



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

“ESTUDIO DEL EFECTO PROTECTOR DE
LA TRIOSAFOSFATO ISOMERASA (TIM)
RECOMBINANTE DE *TRYPANOSOMA*
CRUZI EN RATONES INFECTADOS CON
EL PARÁSITO”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
MÉDICA VETERINARIA Y ZOOTECNISTA

PRESENTA:

SHENDEL GONZÁLEZ SÁNCHEZ

ASESORES:

DR. RUY PÉREZ MONTFORT

M.C. EDGAR ALFONSECA SILVA



MÉXICO D.F.

2007



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

AGRADECIMIENTOS:
Al Dr. Ruy Pérez Montfort

Muchas gracias por guiarme y apoyarme estos meses, por haberme aceptado en su laboratorio, por su paciencia, lo admiro y respeto.

Al MVZ. Edgar Alfonseca Silva.

Muchas gracias por aceptar ser mi asesor, por tu confianza, paciencia, amistad y por haber sido mi maestro y guía, te admiro y quiero mucho.

Por su apoyo técnico en la realización de esta tesis

Del Instituto de Fisiología Celular

Biol. Nayelli Cabrera, MC. Itzhel García, MC. Alma Escalona, MC. Miguel Beltran, Marilut, Enrique, Alejandro, Javier, Raúl y Angélica.

De la Unidad de Medicina Experimental.

Laboratorio de Inmunoparasitología

Dra. Ingebor Becker F., Dr. Miriam Berzunza, QFB José Delgado, MC. Adriana Ruiz, MC. Roseli Cervantes.

Bioterio

Sr. Ricardo Vargas, MVZ Daniel Sánchez, Técnicos Omar López y Carlos Salazar.

DEDICATORIAS:

A Dios:

A mi padre santísimo y maestro Jesús por darme siempre la luz y la fuerza para seguir adelante, por luchar cada día conmigo, por ser mi faro cuando todo es tan hosco , por ser mi fuente de inspiración por permitirme haber nacido en el lugar y momento preciso, por hacerme tan feliz, porque cuando no encuentro el camino siempre me orientas y guías, por todo el amor que enseñas al ver la alborada de un día mas de esperanza, por que jamás tendría palabras para agradecer lo que soy y seré por tantas y tantas bendiciones que me das TE AMO padre.

A mi Má:

Por siempre ser mi má, por enseñarme que la vida se forja a base de esfuerzo y lucha, porque eres una gran mujer que me inspira y da confianza, por hacerme crecer a pasos agigantados, por enseñarme a ser fuerte ante la adversidades, porque tu nunca te vences, por reír, llorar, vivir y sentir conmigo porque tu siempre estas en mi corazón y nunca te olvido, porque sin ti no sería la mujer que soy te lo agradezco mamita. TE AMO.

A Mí Papá:

Por enseñarme que la perseverancia y el trabajo te lleva mas allá de tus sueños, porque aunque no te llamé, siempre estas ahí cuando te necesito, por brindarme tu cariño y respeto por los demás, por enseñarme a compartir las alegrías con quienes amas. Porque tienes muchas virtudes que nunca te digo más sin embargo las veo en cada acción que tienes conmigo y los demás, gracias papá Abu. TE AMO.

A mi hermana Nazh:

Por ser mi hermana y mamá pollita, por darme de comer, cuidarme, guiarme y enseñarme la vida, porque a pesar del diluvio siempre nos tenemos, porque eres una guerrera invencible y gracias a ti yo lo soy, porque me apoyas en mis decisiones acertadas y me corriges en las erróneas, porque siempre compartimos nuestros sueños, por el amor y la admiración que te tengo gracias huesito. TE AMO.

A mi esposo Juanito:

Por darme el regalo mas maravilloso que jamás imagine tener, por compartir alegrías y tristezas por reír y enseñarme parte de la vida a tu lado, porque siempre que te necesite ahí estuviste, porque aunque las situaciones de nuestras vidas no hayan sido perfectas, para mí tu eres lo que mas se asemeja a la perfección corazón, por haber sido y ser el amor de mi vida, porque todo lo que viví a tu lado no lo cambio, por tantas alegrías que me disté te lo agradezco infinitamente, porque aunque no lo creas te admiro, te respeto y TE AMO, porque tu eres lo que siempre busque y jamás encontré, por tantos y tantos consejos, por haber llegado a mi vida, te lo agradezco que Dios te bendiga corazón. TE AMO.

A mi hijo(a) Ti:

Porque aun si conocerte ya TE AMO, porque eres lo que mas deseo en este mundo, porque le he rogado a Dios por tu llegada, porque cuando estoy triste tu me consuelas y me das el valor para seguir adelante, porque sueño con estar contigo y nunca dejarte, porque gracias a ti mi mundo es eternamente pleno, porque tu haces que el mis días tengan sentido, porque tu eres en este momento la personita mas importante en vida, por tu amor inmenso te espero y deseo que esto que hoy he logrado, sea poco comparado con lo que tu harás, gracias. TE AMA tu mamá.

A mi hermano Dan:

Por ser mi hermano y amigo, por compartir alegrías, tristezas y sueños conmigo, por ser mi confidente, por ser tan maduro, por enseñarme que en la vida se logra todo lo que uno desea, con fuerza de voluntad, por ser tan grandioso, por tus regaños y enojos, que me hacen crecer, por tu tenacidad para resolver todo lo que parece imposible, por ser el guerrero admirable, por ser el hombre que toda mujer soñaría tener gracias frijolito. TE AMO.

A mis hermanas Yolanda y Katia

Por llegar a mi vida, espero que todos sus sueños, se hagan realidad como los míos, y ser un buen ejemplo, logrando llegar mas lejos que yo, LAS QUIERO MUCHO hermanitas gracias.

Abis y Agüelo

A mi Abis por ser el ángel mas maravilloso que he conocido en este mundo, por ser tan buena y comprensiva con todos, porque eres para mí lo mas cercano a la mujer perfecta te admiró quiero y respeto, eres una fuente de inspiración grandiosa, por ser el roble que formo y sostiene a esta hermosa familia, gracias. TE AMO.

A mi Agüelo por enseñarme a hacer las cosa bien, porque eres un hombre trabajador y un consejero excepcional porque aunque seas regañón te quiero pues es tu forma de mostrar el gran amor que tienes por todos, por regalarme alegrías inmensas en tus platicas, gracias. TE AMO.

A mis Tíos

Patricia, Francisco, Mónica, Virginia, Gustavo, Elizabeth, Malú, Ricardo, Mosita, Laurita, Felipe, Mauricio, Guadalupe, Rosa y Polo.

Por ser como mis padres, porque gracias a sus, regaños, experiencias y consejos que día a día me han dado, soy esta mujer que espero algún día estén orgullosos de mí pues cada uno me ha dejado lo mejor, por su apoyo y amor, gracias. LOS AMO.

A mis primos

Mariana, Wendy, Felipe, Daiana, Gus, Japo, Roxana, Zac, Caritos, Abril, Karen, Nicté, Nan, Brenda, Christopher, Shantalín, Lesly, José Luis, Aloha, Diana, Vania, Moni, Danita y Mauricio.

A la sociedad primate por compartir alegrías, sueños, tristezas y momentos inolvidables, los quiero y aprecio nuestros momentos juntos, por ser buenos y tremendos, porque esto que hoy logré, lo puedan vivir, pues es una experiencia muy gratificante, porque cuando deseamos algo con todo nuestro corazón, movemos montañas, mundo y universo, para que sea así, los sueños se logran amigos.

A la familia Martínez Chavarría.

A los Sr. Juan y Edith, a Oswy, Eder y Faty pink, por brindarme las puertas de su casa y por compartir momentos buenos a mi lado, siempre se los agradeceré.

A Ernesto Rodríguez

Gracias por tus consejos, apoyo, amistad y tiempo. Te Quiero.

A mis amigos

Los licenciados en derecho

Edwyn, Eliab, Modesto, Oscar, Paolo, Miguel, Nayeli, Nestor y Marko.

Los Médicos Veterinarios y Zootecnistas

Pedro, Luís, Juan Luís (el tigre), Agustín, Mauricio, Javier, Héctor, Angeles, Guadalupe, Perla, Tanya, Gilberto (Chagas), Sinhue, Julio, Omar, Alfredo, Oscar, Marco Antonio, Gabriela, Blanca, Venegas, Daniel, Ricardo(el jefe), Armando.

Los de la Unidad y Prepa

Pathy, Alejandro Hipólito, Ali, José Manuel, Sergio, Charly, Emilio, Darwin.

A la memoria de mis queridos amigos

+Jorge Francisco Pino Hermosillo.

+Gerardo Gabriel Yopis Areas.

+Erandi Zelmar Luna Pérez.

A mis mejores amigos que nunca me han abandonado y siempre me han regalado momentos gratos y que sin ellos esta hermosa profesión no tendría sentido los AMO gracias amiguitos: Tulum, canela, tortugo, goliatin, yoyo, yoya, oso, kiara, chiquita, rito y aquellos que han tenido que sacrificar sus vidas con el fin de buscar un mundo mejor, gracias.

A todos los que no mencione y estuvieron a mi lado, gracias por su apoyo.

I INDICE

I	Índice	1
II	Abreviaturas	2
1.0	Resumen	3
2.0	Introducción	4
2.1	Ciclo de vida del <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
2.2	Importancia clínica	5
2.2.1	Epidemiología y Distribución	5
2.2.2	La importancia de la enfermedad de chagas en veterinaria	6
2.2.3	Signos clínicos	7
2.2.4	Lesiones	9
2.2.5	Diagnóstico	9
2.2.6	Tratamiento	10
2.2.7	Fármacos inhibidores de la ruta metabólica	10
2.3	Metabolismo energético del <i>Trypanosoma cruzi</i>	11
2.4	Otros modelos utilizados para crear un fármaco antiparasitario	15
2.5	La TIM como blanco para el diseño de inmunógenos capaces de inhibir su ruta metabólica.	17
2.6	Características de la triosafosfato isomerasa.	18
2.7	Características estructurales de la triosafosfato isomerasa	18
2.8	La TIM como inmunógeno	19
3.0	Hipótesis y objetivo	21
3.1	Hipótesis	21
3.2	Objetivo General	21
3.3	Objetivos Específicos	21
4.0	Material y Método	22
4.1	Purificación de la enzima TIMTc	22
4.2	Uso de los ratones para experimentación	23
4.3	Sangrado de los ratones para la detección de anticuerpos	23
4.4	Cuantificación de <i>Trypanosoma cruzi</i> .	24
4.5	Dosis de infección	24
4.6	Diseño experimental	24
4.7	Análisis estadístico	26
5.0	Resultados	27
5.1	Purificación de laTIMTc	27
5.2	Sangrado supramandibular y colección suero	28
5.3	Cuantificación de tripomastigotes del <i>Trypanosoma cruzi</i> y promedios de sobrevivencia	28
6.0	Discusión	33
7.0	Bibliografía	35

II ABREVIATURAS

OMS	Organización Mundial de la Salud
3PGA	3-Fosfoglicerato
ATP	Adenosin trifosfato
BSPGI	Glucosa-6-fosfato isomerasa de <i>Bacillus s.</i>
DHAP	Dihidroxiacetona-3-fosfato
DTT	Ditiotreitol
ELISA	Prueba de inmunoensayo con enzimas asociadas
F.C.	Fijación del Complemento
F6P	Fructosa-6-fosfato
G3P	Gliceraldehído-3-fosfato
GAPDH	Glicerol-3-fosfotadeshidrogenasa
HK	Hexocinasa
I.P.	Intraperitoneal
IPTG	isopropil β -D-tiogalactopiranosido
LB	Medio Luria Bertani
NAD	Nicotin Adenin Dinucleótido
NNN	Medio de Novy, McNeal, Nicolle
PBS	Amortiguador de Fosfatos Salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PFK	Fosfofructocinasa
PGI	Glucosa-6-fosfato isomerasa
PGK	Fosfoglicerato cinasa
PK	Piruvato cinasa
RMPGI	Glucosa-6-fosfato isomerasa de conejo
S.C.	Subcutaneo
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante
Tc	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TIM	Triosafofosfato isomerasa
TIMTc	Triosafofosfato isomerasa del <i>Trypanosoma cruzi</i>
YPGI	Glucosa-6-fosfato isomerasa de levadura
ACF	Adyuvante Completo de Freund
AIF	Adyuvante Incompleto de Freund

1. RESUMEN

La enfermedad de Chagas es causada por el parásito *Trypanosoma cruzi* el cual afecta a humanos, mamíferos domésticos y silvestres, en México es un problema de salud pública y se esta en busca de candidatos para ser usados como inmunógenos. La triosafosfato isomerasa (TIM) es una enzima glucolítica que cataliza la interconversión entre la dihidroxiacetona-3-fosfato y el gliceraldehído-3-fosfato. La TIM ha sido utilizada como inmunógeno, ya que no presenta una reacción cruzada entre diferentes especies. Se utilizó como inmunógeno la enzima recombinante triosafosfato isomerasa del *Trypanosoma cruzi* (TIMTc), con el objetivo de proteger a los ratones Balb/c contra la infección del parásito. Se estudió una muestra de 38 ratones machos Balb/c de 7 semanas, los cuales, se dividieron en cuatro grupos. El grupo 1 (PBS) y 2 (PBS y adyuvante completo de Freund (ACF) más adyuvante incompleto de Freund (AIF) fueron los grupos testigo negativo. El grupo 3 (PBS y ACF, AIF más 50 µg de TIMTc) y 4 (PBS y ACF, AIF más 100 µg de TIMTc) fueron los grupos experimentales. Todos los grupos fueron sangrados al día 0 para demostrar la ausencia de anticuerpos anti-TIMTc. Se les administró 100 µl totales de cada tratamiento en tres ocasiones con intervalos de siete días, con el fin de inducir la respuesta inmune y disminuir la parasitemia por *Trypanosoma cruzi*. El desafío se hizo, a los 21 días posteriores a la primera inmunización, con una dosis de 1×10^6 *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro. Ese día se obtuvo suero para demostrar la presencia de anticuerpos antiTIMTc en aquellos ratones que fueron desafiados.

Los datos se analizaron, con las pruebas de Wilcoxon y Kaplan Meier para comparar y graficar la sobrevivencia entre los grupos. Se encontró diferencia significativa en los promedios de sobrevivencia entre los grupos 2 y 4 ($p=0.03$). La inmunización con 100 µg de la enzima TIMTc generó protección en el grupo de experimentación. Este trabajo también indica que la TIMTc podría ser candidato para el desarrollo de una vacuna. La

utilización deTIMTc como inmunógeno pudiera apoyar a mejorar la eficacia de otros tipos de terapias en la enfermedad producida por *Trypanosoma cruzi* en mamíferos domésticos y silvestres.

2. INTRODUCCIÓN

La enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana es causada por un parásito llamado *Trypanosoma cruzi* el cual afecta a humanos, a 23 mamíferos domésticos y silvestres (1). Según la OMS existen 20 millones de personas infectadas en América Latina y anualmente se presentan 800 mil nuevos casos de esta parasitosis, existe una pérdida anual per capita de \$2,966 dólares americanos (2). Esta enfermedad se transmite por chinches del género *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus*, la mas común en México es *Triatoma infestans* conocida como “la chinche besucona”.

2.1 Ciclo de vida del *Trypanosoma cruzi*

El vector se infecta con el tripomastigote en el momento de ingerir sangre del huésped infectado, al pasar el *Trypanosoma cruzi* por el intestino se multiplica por fisión binaria formando epimastigotes, hasta llegar a la ámpula rectal. Después se transforma en tripanosoma metacíclico saliendo en las heces del triatómido las cuales pueden penetrar por las mucosas o por la piel del huésped. Las chinches defecan mientras se alimentan pero, cabe mencionar que, tardan de 6 a 15 días en hacer digestión, el excremento de la chinche produce prurito y mediante el rascado, favorece la infección y penetración del tripanosoma metacíclico. Las heridas o alteraciones dérmicas producidas al rascarse provocan una vasculitis y permeabilidad capilar, permitiendo de esta manera la entrada del parásito al tejido conectivo subcutáneo. El *Trypanosoma cruzi* viaja en el interior de monocitos por torrente circulatorio y tiene una gran afinidad hacia miocitos, fibras musculares, y otras células como la neuroglia. Una vez en el interior de las células, el parásito cambia a una morfología redonda denominada

amastigote en la cual puede multiplicarse por fisión binaria longitudinal, destruyendo las células y liberando los tripomastigotes (3, 4). Figura 1



Figura 1 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*. Incluye a un insecto vector y a varios vertebrados como hospederos. Tomada del comité de expertos de la OMS.

2.2 Importancia clínica

2.2.1 Epidemiología y Distribución

La infección humana es común en Centroamérica y Sudamérica, aunque también se han visto casos en la zona sur de Estados Unidos de Norteamérica. La frecuencia varía dependiendo de las condiciones socioeconómicas en las cuales viven las personas y el lugar donde se encuentren estas (3, 4).

En México, esta enfermedad es un problema de salud pública que afecta a 11 estados; en los últimos años se ha estimado que tiene una prevalencia del 1% (5). En la historia natural de esta enfermedad, uno de los eslabones que permite establecer las medidas de control y vigilancia epidemiológicos es, sin duda, el estudio de los

triatómidos transmisores y de los factores determinantes para considerarlos vectores efectivos.

Existen registros en el país de 23 géneros como huéspedes intermediarios, incluyendo el género *Triatoma*, de los cuales 15 se han encontrado infectados con *Trypanosoma cruzi* se mencionan algunos:

<i>Dipetalogaster maxima</i>	<i>Belminus costarricensis</i>
<i>Paratriatoma hirsuta</i>	<i>Triatoma barberi</i>
<i>Eratyrus cuspidatus</i>	<i>Triatoma dimidiata</i>
<i>Panstrongylus rufotuberculatus</i>	<i>Triatoma pallidipennis</i>
<i>Rhodnius prolixus</i>	<i>Triatoma infestans</i>

2.2.2 La importancia de la enfermedad de Chagas en veterinaria

La importancia de la enfermedad de Chagas en veterinaria es relevante pues la infección natural se ha encontrado en más de 100 especies de mamíferos, tanto domésticos como silvestres, varias especies animales sirven de reservorios en diferentes situaciones ecológicas. Esta enfermedad representa un problema de Salud Pública en México al ser una zoonosis. Entre los animales domésticos, el perro y el gato son huéspedes comunes e importantes del parásito. En varias localidades de Brasil y Argentina, mediante xenodiagnóstico se han encontrado tasas de infección en perros y gatos de más del 20%. En Venezuela, 70 a 140 perros examinados resultaron con xenodiagnóstico positivo. Las altas tasas en gatos se podrían explicar por las grandes poblaciones de ratones domésticos infectados, que adquirirían la infección por vía oral al cazar y alimentarse con estos roedores. Además, los gatos y ratones y muchos otros mamíferos con frecuencia ingieren triatomíneos. En un estudio en Chile, se encontraron

anticuerpos contra *Trypanosoma cruzi* en 7.8 % de 232 caprinos examinados. En Bolivia el cobayo *Cavia porcellus*, tiene una tasa de infección que varía entre 10.5 y 61%. La infección natural se ha comprobado en gran número de especies de animales silvestres. Si bien prácticamente todo mamífero en contacto con vectores infectados puede adquirir la infección, no todas las especies animales tienen la misma importancia en el mantenimiento de la enfermedad de Chagas. En los estudios realizados en Brasil, Venezuela y otros países de Latinoamérica se asigna un papel esencial a las zarigüeyas del género *Didelphys* (*D. marsupialis*, *D. albiventris*) y a los armadillos. Se observaron fluctuaciones estacionales, con un aumento de la tasa de infección a fines de la temporada de lluvia, y llegó a infectarse más del 80% de la población de zarigüeyas. Esta especie, tiene importancia por su tendencia a acercarse a las viviendas humanas, de modo que sirven de enlace entre el ciclo silvestre y el doméstico de la infección por *T. cruzi*. Mediante el xenodiagnóstico realizado en 750 mamíferos de 31 especies de los bosques tropicales secos en los llanos altos de Venezuela, se obtuvo resultado positivo en 10 especies. En México la enfermedad de Chagas se presenta esencialmente en el sur, siendo limitado el diagnóstico en los animales (41).

2.2.3 Signos Clínicos

En los animales silvestres la infección transcurre en forma clínicamente inaparente. En el perro, en cambio, es a veces sintomática, similar a la del hombre, y puede observarse una forma aguda y una crónica. La fase aguda, se presenta después de 5 a 42 días de incubación, se manifiesta por fiebre moderada, con o sin edema palpebral, hepatomegalia pronunciada, diversas adenopatías, perturbaciones cardíacas y alteraciones nerviosas. La forma aguda dura de 10 a 30 días o más, y pasa luego a la

forma indeterminada, que puede prolongarse durante años sin manifestaciones clínicas. En perros se ha reproducido de modo experimental las cardiopatías, megalovisceras y alteraciones del sistema nervioso central, en cachorros a dosis infectantes mueren en 2 a 3 semanas, con un cuadro agudo de la enfermedad en el que destaca la insuficiencia cardíaca.

Los signos clínicos en el humano se dividen en: agudos, subagudos y crónicos. En la fase aguda y subaguda puede estar presente un signo típico conocido como chagoma. Esta es una inflamación localizada producida por una reacción de hipersensibilidad tipo III inducida por un antígeno del parásito. La piel eritematosa puede llegar a ulcerarse y aparecer dolor en los linfonódulos cercanos a esa zona. El paciente presenta prurito, edema unilateral, síndrome febril, con un intervalo de 9 días, y convulsiones. El periodo de esta fase es de 30 a 60 días (3, 4,5).

En la fase crónica hay fiebre alternando con apirexia, hematuria, ictericia, edemas, caquexia, caída de pelo, petequias en mucosas, proteinuria, ataxia, apatía, somnolencia, estupor, convulsión, pérdida de la visión, fotofobia y crisis nerviosa. El tiempo de duración de esta fase es de 15 a 30 años (3, 4,5).

2.2.4 Lesiones

Las lesiones agudas cardíacas se producen por la invasión directa a células miocárdicas por el parásito con dilatación e insuficiencia cardíaca progresivas, adenopatías generalizadas, hepatomegalia y esplenomegalia. La necrosis focal de las células miocárdicas se acompaña de un denso infiltrado inflamatorio intersticial agudo, que se extiende por todo el miocardio, y es frecuente la dilatación de las cuatro cámaras cardíacas en las zonas de invasión.

Las lesiones crónicas cursan con ascitis, hidrotórax, hidropericardio, edema pulmonar, hemorragias y petequias. Estas lesiones incluyen a: órganos, mucosas y serosas; además hay necrosis en miocitos, opacidad corneal y conjuntivitis purulenta. Al final de la enfermedad algunas células nerviosas se destruyen, debido a la acción de la citotoxinas y citolisinas que se liberan cuando los amastigotes se encuentran en nódulos linfáticos (3, 5).

2.2.5 Diagnóstico

En fase aguda el tripanosoma se puede observar en sangre mediante un frotis. En casos crónicos por medio del xenodiagnóstico, en el cual un insecto libre de patógenos, criado en el laboratorio, se lleva a succionar sangre de un paciente. El contenido del intestino del insecto se examina después en busca de la presencia del patógeno. Otro método de diagnóstico directo es mediante cultivo de *Trypanosoma cruzi* a partir de sangre, para posteriormente ser cultivado en medio Novy, McNeal, Nicolle (NNN), y, por último, se puede probar la presencia del parásito mediante la inoculación a animales de laboratorio (3). El diagnóstico indirecto y más utilizado es el serológico, con las siguientes pruebas: ELISA, FC, aglutinación directa y hemoaglutinación (4). Actualmente existen técnicas de diagnóstico molecular como la prueba de reacción en

cadena de la polimerasa (PCR) que detecta y amplifica un fragmento de ADN del parásito (5).

2.2.6 Tratamiento

Los fármacos utilizados contra protozoarios son: nifurtimox, cuya dosis es de 8 a 10 mg/kg diario, en niños es de 15 a 20 mg/día por vía oral, dividido en 4 dosis al día, y debe mantenerse durante 90 a 120 días, en el perro 2-7 mg/kg. VO, cada 6 horas durante 3-5 meses, Un segundo fármaco es el benznidazol, su dosis en la fase crónica de la enfermedad es de 5mg/kg al día durante 60 días, en perros 5 mg/kg, VO, cada 24 horas durante más de 2 meses (4,5,6,7,40).

2.2.7 Fármacos inhibidores de la ruta metabólica

Para el control del *Trypanosoma cruzi* se requieren medidas como realizar programas de control y erradicación del vector, aunque esto tiene un costo elevado. Esta enfermedad se distribuye en la población en base al nivel socioeconómico y localización geográfica afectando a países en vías de desarrollo. En una considerable parte del territorio de estos países los principales materiales de construcción son: adobe, madera, o paja, las cuales facilitan la formación de grietas en donde se albergan estos insectos, aunado a esto, la convivencia estrecha de los animales domésticos es común. En la República Mexicana se considera como área endémica probable todo el territorio que se encuentra entre los 0 y los 2,200 metros sobre el nivel del mar, es decir, las dos terceras partes del territorio. Se han reportado casos de Chagas en los estados de Oaxaca, Chiapas, Jalisco, Michoacán, Guerrero, Zacatecas, Yucatán, Veracruz, Estado de México, Sonora, Nayarit, Tabasco y Morelos (3,4). Debido a que actualmente no se cuenta con un medicamento ideal para contrarrestar esta enfermedad, se están realizando estudios de compuestos que inhiben las rutas metabólicas del parásito como

lo es la vía de la glucólisis en la cual se encuentra la enzima reversible TIM que cataliza la interconversión de la DHAP y el G3P. Esta es una enzima esencial para esta vía metabólica mencionada, misma que genera la energía para permitir la sobrevivencia del parásito (8).

2.3 Metabolismo energético del *Trypanosoma cruzi*

En el orden *Kinetoplastida* se encuentra la familia *Trypanosomatidae* (Figura 2) la cual esta formada por eucariontes parásitos unicelulares flagelados que infectan diversos animales.

El *Trypanosoma cruzi* causa la enfermedad de Chagas o tripanosomiasis americana; esta enfermedad es transmitida por chinches del género *Triatoma*, *Rhodnius* y *Panstrongylus* (Figura 3 y 4).

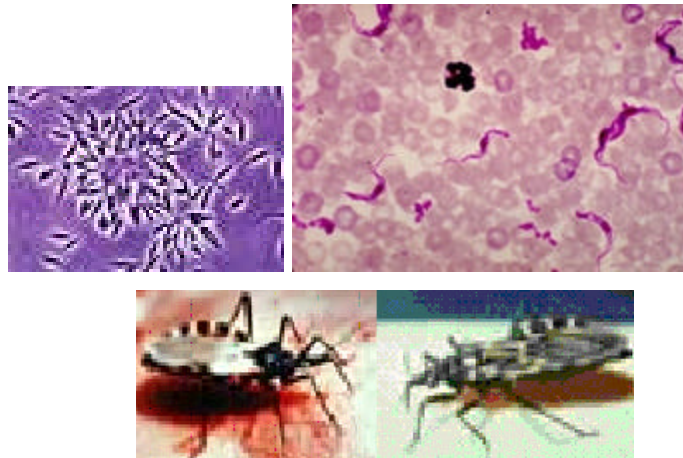


Figura 2 *Trypanosoma cruzi*

Figura 3 y 4 *Triatoma spp*

Durante el ciclo de vida los parásitos obtienen su energía a partir de los sustratos que se encuentren disponibles. La glucosa es la principal fuente de energía en las fases infectivas en el hospedero. Los tripanosomátidos degradan carbohidratos por la vía de la glucólisis y, en sólo estos organismos de la clase *Kinetoplastida*, la mayor parte de las enzimas glucolíticas se encuentran distribuidas en organelos especializados llamados

glucosomas (9). Estos organelos son esféricos con un diámetro de 0.7mm y se distribuyen al azar en el interior celular (10). Su número y tamaño en el citoplasma de los tripanosomátidos varía entre especies y la etapa del desarrollo de estas. Se han encontrado alrededor de 50 glucosomas en algunos tripanosomas (11).

El piruvato, producto final de la glucólisis, se degrada en la única mitocondria de estos organismos. Sin embargo la participación de rutas mitocondriales en la degradación de carbohidratos varía ampliamente, debido a que la diferenciación de las mitocondrias varía de acuerdo a la fase en la que se encuentre el parásito. En algunas etapas los parásitos poseen una mitocondria en donde se lleva a cabo normalmente el ciclo de Krebs y pueden degradar completamente el piruvato a dióxido de carbono, mientras que en otras etapas, el piruvato sólo se degrada hasta acetato.

En el torrente sanguíneo del huésped, la forma alargada de *Trypanosoma cruzi* posee la ruta metabólica de degradación de glucosa más simple, siendo el piruvato el principal producto final. Esta forma adaptativa es completamente dependiente de la energía derivada de la glucólisis; la fructosa, la manosa y el glicerol son utilizados como sustratos alternativos. Esta forma de *T. cruzi* posee una mitocondria pobremente desarrollada, por lo que no se lleva a cabo el ciclo de Krebs.

La glucosa se degrada a 3-fosfoglicerato (3PGA) dentro de los glucosomas, mientras que las últimas tres enzimas de la ruta se encuentran en el citosol (Figura 5). La síntesis neta de ATP ocurre en el citosol, en la reacción catalizada por la piruvato cinasa (PK), mientras que dentro de los glucosomas hay consumo de ATP por la hexocinasa (HK) y la fosfo-fructocinasa; este consumo se balancea por la producción de ATP de la fosfo-glicerato cinasa (PGK). El balance redox en el glucosoma se mantiene gracias al NADH producido por la gliceraldehído-3-fosfodeshidrogenasa (GAPDH) mitocondrial. Los electrones se transfieren a través de una cadena de oxido-reducción

ciclo de Krebs. Una gran parte del Acetil-Co A, no entra al ciclo de Krebs sino que se convierte en acetato.

Otras diferencias entre la forma procíclica, que se encuentra en el insecto vector, y la forma alargada, localizada en el torrente sanguíneo del huésped, se encuentran en el metabolismo glucosomal. Por ejemplo, en los parásitos procíclicos, la fosfoglicerato cinasa se localiza predominantemente en el citosol y el 1,3 bifosfoglicerato no se convierte a 3 fosfoglicerato dentro del glucosoma, como en las formas alargadas, si no que esto ocurre en el citosol. Además, a diferencia de las formas alargadas, en los parásitos procíclicos se encuentran bajos niveles de piruvato cinasa en el citosol

Las formas intermediarias y cortas que se encuentran en el torrente sanguíneo poseen una mitocondria más desarrollada y no dependen únicamente de la glucólisis para la generación de energía. La transición en el metabolismo energético entre la forma alargada del parásito, que es dependiente de la glucólisis, y los parásitos procíclicos, que son dependientes del ciclo de Krebs, ocurre en el torrente sanguíneo.

El *Trypanosoma cruzi* cataboliza la glucosa sólo parcialmente hasta dióxido de carbono generando productos finales de degradación como acetato, piruvato y succinato (12).

2.4 Otros modelos utilizados para crear un fármaco antiparasitario

Las enzimas glucolíticas han sido blanco de estudio para el diseño de fármacos antiparasitarios. Se ha comprobado que cuando los tripanosomas se incuban a 37 °C sin glucosa, o bien en presencia de un inhibidor del transportador de glucosa de la membrana como la floretina, se mueren en tan solo pocos minutos (13, 37). El mismo efecto se presenta cuando los parásitos se ponen en presencia de pentaenolactona, un inhibidor específico de la GAPDH (14), o bien, en presencia de derivados del ácido α cianocinámico, el cual inhibe específicamente a transportadores de ácidos monocarboxílicos como el piruvato (15). Sin embargo estos inhibidores no son selectivos para enzimas de los parásitos, por lo que no es viable su uso como fármacos.

El diseño de fármacos con base en la estructura se ha empleado para el desarrollo de compuestos que sólo inhiben a las enzimas glucolíticas de tripanosomátidos, sin que se presente algún efecto en las correspondientes enzimas del humano u otras especies animales. (16)

Hasta el momento se han desarrollado algunos inhibidores selectivos de algunas enzimas glucolíticas; se ha puesto mayor interés en las enzimas de tripanosomátidos cuya estructura tridimensional se conoce, como la fructosa 1,-6-bifosfato aldolasa (17) la gliceraldehido-3-fosfato deshidrogenasa (11, 18, 19), la fosfoglicerato cinasa (20), la piruvato cinasa (21) y la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa (22). Esta última molécula no es una enzima glucolítica en sentido estricto, pero es esencial en el glucosoma para mantener funcionando adecuadamente la ruta metabólica.

Se han sintetizado compuestos que inhiben enzimas glucolíticas de algunos parásitos de los cuales no se tiene información de la estructura cristalográfica. Tal es el caso de los derivados de la N-acetilglucosamina cuya eficacia en el sitio activo de la HK de *Trypanosoma brucei* ha sido explorado. El mejor inhibidor fue la m-Br-fenilglucosamina, (23) cuya efectividad sobre la enzima de mamíferos correspondiente no se conoce hasta el momento. Hardré, R. y cols (24) han desarrollado análogos del intermediario cis-enediol de la reacción catalizada por la glucosa 6 fosfato isomerasa (PGI), como el D-arabinohidroximato-5-fosfato, mismo que fue probado con las enzimas de levadura (YPGI), músculo de conejo (RmPGI) y de *Bacillus stearothermophilus* (BsPGI), obteniendo inhibición con concentraciones de 0.22, 0.195, 0.098 μM , respectivamente. Cabe señalar que a menor concentración (μM) el compuesto inhibe mejor, es decir, con poco de D-arabinohidroximato-5-fosfato, se inactiva la PGI. En el caso de la fosfofructocinasa (PFK) de *Trypanosoma brucei*, se han desarrollado inhibidores selectivos análogos de la fructosa-6-fosfato (P6P), denominados 2,5-anhidrido-D-manitoles con distintos grupos aril-amino en la posición 1, los cuales se unen al sitio de unión de ATP, en lugar del sitio de la fructosa-6-fosfato, con constantes de afinidad de aproximadamente 100 μM (25). También se han obtenido las estructuras cristalográficas de la GPADH de *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma brucei* y *Leishmania mexicana*, las cuales presentan una similitud entre sí del 90-80% y de 45-48% con la enzima de humano. A pesar de que el sitio activo y el sitio vecino de unión de NAD^+ se encuentran altamente conservados, el sitio de unión del extremo adenosina del NAD^+ presenta diferencias significativas entre las enzimas de parásitos y la correspondiente

en humano, de tal forma que ha sido posible diseñar derivados de adenosina que presentan una afinidad 250,000 veces mayor por la enzima del parásito. Estos derivados no inhiben a la enzima de humano y también retardan el crecimiento de los cultivos de parásitos de *Trypanosoma cruzi* y *Trypanosoma brucei* a concentraciones micromolares bajas (26).

La compartimentalización de las enzimas glucolíticas de tripanosomátidos en el glucosoma, también ha sido punto de interés para el diseño de fármacos. Un gran número de experimentos han dado evidencias de que la deslocalización de las enzimas glucolíticas es deletérea para los tripanosomas. Por ejemplo los tripanosomátidos poseen dos isoformas distintas de la PGK, una glicosomal, que sólo se expresa en la forma sanguínea (metacíclica), y una citosólica, que se encuentra únicamente en los tripanosomas procíclicos. Cuando se expresa un transgene de la PGK citosólica o una forma de la PGK glicosomal sin extremo C-terminal, que la dirige al glucosoma, las formas que se encuentran en el torrente sanguíneo mueren rápidamente (27).

2.5 La TIM como blanco para el diseño de inmunógenos capaces de inhibir su ruta metabólica.

Desde 1995 Gómez-Puyou y cols., han estudiado a la TIM como blanco para el diseño de fármacos antiparasitarios, partiendo de la propuesta que se pueden inhibir en forma especie-específica enzimas ortólogas con un alto nivel de selectividad (16).

Se probó que la TIM del *Schistosoma japonicum* puede proveer de una protección parcial disminuyendo la parasitemia y la cantidad de huevos al desafío contra la infección de *Schistosoma japonicum* en ratones C57BL/6 y BALB/c (28, 29). Este mismo experimento se realizó en un modelo con cerdos y tuvo el mismo efecto (30). En otro trabajo se realizó un estudio comparativo sobre la protección inmunológica que produce la TIM de *Taenia solium* en el cerdo en donde se observó una disminución en la parasitemia (31).

En este proyecto se purificará la enzima recombinante TIMTc para, posteriormente, inocularla por vía intraperitoneal en ratones Balb/c con el fin de inmunizarlos y protegerlos parcialmente contra la infección causada por el *Trypanosoma cruzi*.

2.6 Características de la triosafosfato isomerasa.

La TIM es una enzima glucolítica, que cataliza la interconversión de DHAP y G3P.

2.7 Características estructurales de la triosafosfato isomerasa.

La TIM pertenece a una de las familias de proteínas con estructura de barril (α/β)₈, la cual está formada por ocho hebras β paralelas en el interior de la proteína rodeadas por ocho hélices- α que se encuentran en el exterior del barril. Las hélices- α y las hebras β se unen por medio de asas (Figura 6).

La TIM de tripanosomátidos es un homodímero, a pesar de que los residuos catalíticos se encuentran en cada monómero y pertenecen a la misma cadena polipeptídica. En algunos organismos como *Thermotoga maritima* (32) y *Giardia lamblia* (33) la TIM se encuentra en forma de tetrámero.



Figura 6 Modelo estructural del dímero de barril del triosafosfato isomerasa del *Trypanosoma cruzi* (Código del PDB: 1TCD).

2.8

La TIM como inmunógeno

Hasta el momento las vacunas no han sido eficientes debido a que el *Trypanosoma cruzi*, además de ser un parasito intracelular, también presenta variedad antigénica (34). Estos inconvenientes no han permitido el desarrollo de vacunas tradicionales, por lo que desde hace una década, varios grupos de investigación, incluyendo el nuestro, han estudiado la TIM. La TIM ha sido utilizada como inmunógeno debido a que esta enzima no presenta una reacción cruzada entre diferentes especies. Como se mencionó anteriormente, se probó que la inmunización con la TIM del *Schistosoma japonicum* puede proveer de una protección disminuyendo la parasitemia y la cantidad de huevos al desafío contra la infección de *Schistosoma japonicum* en ratones C57BL/6 y BALB/c (28,29). Un experimento similar se realizó en un modelo con cerdos y tuvo el mismo efecto (30). En otra investigación, se realizó un estudio comparativo sobre la protección inmunológica y bioquímica de la TIM de *Taenia solium* en el cerdo en donde se observó una disminución en la parasitemia (31).

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

La inmunización con la triosafosfato isomerasa del *Trypanosoma cruzi* (TIMTc) protegerá a los ratones Balb/c de la infección con el parásito.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Se determinará si la inmunización con la TIMTc protege a los ratones Balb/c contra la infección del parásito.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Purificar la enzima recombinante TIMTc e inmunizar ratones Balb/c con la finalidad de generar anticuerpos anti-TIMTc detectables por un inmunoensayo.
- 2) Determinar la protección al desafío con 1×10^6 células de *Trypanosoma cruzi* por vía I.P. en los ratones inmunizados.
- 3) Evaluar el grado de protección mediante la cuantificación de los parásitos y la sobrevivencia de los ratones a través del periodo de infección.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Purificación de la enzima TIMTc

Se purificó la enzima TIMTc por medio del protocolo de Ostoa-Saloma P. y colaboradores (35). Los detalles de la purificación se mencionan a continuación: En medio Luria Bertani (LB) con ampicilina (100mg/mL) se cultivó *E. coli* con isopropil β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) para sobre-expresar la proteína recombinante TIMTc. Se centrifugó por 20 min a 166.44 x g. El botón se resuspendió en 40mL de amortiguador de lisis (MES/NaOH 25mM, DTT 1mM, EDTA 1mM y PMSF 0.2mM, pH 6.5). Las células se rompieron por sonicación mediante 6 ciclos de 40 seg con descansos de 1 min. El lisado se centrifugó a 124.83 x g por 70 min. El sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio: $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ al 45% de saturación durante 12 hrs. Se centrifugó a 32,931 x g por 20 minutos. El sobrenadante se precipitó con $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ al 65% de saturación durante 12 hrs y posteriormente se centrifugó a 32,931 x g por 20 min. El botón obtenido se disolvió en 10mL de trietanolamina (TEA) 25mM, NaCl 50mM, ditioneitol (DTT) 0.5mM, EDTA 2mM y azida de sodio (NaN_3) 1mM, pH 8, se dializó contra el mismo amortiguador durante 12-17 hrs. La muestra se pasó por una columna de carboximetilsefaraosa equilibrada previamente con TEA, y se eluyó con una gradiente de 50-150 mM de NaCl. Se colectaron fracciones de 1 mL. La proteína se precipitó con $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ al 70% y se almacenó en refrigeración. Todos los pasos anteriores se llevaron a cabo a 4°C. Todo el proceso de purificación se monitoreó en geles SDS-PAGE al 16%, teñidos con azul de Coomassie.

En los pasos intermedios de la purificación se cuantificó la proteína por el método del ácido bicinonínico (BCA, Protein Assay Reagent Kit) a 562nm, la proteína pura se

cuantificó por absorbancia a 280nm, utilizando un coeficiente de extinción molar de $36130 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$.

4.2 Uso de los ratones para experimentación

Se utilizaron 38 ratones machos Balb/c de 7 semanas, obtenidos del bioterio del Departamento de Medicina Experimental de la Facultad de Medicina. Los ratones, fueron divididos en cuatro grupos. El grupo 1 y 2 fueron los grupos testigo negativos, el 3 y 4 fueron los grupos experimentales.

Todos los ratones se sangraron al día 0 para demostrar la ausencia de anticuerpos anti-TIMTc. Se les administró cada tratamiento en tres ocasiones (utilizando un volumen de $100 \mu\text{l}$ totales) con intervalos de siete días, como se muestra en el diseño experimental, con el fin de inducir la respuesta inmune y disminuir la parasitemia por *Trypanosoma cruzi*. El desafío se hizo a los 21 días posteriores a la primera inmunización con una dosis de 1×10^6 de células de *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro.

4.3 Sangrado de los ratones para la detección de anticuerpos

En el día cero del experimento se sangraron los ratones vía supramandibular para obtener $10 \mu\text{l}$ de suero y realizar un ELISA para demostrar la ausencia de anticuerpos antiTIMTc en todos los grupos (Figura 9).

Posteriormente, al día 21, se obtuvo suero para demostrar la presencia de anticuerpos antiTIMTc y los ratones fueron desafiados con *Trypanosoma cruzi* vía I.P.

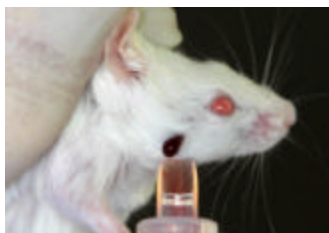


Figura 9 Sangrado supramandibular en ratones

4.4 Cuantificación de *Trypanosoma cruzi*.

Se tomaron muestras de sangre de la cola de un ratón infectado con *Trypanosoma cruzi* con la pipeta, colectando 1µl para ser diluido y mezclado con 149µl de PBS. Los parásitos se cuantificaron en la cámara de Neubauer. Para obtener el número de células de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* contenidas en un mililitro de sangre se realizan los siguientes cálculos:

Número de parásitos por dilución por 10, 000 (constante) por el volumen.

$$\# \text{ parásito} \times \text{dilución} \times 10,000 \times 1\text{ml} = \# \text{ parásitos por ml}$$

4.5 Dosis de infección

Todos los ratones se infectaron con 1×10^6 células de *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro por vía Intraperitoneal (I.P).

4.6 Diseño experimental (Cuadro I)

El día cero del experimento se realizó el siguiente manejo en cada grupo;

- El grupo 1 se inoculó con 100 µl de PBS por vía I.P.

- El grupo 2 se inoculó con 50 μ l de adyuvante completo de Freund y 50 μ l de PBS vía I.P.
- El grupo 3 se inoculó con 50 μ l de adyuvante completo de Freund y 50 μ g de TIMTc por vía I.P.
- El grupo 4 se inoculó con 50 μ l de adyuvante completo de Freund y 100 μ g de TIMTc por vía I.P.

El día siete del experimento se inocularon por vía I.P. los siguientes compuestos:

- El grupo 1 se inoculó con 100 μ l de PBS
- El grupo 2 se inoculó con 50 μ l de adyuvante incompleto de Freund y 50 μ l de PBS
- El grupo 3 se inoculó con 50 μ l de adyuvante incompleto de Freund y 50 μ g de TIMTc.
- El grupo 4 se inoculó con 50 μ l de adyuvante incompleto de Freund y 100 μ g de TIMTc.

El día catorce del experimento se inocularon por vía subcutánea (S.C.) los siguientes compuestos:

- El grupo 1 se inoculó con 100 μ l de PBS
- El grupo 2 se inoculó con y 50 μ l de PBS
- El grupo se inoculó con y 50 μ g de TIMTc.
- El grupo 4 se inoculó con y 100 μ g de TIMTc.

El día veintiuno del experimento todos los ratones se sangraron por vía supramandibular y se obtuvieron 10 µl de suero que se utilizaron para el ensayo de ELISA. También se desafiaron con una dosis de 1×10^6 *Trypanosoma cruzi* por vía I.P.

A partir del día veintisiete del experimento se cuantificaron los parásitos en cámara de Neubauer a intervalos de 24 horas hasta el día de la muerte del ratón, ya que el modelo experimental aceptado internacionalmente de la enfermedad de Chagas aguda en ratones, consiste en la infección de ratones con los parásitos y su seguimiento hasta la muerte. La evolución de la enfermedad causa la muerte por parasitemia aguda aproximadamente tres semanas después de la inoculación (25).

Cuadro I Diseño experimental

DÍA DE APLICACIÓN	GRUPO 1 CONTROL	GRUPO 2 PLACEBO	GRUPO 3 50 µg TIMTc.	GRUPO 4 100 µg TIMTc.
CERO	PBS (sstr)	Ad. C.+ PBS (sstr)	Ad. C. 50 µl TIM (sstr)	Ad. C. 100 µl TIM (sstr)
SIETE	PBS	Ad. I + PBS	Ad. I. 50 µl TIM	Ad. I. 100 µl TIM
CATORCE	PBS	PBS	PBS + 50 µl TIM	PBS + 100 µl TIM
VEINTIUNO	Se sangrarán a todos los ratones (sstr) y se infectaran con un millón tripomastigotes de <i>Trypanosoma cruzi</i> Cepa Qro por vía I.P.			

4.7 Análisis Estadístico

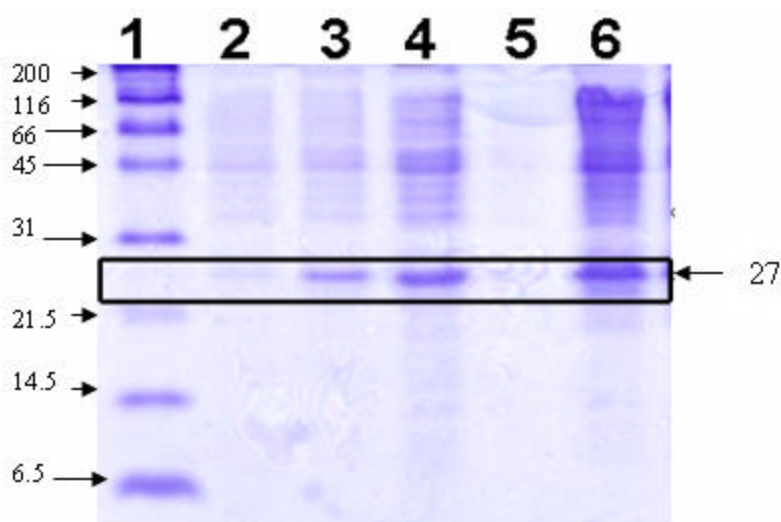
La media de los niveles de parasitemia fueron calculados con el paquete estadístico de Microsoft Excel (para Windows). La comparación de la media de los días de sobrevivencia entre los grupos se obtuvo con la prueba estadística de Wilcoxon Stores,

Versión 8.02 (SAS Institute Inc. Cary, North Carolina, EE.UU.). La gráfica de supervivencia fue obtenida por el método no paramétrico de Kaplan Meier utilizando el paquete estadístico Orwin

5. RESULTADOS

5.1 Purificación de TIMTc

En el primer ensayo de purificación, con base al protocolo de Ostoa-Saloma (35), se tomaron siete muestras (alícuotas) a lo largo de la purificación, para ser analizadas por electroforesis en un gel de acrilamida al 16% en presencia de dodecil sulfato de sodio (SDS PAGE) (Figura 7).



La figura 7 muestra la enzima TIMTc purificada con una masa molecular (PM) de 27 KDa. Carril 1 marcador de peso molecular.

En el último paso de la purificación se colectaron y cuantificaron fracciones que se muestran en la figura 8 En los carriles 7, 8 y 9 se observa la mayor concentración del monómero TIMTc (27kD).

La proteína se enriqueció al solubilizarse con NaCl. Una vez obtenida, se precipitó con $(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)$ y se conservó a 4 °C

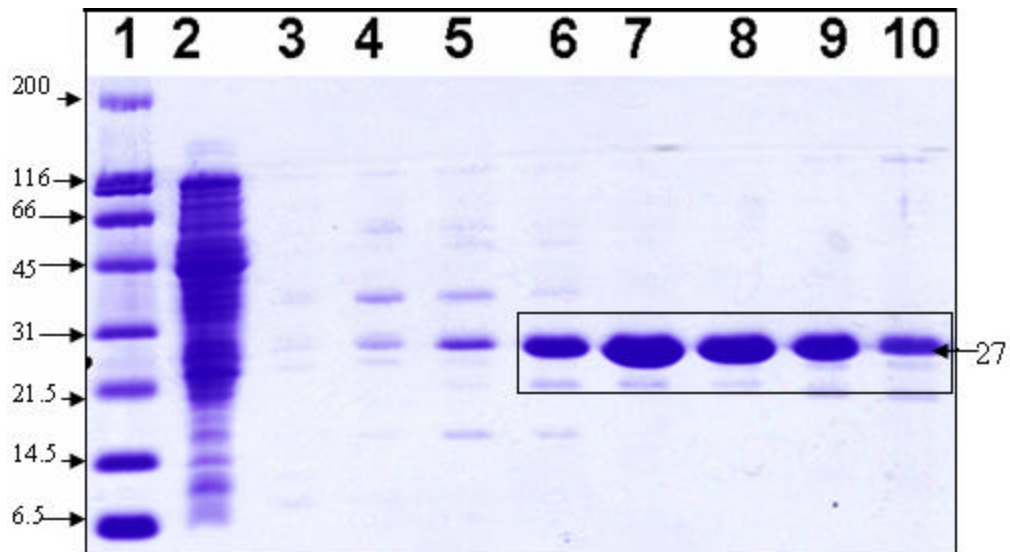


Figura 8. Gel de SDS-PAGE al 16% en donde se observan muestras obtenidas del colector de fracciones recolectadas de la purificación de TcTIM 1: en el carril 1 marcador de peso molecular, en los carriles 7, 8 y 9 TIMTc con un peso molecular de 27kD.

5.2 Sangrado supramandibular y colección suero

En el día cero del experimento se demostró la ausencia de anticuerpos anti-TIMTc en todos los grupos y al día 21, el proceso se repitió demostrándose la presencia de anticuerpos anti-TIMTc en aquellos ratones que fueron desafiados.

5.3 Cuantificación de tripomastigotes del *Trypanosoma cruzi* y promedios de sobrevivencia

En los cuadros 1,2,3 y 4, se muestra la cuantificación en sangre de los parásitos, expresado en millones de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* cepa Querétaro, a partir del día 5 postinfección hasta el día de su muerte.

En la prueba de Wilcoxon se analizaron los promedios de los días de sobrevivencia de cada grupo. Los grupos 1-3, 1-4 y 2-3 no muestran diferencia significativa ($p=0.05$), ($p=0.82$), ($p=0.86$), respectivamente. Los grupos 2-4 muestran diferencia estadísticamente significativa en los promedios de sobrevivencia ($p=0.03$).

Experimento 1 y 2 Ratonos BALB/C 10 Semanas infecados con 1 x 10⁶ de tripomastigote del *Trypanosoma cruzi* cepa Qro

Grupo 1	Dia 0	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15	Dia 16	Dia 17	Dia 18	Dia19
RATON 1	0	0	0	1,5	3,75	3,75	5,625	4,5	4,5	4,125	6,75	8,625	15,75	13,5	18,75	20,25
RATON 2	0	0	0	0,375	0,75	2,25	2,625	2,625	3	2,25	3	8,625	7,5	9,375		
RATON 3	0	0	0	0,375	0,375	1,125	2,25	4,875	0,375	5,25	4,875	4,5	7,875	9,75	22,13	19,5
RATON 4	0	0	0	1,125	1,5	3,375	3,75	3,375	1,125	3,75	6	7,875	9	10,88	28,13	
RATON 5	0	0	0,375	0,375	0,375	2,25	2,25	3,375	3,375	3	6	6	10,13	12	16,88	19,88
RATON 6	0	0	0	0	0,75	1,125	1,125	1,875	4,875	6	6,375	9	7,5	12,75	20,25	22,5
RATON 7	0	0,375	0,375	0,375	1,875	3,75	7,875	17,625	25,5	3	4,5					
RATON 8	0	0	0,375	0,375	1,5	1,875	2,625	6	13,5							
RATON 9	0	0,75	0,75	0,75	1,5	1,5	1,5	10,125	14,25	6,75	9,375	18,75				
RATON 10	0	0	0,75	0,75	0,75	1,5	1,5	2,25	9,75	10,5	10,5	7,5				
Suma	0	1,125	2,625	6	13,125	22,5	31,125	56,625	80,25	44,63	57,38	70,88	57,75	68,25	106,1	82,13
Promedios	0	0,1125	0,2625	0,6	1,3125	2,25	3,1125	5,6625	8,025	4,958	6,375	8,859	9,625	11,38	21,23	20,53
# Vivos	10	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	8	6	6	5	4
Sobrevivencia	100	100	100	100	100	100	100	100	100	90	90	80	60	60	50	40

cuadro 1 grupo 1 PBS

Experimento 1 y 2 Ratonos BALB/C 10 Semanas infecados con 1 x 10⁶ de tripomastigote del *Trypanosoma cruzi* cepa Qro

Grupo 2	Dia 0	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15	Dia 16	Dia 17	Dia 18	Dia19
RATON 1	0	0,375	0,375	0,75	0,75	0,75	4,5	4,5	3,75	6,375	6	9	18	16,5		
RATON 2	0	0	0	0,375	1,5	1,5	2,625	2,625	2,625	6	6	6,375	13,88	19,5		
RATON 3	0	0	0	0	0,75	1,5	2,25	2,25	2,625	1,875	6,75	7,875	19,13			
RATON 4	0	0,375	0,375	0	0,375	1,125	1,125	1,125	1,5	1,5	5,625	12	14,25	33		
RATON 5	0	0	0	0	0	3,375	3,375	6,375	2,25	3,375	7,5					
RATON 6	0	1,125	1,125	1,125	1,125	2,625	6,75	7,5	10,5	8,25	4,5					
RATON 7	0	0	1,125	1,5	1,5	3,375	5,625	12	15							
RATON 8	0	0	0	0	4,125	6,75	8,25	9,75								
RATON 9	0	0	0	0	2,625	1,875	1,875	12	12	5,25						
RATON 10	0	1,125	1,125	1,125	1,125	4,875	4,875	4,875	9,375	6,75	13,5					
Suma	0	3	4,125	4,875	13,875	27,75	41,25	63	59,63	39,38	49,88	35,25	65,25	69		
Promedios	0	0,3	0,4125	0,4875	1,3875	2,775	4,125	6,3	6,625	4,922	7,125	8,813	16,31	23		
# Vivos	10	10	10	10	10	10	10	10	9	8	7	4	4	3	0	0
Sobrevivencia	100	100	100	100	100	100	100	100	90	80	70	40	40	30	0	0

cuadro 2 PBS y adyuvante de Freund

Experimento 1 y 2 Ratonos BALB/C 10 Semanas infecadtos con 1 x 10⁶ de tripomastigote del *Trypanosoma cruzi* cepa Qro

Grupo 3	Dia 0	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15	Dia 16	Dia 17	Dia 18	Dia 19
RATON 1	0	0,375	0,375	0,75	3	3	3	3,375	4,5	4,5	7,5					
RATON 2	0	1,125	1,125	0,75	1,5	3	2,25	1,5	4,125	6	6,375	16,13	12			
RATON 3	0	0	0,375	0,75	1,5	3,75	3,375	3	6	18	6,75					
RATON 4	0	0	0,375	0,75	1,5	1,5	2,25	3	3,75	6	7,5					
RATON 5	0	0	0,75	1,125	3,375	2,25	2,25	1,875	5,25	7,5	9,75					
RATON 6	0	0	0	0	0,375	1,125	3	3,75	13,13	6,75	7,125	4,5	9,75	12,75	15,38	8,625
RATON 7	0	0	0	0	0,75	1,125	3,75	7,125	4,125	5,625	14,25	9				
RATON 8	0	0,375	0,375	0,375	0,75	1,5	7,5	6,75	9,75	7,875	8,25					
RATON 9	0	0	0	0	1,125	1,5	3,75	10,875	3	3,75	10,13	3				
RATON 10	0	0	0	0	0,375	1,5	7,125	15,375								
Suma	0	1,875	3,375	4,5	14,25	20,25	38,25	56,625	53,63	66	77,63	32,63	21,75	12,75	15,38	8,625
Promedios	0	0,1875	0,3375	0,45	1,425	2,025	3,825	5,6625	5,958	7,333	8,156	10,88	12,75	15,38	8,625	
# Vivos	10	10	10	10	10	10	10	10	9	9	9	4	2	1	1	1
Sobrevivencia	100	100	100	100	100	100	100	100	90	90	90	40	20	10	10	10

uadro 3 PBS, adyuvante de Freund y 50 µg TIMTc

Experimento 1 y 2 Ratonos BALB/C 10 Semanas infecadtos con 1 x 10⁶ de tripomastigote del *Trypanosoma cruzi* cepa Qro

Grupo 4	Dia 0	Dia 5	Dia 6	Dia 7	Dia 8	Dia 9	Dia 10	Dia 11	Dia 12	Dia 13	Dia 14	Dia 15	Dia 16	Dia 17	Dia 18	Dia 19
RATON 1	0	0	0,375	0,375	1,5	1,125	2,625	3	3	5,25	7,875	8,625	7,5	9,75	13,13	6,75
RATON 2	0	0,375	0,75	0,75	0,75	1,125	1,125	3,75	3,75	5,625	10,13	10,5	6	13,13	16,88	7,125
RATON 3	0	0	0,375	0,375	0,75	3,375	0	1,125	2,25	3,75	6,75	7,5	12	20,63	28,13	
RATON 4	0	0	0	0	1,5	1,5	2,625	3	1,125	4,125	9,75					
RATON 5	0	0,375	0	0,375	4,125	3,75	4,125	4,875	2,25	12						
RATON 6	0	0	0	0,375	0,75	1,875	1,875	8,25	8,25	7,875	11,63	17,63				
RATON 7	0	0	0	0,375	0,375	0,375	1,875	2,625	5,25	4,5	4,5	7,875	6,75	7,5	19,13	6,75
RATON 8	0	0	0	0,375	0,375	1,5	1,5	4,875	3,375	3,75	6	4,875	7,875	23,25	15,38	
Suma	0	0,75	1,5	3	10,125	14,625	15,75	31,5	29,25	46,88	56,63	57	40,13	74,25	92,63	20,63
Promedios	0	0,0938	0,1875	0,375	1,26563	1,8281	1,9688	3,9375	3,656	5,859	8,089	9,5	8,025	14,85	18,53	6,875
# Vivos	8	8	8	8	8	8	8	8	8	8	7	6	5	5	5	4
Sobrevivencia	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	87,5	75	62,5	62,5	62,5	50

uadro 4 PBS, adyuvante de Freund y 100 µg TIMTc

En la figura 11 se grafica la cantidad de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (1x10⁶/1ml) en sangre a intervalos de 3 días, donde observamos que el grupo de 100µg de TIMTc, en comparación con los grupos control, tiene una menor cantidad de parásitos. Conforme pasan los días, se observa una disminución en el número de parásitos.

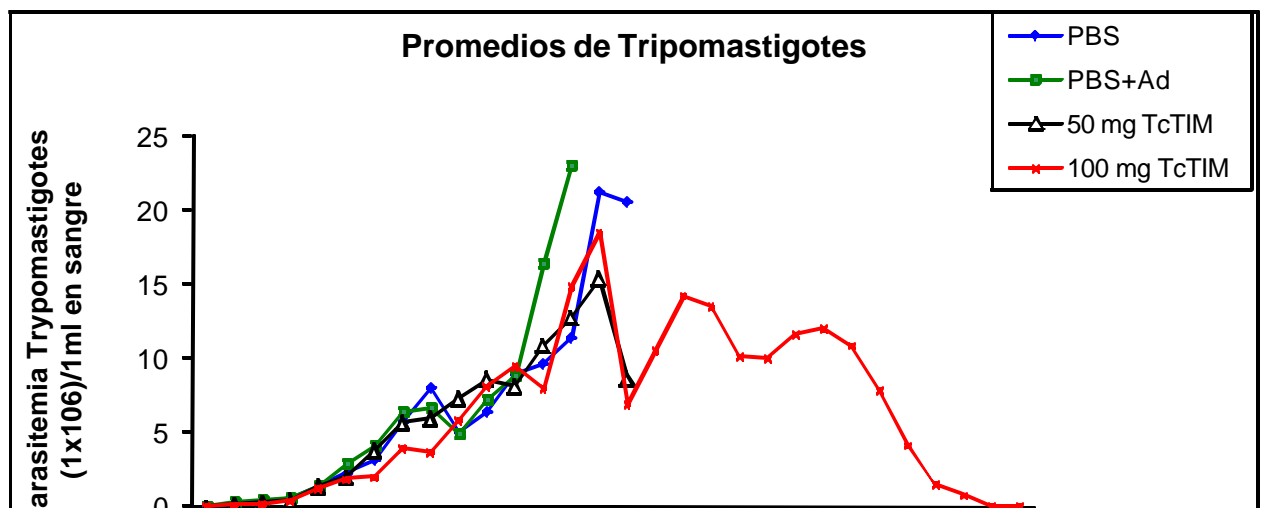


Fig 11

Fig. 11 Cantidad de tripomastigotes en sangre en los grupos experimentales

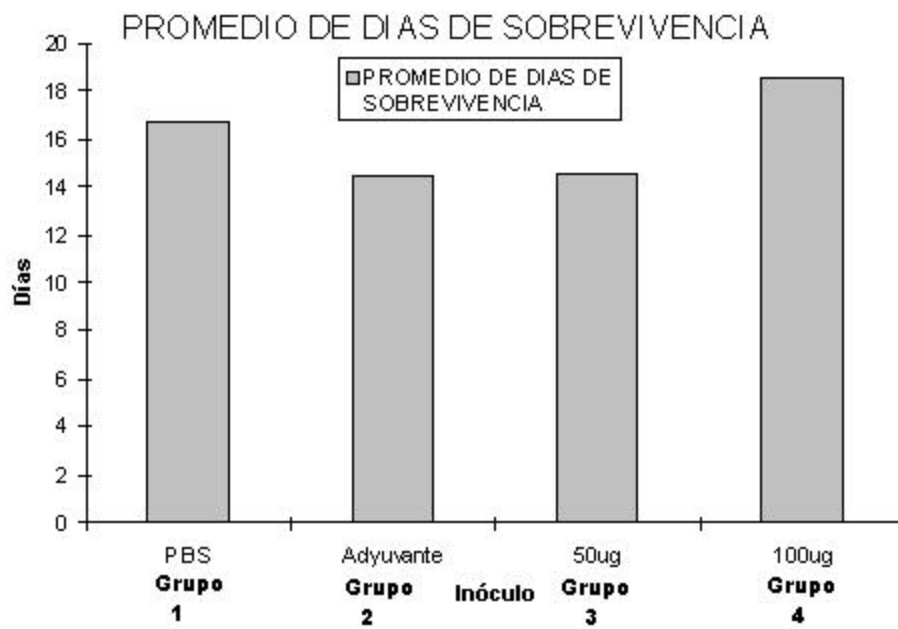


Fig. 12 Promedio de supervivencia.

En la figura 12 se grafica el promedio de supervivencia de cada grupo. 1 2 3 4.

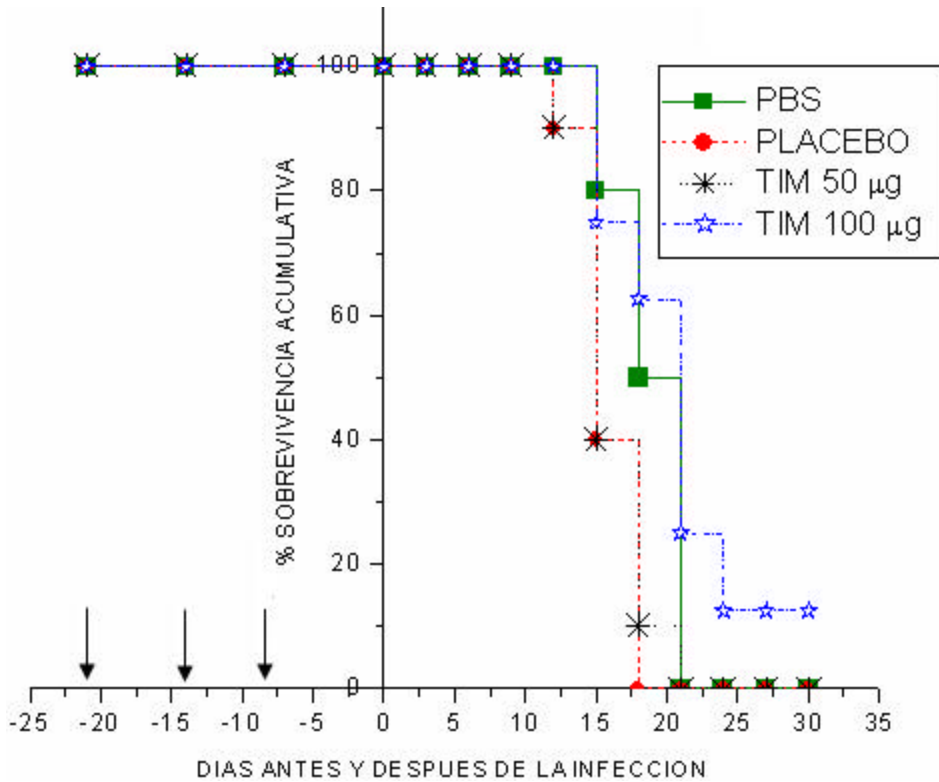


Fig. 14 Diagrama de Kaplan-Meier, las flechas indican el día en el que se aplicó la TIMTc en el ratón y el día cero indica el día de infección con tripomastigotes.

En

el diagrama de Kaplan Meier (Fig. 14) se observa el porcentaje de supervivencia acumulativa a través del tiempo. En este diagrama observa una mayor supervivencia en el grupo 4 (100 µg de TIMTc) ($p=0.03$).

6. DISCUSIÓN

En este trabajo se logró purificar a homogeneidad la TIMTc siguiendo un protocolo experimental previamente establecido (35). La pureza de la enzima que se obtuvo fue verificada por medio de electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de dodecil sulfato de sodio y fue mayor al 90%.

Esta enzima fue utilizada para inmunizar ratones e investigar si inducía protección en un modelo murino de enfermedad de Chagas aguda.

La conclusión, basada en los resultados de los experimentos previamente expuestos, es que la cantidad de anticuerpos generados contra una dosis de 100µg de TIMTc fue suficientemente efectiva para proteger a los ratones de la enfermedad experimental aguda de Chagas. En la comparación de los grupos inoculados con 50µg y con 100µg si existió diferencia estadísticamente significativa en los promedios de sobrevivencia ($p=0.03$). Esta protección de los ratones sugiere que la inmunidad que desarrolló este último grupo tuvo la actividad tripanosomicida o tripanosomostática esperadas, lo que resultó en una mayor sobrevivencia de los ratones desafiados con el parásito.

Los resultados concuerdan con los de Zhu y colaboradores (28, 29, 30) quienes también observaron que la respuesta inmune a la TIM de *Schistosoma japonicum* puede proveer de una protección parcial a ratones y cerdos, así como con los de Jiménez y colaboradores (31) que observaron protección parcial con la TIM de *Taenia solium* en cerdos.

En los experimentos la infección fue provocada por una inoculación de 1×10^6 tripomastigotes. Esa dosis es mayor que la utilizada por Ferraz y colaboradores (38)

por que se requería un tiempo menor para observar los resultados. (La razón principal de esta medida de reducción de tiempo fue para concluir este trabajo en los tiempos normales de duración de una tesis.) La dosis de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* utilizada que utilizamos fue suficiente para causar la enfermedad en los ratones. Además, la cepa Querétaro, utilizada, es la mas virulenta, y ya existen observaciones previas de que los ratones machos muestran una mayor susceptibilidad que las hembras a una misma dosis. La dosis aumentada, el tiempo reducido y la virulencia de la cepa, así como el sexo de los animales experimentales podrían ser parte de las razones por las que con este diseño experimental no logró un mayor grado de protección.

Es posible que variando los factores que se acaban de mencionar, así como la vía y la dosis de inoculación a las fueron probadas en este experimento pudiera mejorar los resultados del grado de protección obtenida.

Este trabajo es consistente con la hipótesis de que la TIM de *Trypanosoma cruzi* puede ser un excelente blanco para el diseño de fármacos antiparasitarios, ya que una respuesta inmune en su contra, como la que se obtuvo en este trabajo, puede proteger parcialmente a ratones de la enfermedad de Chagas aguda experimental.

Este trabajo también indica que la TIMTc podría ser candidato para el desarrollo de una vacuna. La utilización de TIMTc como antígeno pudiera apoyar mejorar la eficacia de otros tipos de terapias en la enfermedad producida por *Trypanosoma cruzi* en mamíferos domésticos y silvestres de interés veterinario.

CONCLUSIONES.

La conclusión, basada en los resultados de los experimentos previamente expuestos, es que la cantidad de anticuerpos generados contra una dosis de 100µg de TIMTc fue suficientemente efectiva para proteger a los ratones de la enfermedad experimental aguda de Chagas. En la comparación de los grupos inoculados con 50µg y con 100µg si existió diferencia estadísticamente significativa en los promedios de sobrevivencia ($p=0.03$). Esta protección de los ratones sugiere que la inmunidad que desarrolló este último grupo tuvo la actividad tripanosomicida o tripanosomostática esperadas, lo que resultó en una mayor sobrevivencia de los ratones desafiados con el parásito.}

PERSPECTIVAS.

Este trabajo también indica que la TIMTc podría ser candidato para el desarrollo de una vacuna. La utilización de TIMTc como antígeno pudiera apoyar mejorar la eficacia de otros tipos de terapias en la enfermedad producida por *Trypanosoma cruzi* en mamíferos domésticos y silvestres de interés veterinario.

REFERENCIA BIBLIOGRAFICA

- 1) Lorne SE. (1986) *Trypanosomiasis a Veterinary Perspective*, Ed Pergamon Press, USA.
- 2) WHO Expert Committee. (2002) *Control of Chagas disease*. WHO Tech. Rep. Ser. 905: i-vi, 1-109.
- 3) Quiroz RH. (1999) *Parasitología y enfermedades parasitarias de animales domésticos*, Ed Noriega.
- 4) Cordero JM. (2002). *Parasitología Veterinaria*, ed mcgraw-hill / interamericana de España, 3ra edición,
- 5) Yves C, Luquetti OA, Dias JC, Truyens C, Kirchhoff L.
<http://www.emedicine.com/med/topic327.htm#section~bibliography>
- 6) García QE, Azanza PJ, Sádaba DB, Honorato PJ, Antiparasitarios: antipalúdicos. Antiprotozoarios, antihelmínticos y ectoparasiticidas. *Facultad de Medicina*. Universidad de Navarra.
- 7) Matta GP, Urbina MJ, Afonso CC, Veloso VM, Tafuri WL, Machado-Coelho G, Chiari E, Bahia MT. (2004) Activity of the New Triazole Derivative Albaconazole against Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi in Dog Hosts. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, p. 4286–4292
- 8) Wierenga RK. (2001) The TIM-barrel fold: versatile framework for efficient enzymes. *FEBS Letters* 492:193-198.

- 9) Opperdoes FR and Borst P. (1977) Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. *FEBS Letters* 80:360-364.
- 10) Souza W, (2002) Special organelles of some pathogenic protozoa. *Parasitology Research* 88: 1013-1025.
- 11) Soares MJ, De Souza W, (1988) Cytoplasmic organelles of trypanosomatids: a cytochemical and stereological study. *Journal of Submicroscopy Cytology Pathology* 20:349-361.
- 12) García Torres I. Producción y caracterización de una triosfosfato Isomerasa de *Trypanosoma brucei* con la interfase de la triosfosfato isomerasa de *Trypanosoma cruzi*. Tesis Maestria UNAM, México, D.F. 2006.
- 13) Seyfang A. and Duszenko M. (1991) Specificity of glucose transport in *Trypanosoma brucei*. Effective inhibition by phloretin and cytochalasin B. *European Journal of Biochemistry*, 202: 191–196.
- 14) Duszenko M. and Mecke D. (1986) Inhibition of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase by pentalenolactone in *Trypanosoma brucei*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 19: 223–229.
- 15) Wiemer EAC, Michels, PAM, Opperdoes FR. (1995). The inhibition of pyruvate transport across the plasma membrane of the bloodstream form of *Trypanosoma brucei* and its metabolic implications. *Biochemical Journal*, 312, 479-484.
- 16) Gómez-Puyou A, Saavedra-Lira E, Becker I, Zubillaga RA, Rojo-Domínguez A, Pérez-Montfort R. (1995) Using evolutionary changes to achieve species-

specific inhibition of enzyme action-studies with triosephosphate isomerase. *Chemistry & Biology*. 2(12):847-855.

- 17) Chudzik DM, Chudzik, DM, Michels, PAM, de Walque S, Hol WGJ. (2000) Structures of type 2 peroxisomal targeting signals in two trypanosomatid aldolases. *Journal of Molecular Biology*, 300: 697-707.
- 18) Vellieux FM, Hajdu J, Verlinde CLJM, Groendijk H, Read RJ, Greenhough TJ, Campbell, JW, Kalk, KH, Littlechild JA, Watson HC, Hol WGJ. (1993) Structure of glycosomal glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* determined from *Laue data*. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 90: 2355-2359.
- 19) Matsuda T, Yoshikawa T, Suzuki M, Asano S, Somboonthum P, Takuma K, Nakano Y, Morita T, Nakasu Y, Kim HS, et al. (1995). Novel benzodioxan derivative, 5-(3-(((2S)-1,4-benzodioxan-2-ylmethyl)amino]propoxy)-1,3-benzodioxole HCl (MKC-242), with a highly potent and selective agonist activity at rat central serotonin 1A receptors. *Japan Journal. Pharmacology*. 69: 357-66.
- 20) Bernstein BE, Michels PAM, Hol WGJ. (1997) Synergistic effects of substrate-induced conformational changes in phosphoglycerate kinase activation. *Nature*, 385: 275-278.
- 21) Rigden DJ, Phillips SE, Michels PAM, Fothergill-Gilmore LA. (1999) The structure of pyruvate kinase from *Leishmania mexicana* reveals details of the allosteric transition and unusual effector specificity. *Journal of Molecular Biology*, 291: 615-635.

- 22) Jimenez L, Vibanco-Perez N, Navarro L, Landa A. (2000) Cloning, expression and characterisation of a recombinant triosephosphate isomerase from *Taenia solium*. *International journal for parasitology*. 30: 1007-1012
- 23) Willson M, Alric I, Périé J, Sanejouand YH. (1997) Yeast hexokinase inhibitors designed from the 3-D enzyme structure rebuilding. *Journal of Enzyme Inhibition*, 12: 101-121.
- 24) Hardré R, Bonnette C, Salmon L, y Gaudemer A. (1998) Synthesis and evaluation of a new inhibitor of phosphoglucose isomerases: the enediolate analogue 5-phospho-D-arabinohydroxamate. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 8(23): 3435-8.
- 25) Claustre S, Denier C, Lakhdar-Ghazal F, Lougare A, Lopez C, Chevalier N, Michels P, Périé J, Willson M. (2002) Exploring the active site of *Trypanosoma brucei* phosphofructokinase by inhibition studies: specific irreversible inhibition. *Biochemistry*, 41(32):10183-93.
- 26) Aronov AM, Suresh S, Buckner FS, Van Voorhis WC, Verlinde CLMJ, Opperdoes FR, Hol WGJ and Gelb MH. (1999) Structure-based design of submicromolar, biologically active inhibitors of trypanosomatid glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 96 4273–4278.
- 27) Blattner J, Helfert S, Michels P, and Clayton C. (1998) Compartmentation of phosphoglycerate kinase in *Trypanosoma brucei* plays a critical role in parasite energy metabolism. *Proceedings of National Academy of Sciences USA* 95: 11596–11600.

- 28) Zhu Y, J Si DA, Harn C. Yu Y, Liang X, Yin WHe, Hua W, Xu M and Xu Y. (2002). The protective immunity produced in C57BL/6 mice of DNA vaccine encoding *Schistosoma japonicum* Chinese strain triose-phosphate isomerase. *Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health* 33, 207-213.
- 29) Zhu Y, J Si DA, Harn M, Xu J, Ren C, Yu Y, Liang X, Yin WHe. (2004). The protective immunity of a DNA vaccine encoding *Schistosoma japonicum* Chinese strain triose-phosphate isomerase in infected BALB/C mice. *Southeast Asia Journal of Tropical Medicine and Public Health* 35, 518-522.
- 30) Zhu Y, J Si DA, Harn M, Xu J, Ren C, Yu Y, Liang X, Yin WHe. (2006) *Schistosoma japonicum* triose-phosphate isomerase plasmid DNA vaccine protects pigs against challenge infection. *Parasitology*, 132, 1-5.
- 31) Jimenez L, Fernandez-Velasco DA, Willms K, Landa A. (2003) A comparative study of biochemical and immunological properties of triosephosphate isomerase from *Taenia solium* and *Sus scrofa*. *Journal Parasitology*. 89, 209-214.
- 32) Maes D, Zeelen J P, Thanki N, Beaucamp N, Alvarez M, Dao Thi MH, Backmann J, Martial J A, Wyns L, Jaenicke R, Wierenga R. (1999) The crystal structure of triosephosphate isomerase (TIM) from *Thermotoga maritima*: A comparative thermostability structural analysis of ten different TIM structures. *Proteins: Structure, Function, and Genetics* 37: 441-453.
- 33) López-Velázquez G, Molina-Ortiz D, Cabrera N, Hernández-Alcántara G, Peon-Peralta J, Yépez-Mulia L, Pérez-Montfort R, Reyes-Vivas H.(2004). An

- unusual triosephosphate isomerase from the early divergent eukaryote *Giardia lamblia*. *Proteins: Structure, Function and Bioinformatics*, 55:824-834.
- 34) Tizard I, (2002) *Inmunología Veterinaria*, Ed Interamericana McGraw-Hill, 7ª edición.
- 35) Ostoa-Saloma P, Garza-Ramos G., Ramírez J., Becker I., Berzunza M., Landa A., Gomez-Puyou A., Tuena de Gomez-Puyou M., Perez-Montfort R (1997) Cloning, expression, purification and characterization of triosephosphate isomerase from *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Biochemistry*, 244: 700-705.
- 36) Bakker BM, Westerhoff HV, Opperdoes FR, Michels PAM. (2000) Metabolic control analysis of glycolysis in trypanosomes as an approach to improve selectivity and effectiveness of drugs. *Mol. Biochemical Pharmacology*. 1016: 1-10.
- 37) Verlinde CL, Hannaert V, Blonski C, Willson M. (2001) Glycolysis as a target for the design of new antitrypanosome drugs. *Drug Resist. Update* 41; 130-136.
- 38) Ferraz M L, Gazzinelli R T, Rosana O. (2007) The anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in model of acute Chagas disease is less dependent on interferon than that of benznidazole. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 51,1359–1364.
- 39) Martínez-Conde J. Guía del inspector veterinario titular. 2-Epizootiología y zoonosis. Barcelona: Biblioteca Veterinaria Aedos; 1975.

40) Birchard. *Manual clínico de pequeñas especies*, McGraw Hill Interamericana, Vol1, México, 2000.

41) Acha NP. (1987) *Zoonosis y enfermedades transmisibles comunes al hombre y a los animales*, OMS, 2da edición.