi CR, et al. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecule provides the first immunological evidence that Chagas' disease is due to a single parasite lineage. J Exp Med 2002; 195:401-13.
9. Docampo R. Recent developments in the chemotherapy of Chagas' disease. Curr Pharm Des 2001; 7: 1157-64.
10. Frasch AC. Functional diversity in the trans-sialidase and mucin families in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Today 2000; 16:282-6.
11. Schenkman S, Ferguson MA, Heise N, et al. Mucin-like glycoproteins linked to the membrane by glycosylphosphatidylinositol anchor are the major acceptors of sialic acid in a reaction catalyzed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol 1993; 59:293-303.
12. Pereira-Chiocola VL, Acosta-Serrano A, Correia de Almeida I, et al. Mucin-like molecules form a negatively charged coat that protects *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes from killing by human anti-alpha-galactosyl antibodies. J Cell Sci 2000; 113:1299-307.
13. Norris KA, Bradt B, Cooper NR, So M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. J Immunol 1991; 147:2240-7.
14. Schenkman RP, Vandekerckhove F, Schenkman S. Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun 1993; 61:898-902.
15. Franchin G, Pereira-Chiocola VL, Schenkman S, Rodrigues MM. Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. Infect Immun 1997; 65: 2548-54.
16. Pereira-Chiocola VL, Costa F, Ribeiro M, et al. Comparison of antibody and protective immune responses against *Trypanosoma cruzi* infection elicited by immunization with a parasite antigen delivered as naked DNA or recombinant protein. Parasite Immunol 1999; 21:103-10.
17. Leguizamón MS, Campetella O, Russomando G, et al. Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections. J Infect Dis 1994; 170:1570-4.
18. Leguizamón MS, Russomando G, Rojas de Arias A, et al. Use of trans-sialidase inhibition assay in a population serologically negative for *Trypanosoma cruzi* but at a high risk of infection. Clin Diagn Lab Immunol 1998; 5:254-5.
19. Leguizamón MS, Mocetti E, Garcia Rivello H, et al. Trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* induces apoptosis in cells from the immune system in vivo. J Infect Dis 1999; 180:1398-402.
20. Gao W, Pereira MA. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase potentiates T cell activation through antigen-presenting cells: role of IL-6 and Bruton's tyrosine kinase. Eur J Immunol 2001; 31:1503-12.
21. Cremona ML, Campetella O, Sánchez DO, Frasch ACC. Enzymatically inactive members of the trans-sialidase family from *Trypanosoma cruzi* display beta-galactose binding activity. Glycobiology 1999; 9:581-7.
22. Millar AE, Wlekinski-Lee M, Kahn SJ. The surface protein superfamily of *Trypanosoma cruzi* stimulates a polarized Th1 response that becomes anergic. J Immunol 1999; 162:6092-9.
23. Affranchino JL, Ibáñez CF, Luquetti AO, et al. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. Mol Biochem Parasitol 1989; 34:221-8.
24. Alvarez P, Leguizamón MS, Buscaglia CA, Pitcovsky TA, Campetella O. Multiple overlapping epitopes in the repetitive unit of the shed acute-phase antigen from *Trypanosoma cruzi* enhance its immunogenic properties. Infect Immun 2001; 69:7946-9.
25. Buscaglia CA, Campetella O, Leguizamón MS, Frasch AC. The repetitive domain of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase enhances the immune response against the catalytic domain. J Infect Dis 1998; 177: 431-6.
26. Buscaglia CA, Alfonso J, Campetella O, Frasch AC. Tandem amino acid repeats from *Trypanosoma cruzi* shed antigens increase the half-life of proteins in blood. Blood 1999; 93:2025-2032.
27. Pitcovsky TA, Mucci JS, Alvarez P, et al. Epitope mapping of trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi* reveals the presence of several cross-reactive determinants. Infect Immun 2001; 69:1869-75.
28. Pitcovsky TA, Buscaglia CA, Mucci JS, Campetella O. A functional network of cross-reactive epitopes delays the in vivo immune neutralization of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase (manuscrito enviado a publicación).
29. Buschiazzi A, Tavares GA, Campetella O, et al. Structural basis of sialyltransferase activity in trypanosomal sialidases. Embo J 2000; 19:16-24.
30. Ribeiro M, Pereira-Chiocola VL, Eichinger D, et al. Temperature differences for trans-glycosylation and hydrolysis reaction reveal an acceptor binding site in the catalytic mechanism of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. Glycobiology 1997; 7:1237-46.