Biblioteca Digital
F C E N - U B A

BIBLIOTECA CENTRAL LUIS F LELOIR
BIBLIOTECA CENTRAL LELOIR
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES UBA

Tesis de Posgrado

Respuesta humoral en Leishmaniasis del Perú : Proteínas HSP70 y ribosomales P

Panebra Alvarado, Alfredo

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:
Panebra Alvarado, Alfredo. (1996). Respuesta humoral en Leishmaniasis del Perú : Proteínas HSP70 y ribosomales P. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2864_PanebraAlvarado.pdf

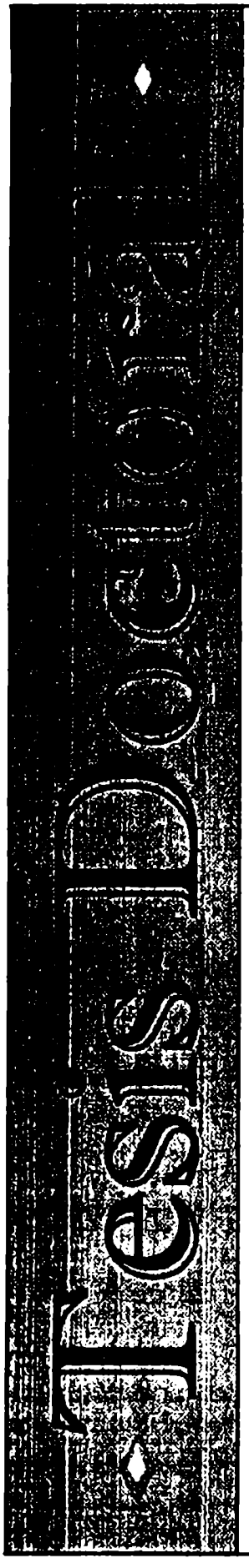
Cita tipo Chicago:
Panebra Alvarado, Alfredo. "Respuesta humoral en Leishmaniasis del Perú : Proteínas HSP70 y ribosomales P". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996.
http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2864_PanebraAlvarado.pdf

EXACTAS UBA
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

UBA
Universidad de Buenos Aires

Dirección: Biblioteca Central Dr. Luis F. Leloir, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. Intendente Güiraldes 2160 - C1428EGA - Tel. (++54 +11) 4789-9293

Contacto: digital@bl.fcen.uba.ar



Universidad de Buenos Aires

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Respuesta Humoral en Loishmaniasis del Perú: Proteínas HSP70 y rIhesomalos P

Alfredo Panebra Alvarado

Tesis para optar por el título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires

Director: Dr. Mariano Jorge Levin

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET)

1996

RESUMEN

En la presente tesis, se abordó el clonado de la hsp70 de *L.(V.) peruviana* y la caracterización de la respuesta humoral en pacientes con Leishmaniasis Tegumentaria Americana, la Enfermedad de Chagas y la enfermedad mixta Chagas/Leishmaniasis.

Se determinó el tamaño del inserto de U4 en 1,6 Kpb. Se mostró que U4 presentaba un marco de lectura abierto de 525 pb. que codifican para los 174 aminoácidos C-terminales de la hsp70 de *L.(V.) peruviana*.

U4 presenta una homología de 98% con Lbb1 (97% de identidad y 1% de cambios conservativos) y con RA1 un 87% (74% de identidad y 13% de cambios conservativos).

Se determinó la organización genómica de los genes hsp70 por Southern-blot de ADN genómico de clones de *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis*. Se encontró 2 locus genómicos, uno de los cuales contenía un tandem de genes hsp70 para ambas especies de *Leishmania* sp.

Los ADNc de U4 y Lbb1 se subclonaron pGEX1λT para caracterizar la respuesta humoral en Leishmaniasis Tegumentaria Americana, Enf. de Chagas y la Inf. mixta Chagas/Espundia por Ensayo de Placa de Lisis, Western-blot y ELISA. Los resultados obtenidos por las 3 técnicas indican que U4/Lbb1 se pueden usar en el diagnóstico de L. Mucocutánea (Espundia) y junto a JL7, permitiría un diagnóstico diferencial de la enfermedad mixta Chagas/Espundia.

El clonado y la caracterización de la respuesta humoral de las proteínas ribosomales P2 de *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis*.

El clonado de las proteínas ribosomales ácidas de tipo P2 de *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis* se realizó mediante rastreo de bibliotecas de expresión en λgt11 con sondas de las proteínas ribosomales P2α y P2β de *L.(L.) infantum*.

En la biblioteca de expresión de *L.(V.) peruviana* se aisló un recombinante con cada sonda. El recombinante LbpP2α tenía un inserto de aprox. 900 pb., presentando un marco de lectura abierto de 327 pb. que codifican 108 aminoácidos, faltádole sólo los 3 primeros residuos N-terminales para estar completa.

El recombinante LbpP2α presenta una homología de aminoácidos de 95% (89% de identidad y 6% de cambios conservativos) con la proteína homóloga de *L.(L.) infantum*, un 87% (74% de identidad y 13% de cambios conservativos) con la de

T. cruzi y un 65% (44% de identidad y 21% de cambios conservativos) con la proteína P2 humana.

El otro recombinante (LbpP2β) aislado de la misma biblioteca contenía un inserto de 271 pb., presentando un marco de lectura abierto de 144 pb. que codifican los 44 últimos aminoácidos C-terminales.

Cuando se compara el recombinante LbpP2β con sus homólogas de otras especies de Trypanosomátidos, la más alta homología la presenta con la proteína ribosomal P2β de *L.(L.) infantum* con un 90% (81% de identidad y 9% de cambios conservativos), con la P2β de *T. cruzi* alcanza un 86% (78% de identidad y 8% de cambios conservativos), con la P2β de *T. brucei* un 78% (66% de identidad y 12% de cambios conservativos) y con la P2 humana un 73% (59% de identidad y 14% de cambios conservativos).

En la biblioteca de expresión de *L.(V.) braziliensis* se aisló un recombinante (LbbP2β-like) con la sonda la P2α de *L.(L.) infantum*. Este recombinante contiene un inserto de aprox. 750 pb., presentando un marco de lectura abierto de 264 pb. que codifican los 87 aminoácidos C-terminales de una proteína ribosomal P2β atípica de *L.(V.) braziliensis*. La comparación de aminoácidos es mayor con el recombinante LbpP2β con un 72% (52% de identidad y 20% de cambios conservativos), un 69% con la de *L.(L.) infantum* (49% de identidad y 20% de cambios conservativos), con la P2 humana un 64% (35% de identidad y 29% de cambios conservativos), con la *T. brucei* 58% (38% de identidad y 20% de cambios conservativos) y finalmente con la de *T. cruzi* un 53% (31% de identidad y 22% de cambios conservativos).

Al analizar la respuesta humoral de pacientes con L. Mucocutánea contra los recombinantes LbpP2α y LbbP2β-like, se vió que el epítope inmunodominante no se localiza en el extremo C-terminal, mientras que en las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*, se había determinado el extremo C-terminal como el epítope inmunodominante (péptido R-13).

De otro lado, pacientes con la Enfermedad de Chagas no reaccionaban con las proteínas ribosomales de tipo P2 de *Leishmania* sp., indicando que inducen anticuerpos *Leishmania*-específicos y que no cros-reaccionan con las de *T. cruzi*.

ABSTRACT

I have performed the cloning of the hsp70 of *Leishmania (Viannia) peruviana* (recombinant U4) and characterization of the humoral inmune response in patients with American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), Chagas' disease (CH) and the mixed infection Chagas/Leishmaniasis (CH/L) against this protein.

The recombinant U4 has an insert of 1,6 Kbp., presenting an open reading frame (ORF) of 525 bp, coding for the last 174 aminoacids.

The recombinant U4 presents a high degree of homology with the recombinant Lbb1 (C-terminal domain of the hsp70 of *L.(V.) braziliensis*) of 98% (97% identity and 1% non conservative substitutions) and with the recombinant RA1 (C-terminal domain of the hsp70 of *T. cruzi*) of 87% (74% identity and 13% non conservative substitutions).

I found two hsp70 genomic loci in the genome of the related species *L.(V.) peruviana* and *L.(V.) braziliensis* as determined by Southern blot. One locus comprised the tandem repeat of the hsp70 genes, which present a repetitive unit of 3,7 Kbp.

I have cloned the U4, Lbb1 and RA1 cDNAs in the expression vector pGEX1λT to characterize the humoral inmune response in ATL, CH and CH/L as measured by ELISA, Phage dot array immunoassay and Western blot.

I found a high reactivity of Mococutaneous Leishmaniasis sera with the U4/Lbb1 recombinant proteins, whereas most of the Cutaneous Leishmaniasis, Chagasic and non-related sera did not.

I have also cloned the ribosomal P2-type proteins of *L.(V.) peruviana* (LbpP2α and LbpP2β) and *L.(V.) braziliensis* (LbbP2β-like) by screening of the expression libraries with P2-type ribosomal proteins from *L.(L.) infantum* as probes.

The recombinant LbpP2α has an insert of 900 bp. An ORF of 327 bp, codifying 108 aminoacids, lacking the three N-terminal residues to be a full length protein. This recombinant presents an homology of 95% (89% identity and 6% conservative substitution) with the homologous of *L.(L.) infantum*, 87% of homology (74% identity and 13% conservative substitutions) with the corresponding of *T. cruzi* and 65% of homology (44% identity and 25% conservative substitutions) with the human P2 protein.

The recombinant LbpP2β has an insert of 271 bp, presenting on ORF of 144 bp, coding for the last 44 C-terminal aminoacids. It has an homology of 90% (81% identity and 9% conservative substitutions) with the corresponding of *L.(L.) infantum*, 86% of homology (78% identity and 8% conservative substitutions)

with that of *T. cruzi*, 78% of homology (66% identity and 12% conservative substitutions) with the P2β protein of *T. brucei* and 73% of homology (59% identity and 14% conservative substitutions) with the human P2 protein.

The LbbP2β-like protein has an insert of 750 bp, presenting an ORF of 264 bp. coding for the 87 C-terminal aminoacids. It has 72% of homology (52% identity and 20% conservative substitutions) with that of *L.(V.) braziliensis*, 69% (49% identity and 20% conservative substitutions) with that of *L.(L.) infantum*, 64% (35% identity and 29% conservative substitutions) with the human P2 protein, 58% (38% identity and 20% conservative substitutions) with the P2β of *T. brucei* and a 53% (31% identity and 22% conservative substitutions) with that of *T. cruzi*.

In both *Leishmania* P2 proteins (LbpP2α and LbbP2β-like) evaluated, the most antigenic epitope was not located at the C-terminus, whereas in the *T. cruzi* P2 proteins the inmunodominant epitope was the last 13 C-terminal residues (R-13 peptide).

Chagasic sera did not react with the ribosomal P2 proteins from *Leishmania* sp.

La presente tesis se la dedico con mi mayor afecto a los integrantes del laboratorio Chagas y especialmente al Dr. Mariano J. Levin por haberme permitido hacerla en su laboratorio, donde dejó una parte de mi vida, tal vez la más productiva tanto en lo científico como en lo personal. Muchas gracias a todos mis compañeros del grupo Chagas por los momentos compartidos, serán inolvidables. Quiero además hacer extensivo este agradecimiento al Dr. H.N. Torres y la Dra. Mirtha Flawiá por su apoyo constante y a mis compañeros del INGEBI por el aliento y la camaradería de siempre. Muchas gracias a todos.

MASA

Al fin de la batalla,
y muerto el combatiente, vino hacia el hombre
y le dijo: "No mueras, te amo tanto"!
Pero el cadáver ay! siguió muriendo.

Se le acercaron dos y repitiéronle:
No nos dejes! Valor! Vuelve a la vida!
Pero el cadáver ay! siguió muriendo.

Acudieron a él veinte, cien, mil, quinientos mil clamando:
"Tanto amor y no poder nada contra la muerte"!
Pero el cadáver ay! siguió muriendo.

Lo rodearon millones de individuos,
con el ruego común: "Quédate hermano"!
Pero el cadáver ay! siguió muriendo.

Entonces todos los hombres de la tierra
lo rodearon, les vio el cadáver triste, emocionado;
incorporose lentamente,
abrazó al primer hombre; echose a andar.....

Cesar Vallejo "Los heraldos negros"

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. Mariano J. Levin, mi director de tesis, por haberme recibido en su laboratorio para realizar el presente trabajo de tesis. Por los buenos momentos vividos durante este tiempo. Por su apoyo constante y la fuerza transmitida en los momentos difíciles y sobre todo por su cariño.

Al Dr. Héctor Torres y la Dra. Mirtha Flawiá por haberme permitido realizar este trabajo en el INGEBI y por la permanente cordialidad y aliento hacia mi persona.

Al Dr. Jorge Arévalo porque a su lado aprendí a amar la ciencia y aunque tengamos puntos de vista diferentes nos une una fraternal amistad.

Al Dr. Humberto Guerra, mi asesor en Lima, por la confianza que deposito en mí y por su inagotable entusiasmo aún en los peores momentos.

A mis compañeros del grupo Chagas: Gabriela Levitus, Alejandro Schijman, Dan Kaplan, Martín Vazquez, Inés Ferrari, Pablo Lopéz Bergami, Sergio Ghío, Hernán Lorenzi, Silvia Brandáriz, Pablo Arteman, Claudia Ben Dov, Cecilia Medrano, Francisco Quintana, Evelyn Mahler, Myriam Rivas, Oscar Filevich y Sonia Lafón, por todas las horas compartidas y por su apoyo constante. Muchas gracias de corazón por su ayuda, sin la cual no hubiese terminado la presente tesis a tiempo.

A los ex-integrantes del grupo Chagas: Enrique Mesri, Patricia Levy-Yeyati, Reinaldo Rossi, Nelson Dusseti, Cristina Michailoff, Adriana Urman por los momentos compartidos.

A Alberto Korhnblitt, Alejandro Mentaberry, Gerardo Glikin, Marcelo Rubinstein y Alejandro Paladini por su amistad y afecto.

A mis compañeros y amigos del INGEBI: Horacio, Jorge, Anabella, Marisa, Adolfo, Paula, Claudio, Santiago, Gustavo, Gustavito, Susana, Juan, Marcelo, Verónica, Tomás, Larisa, Fernando, Silvia, Florencia, Gabi, Pablo, Barbara, Ken, Marcelo,

Luciana, Gustavo, Albertito, Andrea, Joaquín, Claudio, Cristina, Guillermo, Rita, Eliana, Gustavo, Gabriel, Marcelita, Irma, Mariano, Mónica, Marta, Tito, Leonor, Mari, Norberto y Nene por los momentos compartidos.

A los ex-Ingebianos Diego, Claudia, Omar, Andrés, Mercedes, Sandra, Malala, Nora.

A la Dra. Ysabel Montoya por su cariño y apoyo constantes. Gracias a ella pude continuar con la tesis. Gracias por todo.

A mis compañeros del Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt": Martín, Hélmer, Maggie, Carlos, Eva, Lucho, Juan Carlos, Kike, Rocio, Mickie, Rosita, Vicky, Carlitos, Edgar, Marissa, Yane, Juanita, Sonia, Juana y Cecilia por su amistad y constante apoyo.

A mis amigos de todos lados del continente: Susana Revollo, Carlos Jaramillo, Adeilton Alves Bradao, Miguel Angel Chiurillo, J.C. Aguillón, Juan Venegas, Erik Diaz, Alain Debraban porque alguna vez nuestras vidas se cruzaron y conservo la cálida amistad de esos momentos y ojalá alguna vez nos volvamos a ver.

APOYO INSTITUCIONAL

- UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR).

- Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

- Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad de Buenos Aires.

- Convenio de Cooperación INSERM (Institut Nacional de la Santé et de la Recherche Medicale, Francia) - CONICET.

- Convenio de Cooperación CNRS (Centre Nationale pour la Recherche Scientifique, Francia) - CONICET.

- Ministere d' Affaires Etrangeres, France, Cooperation Regionale Francaise, Embajada de Francia en Argentina.

- UNIDO/ICGEB-ARG91-01 Collaborative Research Programme.

- Programa Iberoamericano de Ciencia y Técnica para el Desarrollo (CyTED).

- Comunidad Económica Europea. Proyecto N° 936018.

- Fundación Antorchas.

La presente tesis fue financiada por la Organización Mundial de la Salud a través del UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Disease (TDR) de la cual fui becario.

PUBLICACIONES REALIZADAS DURANTE EL PERIODO DE TESIS

Levy-Yeyati P., Bonnefoy S., Mirkin G., Debrabant A., Lafon S., **Panebra A.**, Gonzalez-Cappa S.M., Dedet J.P., Hontebeyrie-Joskowicz M. and Levin M. (1991). The 70 kDa heat-shock protein is a major antigenic determinant in human *Trypanosoma cruzi/Leishmania braziliensis braziliensis* mixed infection. Immunol. Lett. 31:27-34.

Vázquez M., Schijman A.G., **Panebra A.** and Levin M. (1992). Nucleotide sequence of a cDNA encoding another *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P2 type protein (TcP2b). Nucl. Acid. Res. 20:2893.

Panebra A., Kaplan D. and Levin M. (1992). Anti-hsp70 response in human *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania braziliensis braziliensis* mixed infection: generation of anti-hsp70 auto-antibodies. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 87:12.

Levin M.J., Kaplan D., Ferrari I., Arteman P., Vazquez M., **Panebra A.** (1993). Humoral autoimmune response in Chagas' disease: The *Trypanosoma cruzi* ribosomal antigens as immunizing agents. FEMS Microbiol. Medical Immunol. 7:205-210.

Panebra A., López Bergami P., Levy-Yeyati P., Levitus G., Schijman A., Montoya Y. and Levin M. (1996). The heat shock protein 70 kDa of *L.(V.) braziliensis* is a major antigen in *Leishmania* infection. En preparación.

Panebra A., López Bergami P., Levitus G., Schijman A., Quintana F. and Levin M. (1996). Cloning and immunological characterization of the ribosomal P proteins of *L.(V.) peruviana* and *L.(V.) braziliensis*. En preparación.

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL TEXTO

aa	aminoácido
AcM	anticuerpo monoclonal
ADN	ácido desoxiribonucleico
ADNc	ácido desoxiribonucleico copia
ARN	ácido ribonucleico
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
β-gal	beta galactosidasa
BSA	sero albúmina bovina
DO	densidad óptica
ELISA	ensayo inmunoenzimático en fase sólida
ECh	Enfermedad de Chagas
EPL	Ensayo de placa de lisis
xg	gravedades
GST	Glutation-S-Transferasa de *Schistosoma japonicum*
HCl	ácido clorhídrico
hs	horas
IM	infección mixta *L.(V.) braziliensis*/*T. cruzi*
JL5	proteína ribosomal P2β de *T. cruzi*
JL7	proteína del citoesqueleto de *T. cruzi*
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
Lbb1	porción C-terminal de la HSP70 de *L.(V.) braziliensis*
LbbP2β	proteína ribosomal P2β de *L.(V.) braziliensis*
LbpP2α	proteína ribosomal P2α de *L.(V.) peruviana*
LbpP2β	proteína ribosomal P2β de *L.(V.) peruviana*
LCA	Leishmaniasis cutánea andina
LCS	Leishmaniasis cutánea selvática
LES	Lupus eritematoso sistémico
LMC	Leishmaniasis mucocutánea selvática
min	minutos

mg	miligramo
ml	mililitro
mM	milimolar
nm	nanómetro
OMS	Organización Mundial de la Salud
O.N	por toda la noche
RA1	porción C-terminal de la HSP70 de *T. cruzi*
rpm	revoluciones por minuto
SDS	dodecil sulfato de sodio
Tc C-P0	proteína ribosomal P0 de *T. cruzi*
µg	microgramo
µM	micromolar

ÍNDICE

INDICE GENERAL

		Pág.
1)	**INTRODUCCION**	
1.1)	Leishmaniasis	1
1.1.1)	Clasificación del género *Leishmania* Ross, 1903	1
1.1.2)	El parásito	2
1.1.3)	Tipos de Leishmaniasis	3
1.1.3.1)	Leishmaniasis Cutánea	3
1.1.3.2)	Leishmaniasis Visceral	3
1.1.3.3)	Leishmaniasis Cutánea Difusa	4
1.1.3.4)	Leishmaniasis Mucocutánea	5
1.1.4)	Leishmaniasis en el Perú	7
1.1.4.1)	La Leishmaniasis en la historia peruana	7
1.1.4.2)	Especies de *Leishmania* en Perú	7
1.1.4.2.1)	Leishmaniasis Cutánea Andina (Uta)	9
1.4.2.2)	Leishmaniasis Mucocutánea (Espundia)	10
1.1.5)	Diagnóstico de Laboratorio	11
1.1.6)	Tratamiento	12
1.1.7)	Algunos antígenos importantes de *Leishmania* sp.	12
1.1.7.1)	Glicoproteína de 63 kDa (Gp63)	12
1.1.7.2)	Proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70)	14
1.1.7.3)	Proteínas Ribosomales P	19
1.1.7.4)	Glicoconjugado de superficie: Lipofosfoglicano (LPG)	21
1.1.8)	La genética de *Leishmania*	23
1.1.8.1)	La organización del ADN genómico	23
1.1.8.1.1)	ADN nuclear	24
1.1.8.1.2)	ADN del kinetoplasto	24
1.1.8.1.3)	ADN circular extracromosómico	25
1.1.9)	Los antígenos de *Leishmania* y la respuesta inmune a la infección	25
1.1.9.1)	La respuesta inmune a la infección y autoinmunidad	25
1.1.9.2)	Vacunación e Inmunoprofilaxis	27

1.2)	La Enfermedad de Chagas	29
1.2.1)	Epidemiología	29
1.2.2)	Vías de infección y ciclo de vida	29
1.2.3)	Fases de la Enfermedad de Chagas	31
1.2.3.1)	La fase aguda	31
1.2.3.2)	La fase crónica	31
1.2.4)	*Trypanosoma cruzi*	32
1.2.4.1)	Ubicación sistemática	32
1.2.4.2)	Características del género *Trypanosoma*	33
1.2.4.2.1)	Grupo Salivaria	33
1.2.4.2.2)	Grupo Estercoraria	33
1.2.5)	Características de *Trypanosoma cruzi*	33
1.2.5.1)	Formas de desarrollo de *T. cruzi*	33
1.2.5.1.1)	Epimastigote	34
1.2.5.1.2)	Tripomastigote	34
1.2.5.1.3)	Amastigote	34
1.2.5.2)	Hospedador	34
1.2.5.2.1)	Hospedador vertebrado	34
1.2.5.2.2)	Hospedador invertebrado	35
1.2.6)	Estrategias de evasión parasitaria frente a la respuesta inmune del hospedador	35
1.2.7)	Respuesta inmune del hospedador al parásito	36
1.2.7.1)	Estudio de la respuesta humoral en la Enfermedad de Chagas	37
1.2.8)	Antígenos de *Trypanosoma cruzi*	38
1.2.8.1)	Antígeno JL7	39
1.2.8.2)	Antígeno JL5	39
1.2.8.3)	Glicoproteínas mayores de superficie	40
1.2.8.4)	Antígenos involucrados en la inmunoprotección	41
1.2.8.5)	Antígenos involucrados en la inmunopatogénesis	42
1.3)	Infección mixta Leishmaniasis Mucocutánea/Enfermedad de Chagas	44
2)	**OBJETIVOS**	46

3)	**MATERIALES Y METODOS**	
3.1)	Bacterias y fagos	48
3.2)	Sueros y anticuerpos	49
3.2.1)	Sueros de pacientes con Leishmaniasis, Enfermedad de Chagas y otras enfermedades	49
3.2.2)	Anticuerpos monoclonales	50
3.3)	Parásitos	50
3.4)	Métodos generales de análisis y purificación de ácidos nucleicos	51
3.4.1)	Aislamiento de ácidos nucleicos de *Leishmania*	51
3.4.1.1)	Extracción de ADN genómico	51
3.4.1.2)	Extracción de ARN total	51
3.4.1.3)	Cuantificación del ADN y ARN	52
3.4.2)	Digestión de ADN genómico y ADN plasmídico con endonucleasas de restricción	52
3.4.3)	Electroforesis en geles de agarosa	52
3.4.4)	Recuperación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa de bajo punto de fusión	53
3.4.5)	Transferencia de moléculas de ADN en geles de agarosa a membranas de Nylon (Southern blot)	54
3.4.6)	Preparación de sondas radioactivas	55
3.4.7)	Hibridización con sondas radioactivas	55
3.5)	Métodos generales para el análisis de proteínas	56
3.5.1)	Dosaje de proteínas	56
3.5.2)	Preparación de extractos totales de *Leishmania sp.* y *T. cruzi:*	56
3.5.3)	Electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE)	56
3.5.4)	Tinción de geles con Azul de Coomasie	58
3.5.5)	Marcadores de peso molecular para SDS-PAGE	58
3.5.6)	Western-Blot	58
3.5.7)	Ensayos de ELISA	59
3.6)	Construcción de la biblioteca de ADNc de promastigotes de *L.(V.) peruviana* en λgt11	60

3.6.1)	Purificación de los ARN poliadenilados a través de columnas de oligo(dT)-celulosa	60
3.6.2)	Síntesis de ADNc	61
3.6.3)	Análisis de la síntesis de los productos de ADNc	62
3.6.4)	Clonado de los ADNc en el vector de expresión λgt11	62
3.6.4.1)	Ligación de los adaptadores Eco RI a los ADNc	62
3.6.4.2)	Purificación por columna/fraccionamiento de los ADNc-adaptadores	63
3.6.4.3)	Ligación de los ADNc-adaptadores a los brazos del vector λgt11	63
3.6.4.4)	Empaquetamiento *in vitro* de los fagos	63
3.6.5)	Análisis de los fagos recombinantes	64
3.6.5.1)	Crecimiento y preparación de bacterias competentes para plaquear fagos	64
3.6.5.2)	Plaqueo de fagos	64
3.6.5.3)	Titulación de los fagos recombinantes	64
3.6.5.4)	Amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	65
3.6.5.5)	Amplificación de la biblioteca de ADNc	66
3.6.6)	Preparación en gran escala de ADN de fagos λgt11	66
3.6.7)	Rastreo inmunológico de la biblioteca de ADNc	67
3.6.7.1)	Método de rastreo	67
3.6.7.2)	Inmunopurificación de anticuerpos contra proteínas recombinantes	67
3.6.7.3)	Preparación de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para λgt11 salvaje	68
3.6.8)	Rastreo de la biblioteca con sondas marcadas radioactivamente	68
3.6.9)	Aislamiento de los clones recombinantes positivos de λgt11	69
3.6.10)	Ensayo de placa de lisis	69
3.7)	Producción de proteínas de fusión	70
3.7.1)	Subclonado de ADNc en pGEX1λT	70
3.7.2)	Preparación de células competentes y transformación	72
3.7.3)	Producción en gran escala de la proteína de fusión	73
3.8)	Secuenciamiento de los clones recombinantes	74
3.8.1)	Subclonado en los vectores M13mp18 y pGEM3zf(+)	74
3.8.2)	Preparación del ADN para secuenciación	75
3.8.2.1)	Preparación del ADN del fago M13	75
3.8.2.2)	Preparación de plásmidos	75

3.8.3)	Secuenciación manual	76
3.8.4)	Secuenciación automática	79
3.9)	Análisis estadísticos	80
3.10)	PCR de suero de pacientes con la infección mixta *L.(V.) braziliensis*/*T. cruzi*	81
3.10.1)	PCR de *Leishmania* spp	81
3.10.1.1)	Condiciones del PCR	81
3.10.2)	PCR de *T. cruzi*	82
3.10.2.1)	Condiciones de PCR	82
3.11)	Digitalización de las figuras	82
4)	**RESULTADOS**	
4.1)	Respuesta humoral en Leishmaniasis Cutanea Andina (LCA), Leishmaniais Cutanea Selvatica (LCS), Leishmaniasis Mucocutanea (LMC), ia infeccion mixta *Leishmania (Viannia) braziliensis*/*Trypanosoma cruzi* (IM) y la Enfermedad de Chagas (ECh)	83
4.2)	Construcción de una biblioteca de expresión en λgt11 de *L. (V.) peruviana*	89
4.3)	Clonado y caracterización de la hsp70 de *L.(V.) peruviana*	90
4.3.1)	Aislamiento del clon U4	90
4.3.2)	Secuenciación del clon U4	90
4.3.3)	Organización genómica del locus hsp70 en *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis*	101
4.3.4)	Subclonado y expresión de las HSP70 de *Leishmania (Viannia) peruviana* y *L.(V.) braziliensis* en cultivos bacterianos	102
4.3.5)	Reactividad humoral contra el recombinante U4 en diferentes infecciones	104
4.3.5.1)	ELISA	105
4.3.5.2)	Ensayo de Placa de Lisis (EPL)	109
4.3.5.3)	Western Blot	115
4.3.5.4)	Análisis por PCR	119
4.4)	Proteínas ribosomales de tipo P2 de *L.(V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis*	121
4.4.1)	Clonado de las proteínas ribosomales P2α y P2β de *L. (V.) peruviana* y de la proteína P2β de *L. (V.) braziliensis*	121
4.4.1.1)	Proteína ribosomal P2α de *L.(V.) peruviana*	121

4.4.1.2)	Proteína ribosomal P2β de *L.(V.) peruviana*	126
4.4.1.3)	Proteína ribosomal P2β de *L.(V.) braziliensis*: Una proteína ribosomal que rompe un dogma	128
4.4.2)	Antigenicidad de las proteínas ribosomales P2α de *L.(V.) peruviana* y P2β de *L. (V.) braziliensis*	132
5)	**DISCUSION**	
5.1)	La respuesta humoral	141
5.2)	Parásito y respuesta humoral	142
5.2.1)	Reactividad anti-HSP70	143
5.3)	Leishmaniasis-Enfermedad de Chagas: Diferenciación serológica	144
5.4)	Proteinas ribosomales P2 de *Leishmania* sp.	145
5.5)	Formulación de un ensayo diferencial	147
5.5.1)	Modelos de reacción por EPL para los sueros de pacientes leishmánicos, chagásicos y lúpicos con los recombinantes U4, LbpP2α, LbbP2β, JL7, JL5 y Tc C-P0	149
5.5.2)	Modelos de reacción por ELISA para los sueros de pacientes leishmánicos, chagásicos y con la infección mixta con los recombinantes U4, LbpP2α, LbbP2β, JL7, JL5 y Tc C-P0	150
5.6)	La infección mixta (IM)	151
5.7)	Los recombinantes LbpP2α, LbpP2β y LbbP2β	152
6)	**CONCLUSIONES**	155
7)	**BIBLIOGRAFIA**	157
8)	**APENDICE**	197

INTRODUCCIÓN

Leishmaniasis

1.1) Leishmaniasis

La infección por *Leishmania* sp, comprende un grupo de enfermedades que afectan aproximadamente 88 países, de los cuales 16 son países en vías de desarrollo. Se calcula que hay 12 millones de personas infectadas en el mundo y 350 millones en riesgo de infección. Entre 1,5 y 2 millones de personas se infectan cada año (WHO report, 1975-94).

Las *Leishmania* spp son parásitos kinetoplástidos unicelulares que pueden infectar humanos, animales y plantas y son transmitidas por insectos flebótomos de los géneros *Lutzomyia* spp y *Phlebotomus* spp (Nuevo y Viejo Mundo, respectivamente).

Varias formas clínicas de la infección en el hombre han sido descriptas, siendo el principal síntoma de la enfermedad un absceso en la piel, usualmente en el sitio de la picadura del insecto (Leishmaniasis cutánea). El parásito puede también diseminarse infectando la mucosa nasal y oral (Leishmaniasis mucocutánea), u órganos internos (Leishmaniasis visceral) (Lainson y Shaw, 1987).

La severidad de las infecciones por *Leishmania* sp. es variable, dependiendo de la constitución genética del parásito, estado de salud y la constitución genética del hospedador y la eficiencia de la respuesta inmunológica del hospedador contra el parásito.

La Leishmaniasis ha sido reconocida como un problema de salud pública mundial e incluida como una de las 6 enfermedades seleccionadas por la UNDP/WORLD BANK/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR) para ser combatidas preferencialmente.

1.1.1) Clasificación del género *Leishmania*

Esta clasificación fue sugerida por Lainson y Shaw, 1987.

Reino: Protista, Haeckel, 1866.
Sub-reino: Protozoa, Goldfuss, 1817.
Filum: Sarcomastigophora, Honigberg y Balamuth, 1963.
Sub-filum: Mastigophora, Deising, 1866.
Clase: Zoomastigophorea, Calkins, 1909.

Orden: Kinetoplastida, Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976.
Sub-orden: Trypanosomatina, Kent, 1880.
Familia: Trypanosomatidae, Doflein, 1901, emend. Grobben, 1905.
Género: *Leishmania,* Ross, 1903.

1.1.2) El parásito

Leishmania es un organismo unicelular que presenta dos estadíos morfológicos durante su ciclo de vida: promastigotes y amastigotes (Fig. 1) Los amastigotes son ingeridos junto con la sangre durante la alimentación del flebótomo y se transforman en una forma mótil flagelada (promastigotes) en una porción del intestino del vector donde se multiplican y migran hacia la proboscis (Molyneux y Killick-Kendrick, 1987).

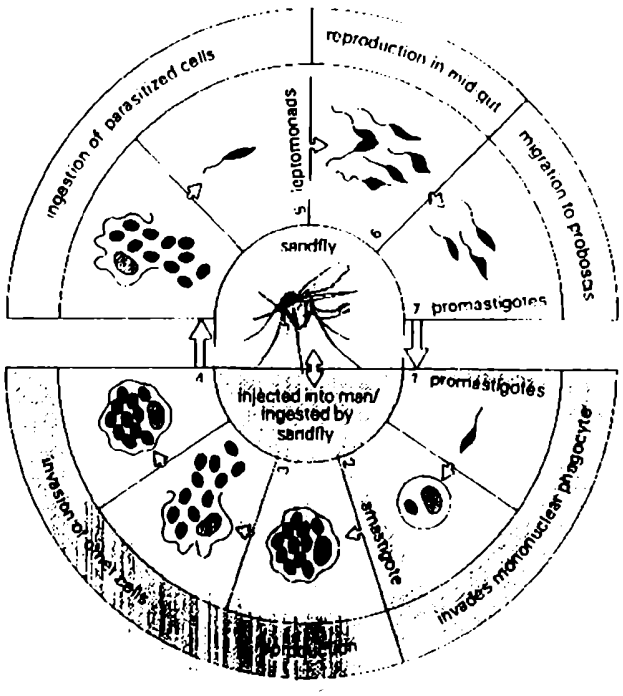


Fig. 1 Ciclo de vida de *Leishmania* spp

Durante su ciclo de vida los promastigotes no infectivos de la fase logarítmica de la curva de crecimiento pasan a parásitos metacíclicos de la fase estacionaria, muy

infectivos. Esto ha sido demostrado para *L.(L.) major* (Sacks y Perkins, 1984), *L.(L.) donovani* (Giannini, 1974; Howard y col., 1987), *L.(L.) mexicana* (Mallison y Coombs, 1989) y *L.(V.) braziliensis* (Kweider y col., 1987).

Los antígenos del parásito podrían jugar un rol crucial en la invasión, supervivencia y mantenimiento dentro del macrófago del hospedador. La forma en que estos antígenos son procesados y presentados por el sistema inmune del hospedador podría determinar la severidad de la forma clínica de la enfermedad

1.1.3) Tipos de Leishmaniasis

1.1.3.1) Leishmaniasis Cutánea

En el Nuevo y Viejo Mundo, la Leishmaniasis Cutánea (LC) afecta a 61 países, con aproximadamente 200 millones de personas en riesgo de infección y 300,000 casos informados anualmente (Ashford y col., 1992). En el Nuevo Mundo, los casos de Leishmaniasis Cutánea son principalmente causados por miembros de los complejos *L.(V.) braziliensis* y *L.(L.) mexicana* (Lainson y Shaw, 1987; WHO report, 1990). Las principales *Leishmania* patógenas para el hombre, responsables de una variedad de diferentes manifestaciones clínicas de la enfermedad son: *L.(V.) peruviana* asociada con "Uta", *L.(V.) braziliensis* para las Leishmaniasis Cutánea y Mucocutánea, *L.(V.) guyanensis* asociada con "Pian Bois", *L.(V.) panamensis* asociada con Leishmaniasis Cutánea Panamensis, *L.(L.) mexicana* asociada a la "Ulcera del Chiclero" y *L.(L.) amazonensis* para Leishmaniasis Cutánea y Cutánea Difusa.

En el Viejo Mundo, las lesiones de Leishmaniasis Cutánea se pueden curar espontáneamente, la cual está asociada con *L.(L.) major* o pueden producir Leishmaniasis Cutánea Recidivante como por ejemplo: *L.(L.) tropica*.

1.1.3.2 Leishmaniasis Visceral

La Leishmaniasis Visceral (LV) origina cuadros de máxima gravedad y la enfermedad (Kala-azar) es fatal si no se trata. La LV afecta 47 países, aproximadamente 180 millones de personas corren riesgo de infección y 88.500 casos nuevos son informados anualmente (Ashford y col., 1992).

Se manifiesta en general como una infección suave, asintomática u oligosintomática. Sin embargo, un cierto porcentaje de individuos infectados desarrollan la enfermedad (WHO report, 1990).

En el Nuevo Mundo, *L.(L.) chagasi* es el agente causal de la Leishmaniasis Visceral Americana, mientras que en el Viejo Mundo los agentes etiológicos de LV son miembros de las especies de *L.(L.) donovani* y *L.(L.) infantum* (WHO report, 1990).

En los países mediterráneos los perros son el principal reservorio para *L.(L.) infantum*. Entre el 5-15% de los perros están infectados, hecho que constituye un serio problema de salud veterinaria.

Leishmania sp en LV es también parásito oportunista de pacientes inmunosuprimidos, principalmente con SIDA abriendo nuevas perspectivas epidemiológicas (Alvar y col., 1992).

1.1.3.3) Leishmaniasis Cutánea Difusa

La Leishmaniasis Cutánea Difusa (LCD) en el Nuevo Mundo es causada por *L.(L.) amazonensis* (Grimaldi y col., 1987; Franke y col., 1990; Dujardin y col., 1995). La LCD es rara, pero es la más seria de todas las Leishmaniasis cutánea. En los casos graves las lesiones cubren una gran parte del cuerpo, nunca curan sin tratamiento, y la gran mayoría de los casos presentan recaídas, aún si son tratados. Los casos extremos de la LCD en el Viejo Mundo son causados por *L.(L.) aethiopica*.

1.1.3.4) Leishmaniasis Mucocutánea (LMC)

La Leishmaniasis Mucocutánea, también conocida como "Espundia", es causada por *L.(V.) braziliensis* y empieza con una úlcera en la piel con los bordes elevados, poco dolorosa. Es posible encontrar lesiones múltiples en el cuerpo. Meses o años después pueden sobrevenir lesiones extensivas y mutilantes. Las lesiones del cartílago de la nariz o de la oreja, de los labios y de la mucosa orofaríngea son típicas, también reciben el nombre de lesiones metastásicas (TDR progress, 1975-94). Las lesiones mucosas son generalmente refractarias a la quimioterapia (Rucha y col., 1983). En las Figs. 2 y 3 se muestran la distribución mundial y en el Nuevo Mundo de *Leishmania* sp.

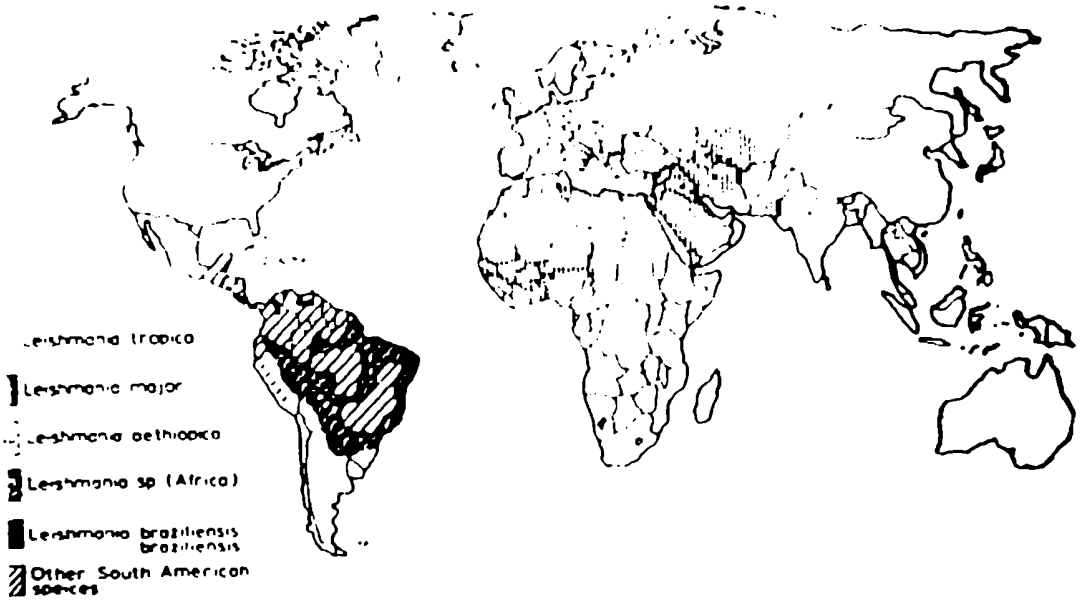


Fig. 2 Distribución de las Leishmaniasis en el mundo.

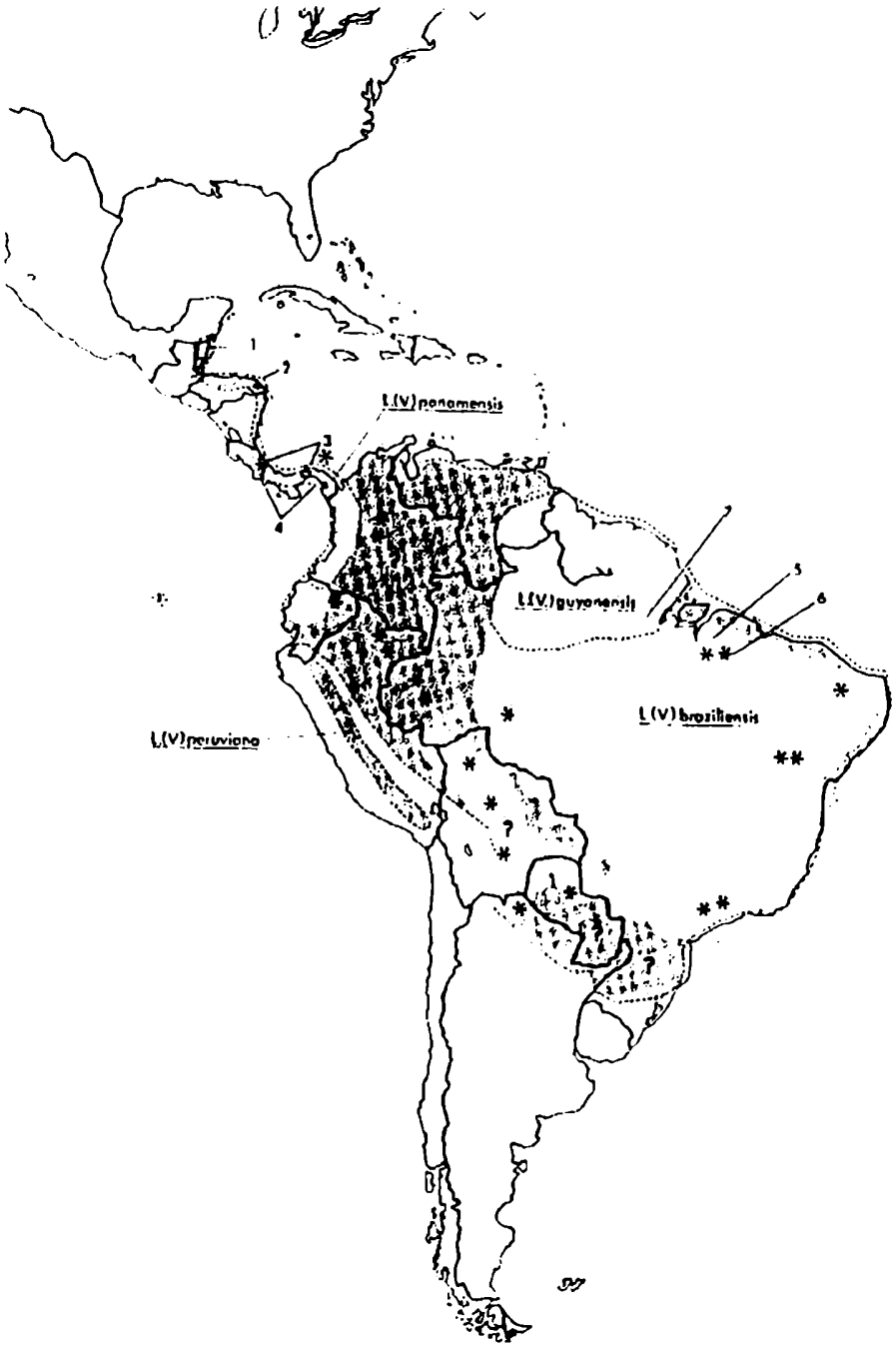


Fig. 3 Distribución de las Leishmaniasis del Nuevo Mundo

1.1.4) Leishmaniasis en el Perú

La Leishmaniasis son un serio problema de salud en las áreas rurales del Perú. Aproximadamente, 10.000 nuevos casos de Leishmaniasis se presentan anualmente, donde el 90% desarrollarán la forma cutánea de la enfermedad, mientras que el 10% restante exhibirá la forma mucocutánea. De estos casos mucocutáneos, se calcula que un 30% serán refractarios al tratamiento quimioterapéutico convencional (Llanos-Cuentas, comunicación personal).

1.1.4.1) La Leishmaniasis en la historia peruana

Enfermedades cutáneas y mucocutáneas semejantes a Leishmaniasis fueron descriptas por los habitantes locales, cronistas y exploradores del antiguo Perú. La mayoría de los informes son incompletos y correlacionan con la sintomatología de la Leishmaniasis, así como también los cerámicos de las culturas pre-incaicas muestran lesiones de piel que se asemejan a Leishmaniasis activa (Lumbreras y Guerra, 1985).

1.1.4.2) Especies de *Leishmania* en Perú

Cinco especies del género *Leishmania* han sido identificadas como causantes de la enfermedad en el Perú.

L.(L.) amazonensis, Lainson y Shaw, 1972.
L.(V.) braziliensis, Viannia, 1911, emend. Matta, 1916.
L.(V.) guyanensis, Floch, 1954.
L.(V.) lainsoni, Silveira, Shaw, Braga e Ishikawa, 1987.
L.(V.) peruviana, Vélez, 1913.

En el territorio peruano se han detectado principalmente dos formas clínicas: La Leishmaniasis Cutánea Andina (LCA), comúnmente conocida como "Uta" y la Leishmaniasis Mucocutánea (LMC) conocida como Espundia (Fig. 4).

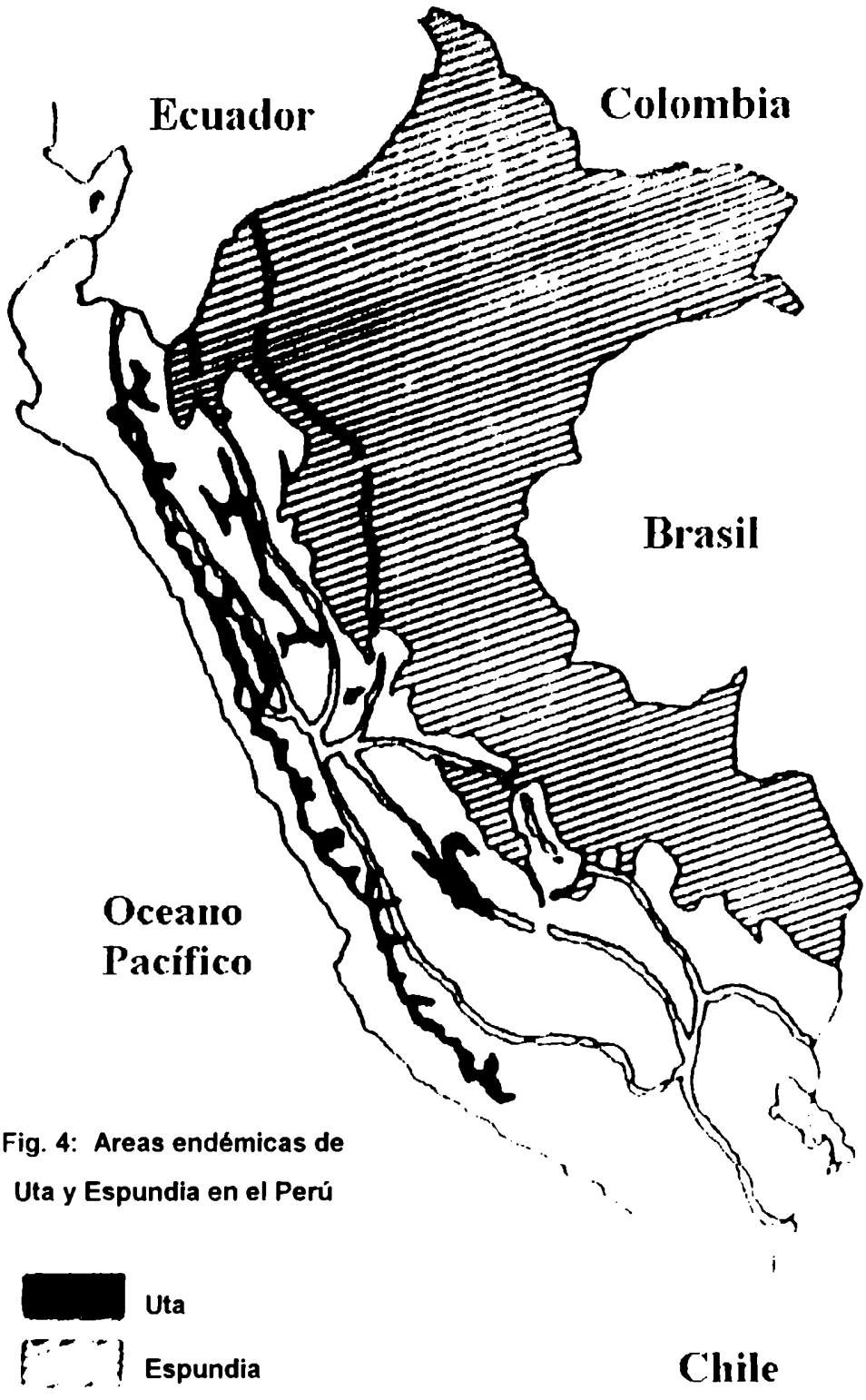


Fig. 4: Areas endémicas de
Uta y Espundia en el Perú

1.1.4.2.1) Leishmaniasis Cutánea Andina (LCA)

La Leishmaniasis Cutánea Andina (Uta) produce lesiones cutáneas benignas que se pueden autocurar y presentan una buena respuesta al tratamiento quimioterapéutico. Usualmente hay una lesión simple que podría presentar un desarrollo mucoso debido a la extensión de la lesión.

La clasificación del agente causal de Uta fue confuso. Primero fue clasificada como *L. peruviana* (Velez, 1913), luego como *L. tropica* (Hoeppli, 1969; Hommel, 1978), como *L. braziliensis* (Lainson y col., 1969; Lainson y Shaw, 1972), como *L. mexicana* (Kreutzer y col., 1983) y finalmente, se identificó a *L.(V.) peruviana* como el agente causal de la enfermedad (Arana y col., 1990).

La enfermedad se encuentra ampliamente distribuida en los valles de la vertiente occidental de la cordillera de los Andes, desde el norte del Perú hasta aproximadamente 15°C latitud sur, en especial en los valles interandinos; a altitudes de 600 a 3.200 mts. La más alta incidencia se observa entre los 1.800-2.400 metros de altitud. Esta distribución podría ser dependiente de la altitud, temperatura y lluvia, las cuales limitarían la distribución del vector.

La denominación de "Uta" a la LCA se refiere al nombre con que los nativos llaman al vector que transmite la enfermedad y sería un diminutivo ("ut") del vocablo quechua "utasca" que significaría "picar". El pensamiento popular era que la Uta era un insecto, mosquito venenoso o mosca, al cual no se lo podía ver y que actuando después del crepúsculo, se alimentaba de animales muertos en estado de putrefacción y al picar a las personas producía úlceras que luego necrosaban la piel (Pérez J.E, Tesis doctoral, 1995). Los vectores infectados con *L.(V.) peruviana* son: *Lutzomyia ayacuchensis* (Dujardin y col., 1993), y *Lu. peruensis* y *Lu. verrucarum* (Pérez y col., 1994).

La enfermedad se caracteriza por la presencia de úlceras pequeñas que se desarrollan lentamente involucrando el sistema linfático y que al extenderse producen cicatrices grandes. Las úlceras presentan los bordes elevados, no comprometen las mucosas y se curan espontáneamente.

Como los niños son los principales afectados por la enfermedad se pensó que la transmisión era principalmente intradomiciliaria (Weiss, 1943; Herrer, 1962).

El reservorio del parásito no está aún bien definido, pero la infección por *L. (V) peruviana* ha sido descripta en perros (Herrer, 1951), en los roedores *Phyllotis andium* y *Akodon mollis* y la comadreja *Didelphis albiventris* (Llanos y Davies, 1992).

1.1.4.2.2) Leishmaniasis Mucocutánea (Espundia)

La otra forma de Leishmaniasis en Perú se llama "Espundia". La enfermedad se distribuye en la selva amazónica y en la vertiente oriental de la cordillera andina, a altitudes de 1.300 mts sobre el nivel del mar. *L.(V.) braziliensis* es el agente causal de la infección (Arana y col., 1990).

La Espundia típica produce lesiones diseminadas, que pueden involucrar las mucosas nasal y faríngea, algunas veces con destrucción severa del septum nasal y aún extendiéndose a la laringe. Todo esto es principalmente un estadío secundario de la enfermedad que aparece algún tiempo después de una úlcera cutánea inicial y crece más rápidamente que la Uta, llegando a ser mucho más grande.

La gente que vive en las áreas endémicas a LMC, también conocida como Espundia, Jucuya o Tiac-araña piensan que la enfermedad es causada por la picadura de un insecto o araña conocida como "tiac-araña" (Pérez J.E, Tesis doctoral, 1995). Otra versión que circula respecto al origen del nombre Espundia se remonta a la época colonial, cuando los españoles al conquistar el Imperio Incaico trajeron caballos, algunos de los cuales presentaban una enfermedad que atacaba la mucosa nasal y oral que se llamaba "Esponhia" y a la enfermedad en humanos por degeneración de la palabra original y por su analogía a la enfermedad de los equinos se le denominó "Espundia" (Llanos-Cuentas, comunicación personal).

En el Perú, el vector de la enfermedad es desconocido y es un tema a dilucidar. La mayoría de las especies de *Lutzomyia* sp. antropofílicas que se localizan en la cuenca amazónica peruana han sido encontradas infectadas con *Leishmania* (Christensen y col., 1983; Rangel y col., 1984; Killick-Kendrick, 1990).

El reservorio también es desconocido. Sólo un aislado de *Leishmania* sp fue obtenido de *Proechimys* sp en el departamento de Loreto (Braga, 1987).

1.1.5) Diagnóstico de Laboratorio

Los métodos clásicos utilizados para demostrar en forma directa la presencia del parásito en los tejidos o lesiones de piel son los siguientes:

a) análisis de gota gruesa o secciones histológicas.
b) inoculación de hámster con aspirados de tejido infectado o con fragmentos de tejido homogenizado.
c) cultivo *in vitro* de homogenatos de tejido o aspirados en medio bifásico.

Los métodos indirectos actualmente empleados en el diagnóstico de la infección por *Leishmania* están basados en técnicas serológicas e incluyen el ELISA (Badaro y col., 1986; El Safi y Evans, 1989; Reed y col., 1990), el test de aglutinación directa (El Safi y Evans, 1989; Mengistu y col., 1990; Zijlstra y col., 1992), el inmunoblot (Mengistu y col., 1992; Reed y col., 1987) y la inmunofluorescencia (Harith y col., 1987; Walton, 1970).

El test de Montenegro (Delayed Type Hipersensitivity), el cual mide la reacción de Hipersensibilidad Retardada o la respuesta celular a antígenos derivados de *Leishmania* sp es usado en el diagnóstico clínico de la enfermedad y en rastreos epidemiológicos (Manson-Bahr, 1987; Grimaldi y McMahon-Pratt, 1991; Palma y Gutierrez, 1991). No obstante, el test de Montenegro no logra distinguir entre la infección por *Leishmania* activa o curada (Walton, 1970; Manson-Bahr, 1987; Weigle y col., 1991).

Recientemente, nuevas metodologías han sido desarrolladas usando antígenos recombinantes en el inmunodiagnóstico de Leishmaniasis (Montoya Y. Tesis doctoral, 1993).

La identificación temprana de las especies causales es muy importante especialmente en las formas mucocutáneas y viscerales de la enfermedad porque determinan el adecuado tratamiento quimioterapéutico a usar.

1.1.6) Tratamiento

El tratamiento de la enfermedad está basado en el uso de drogas leishmanicidas, principalmente inyecciones de compuestos derivados de antimonio pentavalente (Sb^5), los cuales a pesar de sus propiedades tóxicas, continúan siendo el tratamiento de elección (WHO,1982, 1991; Herwaldt y Berman, 1992). El uso de 20 mg Sb^5/Kg/día fue recomendado para el tratamiento de LV, LC y LMC (WHO Expert Committee, 1990; Herwaldt y Berman, 1992) con una dosis diaria máxima de 850 mg. Datos recientes indican que la respuesta a Sb^5 es mejor con dosis diarias más altas e incrementando el tiempo de tratamiento, pero los efectos colaterales (artralgias, mialgias, y toxicidad hepática, cardiaca y renal) son también mayores.

1.1.7) Algunos antígenos importantes de *Leishmania* sp.

Entre algunos de los antígenos caracterizados de *Leishmania* figuran los siguientes: gp63, hsp70, proteínas ribosomales ácidas.

1.1.7.1) Glicoproteína de 63 kDa (Gp63)

La proteína mayoritaria de la superficie de *Leishmania*, llamada gp63 es una glicoproteína de 63.000 Da anclada a la membrana por GPI (Bodier, 1987; Button y Mc. Master, 1988; Bouvier y col., 1989; Chaudhuri y col., 1989). La gp63, además es una zinc-metaloproteinasa (Bouvier y col., 1989; Chaudhuri y col., 1989) con un amplio rango de especificidad de substratos y pH (Chaudhuri y Chang, 1988; Ip y col., 1990; Bouvier y col., 1990). Está codificada por múltiples genes ordenados en tandem en número de 6 en *L.(L.) major* a doce en *L.(L.) donovani* (Webb y col., 1991), *L.(L.) mexicana* (Medina-Acosta y col., 1993) y *L.(L.) chagasi* (Miller y col., 1990; Ramamoorthy y col., 1992). Es sintetizada como una proteína precursora de 602 aminoácidos consistiendo de un péptido señal N-terminal de 39 aminoácidos, una pro-región de 61 aminoácidos y la proteína madura de 477 aminoácidos, la cual presenta los sitios de glicosilación y catalítico y un péptido señal C-terminal de 20-25 aminoácidos para la unión del GPI (Button y Mc.Master, 1988).

Gp63 es el antígeno reconocido predominantemente luego de una infección por *Leishmania* sp. en el modelo murino y humano (Etges y col., 1985; Colomer-Gould y col., 1985; Bordier, 1987; Bouvier y col., 1987). Células T periféricas de un panel de pacientes con Leishmaniasis del Nuevo Mundo responden a gp63 recombinante (rgp63) y se aislaron líneas de células T que reaccionan específicamente con rgp63 (Button y col., 1991; Russo y col., 1991).

Se han propuesto múltiples funciones fisiológicas para la gp63. Russell y Talamas-Rohana (1989) la involucran en la interacción macrófago-parásito durante los estadíos tempranos de la infección. Las moléculas de gp63 intervendrían en la captación de promastigotes por macrófagos, es decir actuarían como ligandos para varios receptores de macrófagos, entre ellos los receptores de complemento CR1 (=C3bR) y CR3 (=C3biR) (Blackwell, 1985; Russell y Thalamas-Rohana, 1989). En lugar de ayudar a eliminar al parásito a través de la lisis mediada por complemento, la unión de factores del complemento sobre la superficie de las formas metacíclicas facilitaría la entrada del parásito a la célula hospedadora (Bogdan y col., 1990).

Por otro lado, Chaudhuri y Chang (1988) demostraron que esta proteína es muy activa a pH ácido y postularon que gp63 se usaría para proteger substratos lípido-proteicos de la degradación intralisosomal del macrófago.

En 1992 Alexander y Russell, sugirieron que la gp63 de la bolsa flagelar de amastigotes serviría para la degradación de macromoléculas del hospedador o para la protección o nutrición. La proteína está concentrada en el lumen de la bolsa flagelar, que parecería estar relacionada con procesos de secreción y endocitosis.

En *L.(L.) major* esta proteasa se expresa en altos niveles. En promastigotes de *L.(L.) major* representa el 1% de la proteína celular y hay 500,000 copias sobre su superficie (Etges y col., 1985; Bordier, 1987). Resultados similares se describieron para promastigotes de *L.(L.) mexicana*, donde gp63 es el 1.2% de las proteínas totales del parásito. Esto contrasta con los amastigotes intracelulares, donde proteínas relacionadas con gp63 representan sólo el 0.1% de las proteínas celulares. Esta proteasa está localizada en el lumen de los megasomas en amastigotes de *L.(L.) mexicana*.

Gp63 no abunda en amastigotes de *L.(L.) mexicana*, como lo confirman estudios de inmunoblotting e inmunoprecipitación (Bahr y col., 1993). La heterogeneidad de gp63 estadío-específica de *L.(L.) mexicana* fue demostrada por Medina Acosta y col., 1989.

Posteriormente, Medina Acosta y col., 1993 obtuvieron evidencias que diferentes genes gp63 de *L.(L.) mexicana* eran regulados durante el desarrollo.

Schreffler y col. (1993) evaluaron la persistencia de anticuerpos contra gp63 en sueros de pacientes con Leishmaniasis por ELISA usando la proteína nativa y la recombinante de gp63 (rgp63). Los sueros de pacientes con Leishmaniasis Visceral exhibían altos niveles de anticuerpos contra la rgp63 de *L.(L.) donovani* y rgp63 de *L.(L.) chagasi.* En contraste, los sueros de pacientes con Leishmaniasis Mucocutánea infectados con *L.(V.) braziliensis* no reaccionaban con la rgp63.

Tanto Button y col., 1991 como Russo y col., 1991 realizaron experimentos sobre la respuesta inmune celular hacia gp63 usando el antígeno recombinante. La rgp63 de *L.(L.) major* fue identificada como un determinante inmunodominante de células T humanas en un paciente infectado con *L.(V.) guyanensis* (Button y col., 1991).

Los péptidos sintetizados en base a la secuencia de aminoácidos de gp63 son antigénicos y pueden inducir inmunidad protectiva contra la infección por *L.(L.) mexicana* (Jardim y col., 1990) y *L.(L.) major* en ratones (Chang y Chaudhuri, 1990).

Posteriormente, Yang y col. (1993) evaluaron el valor protectivo de gp63, al transformar una cepa de *Salmonella typhimurium* y expresar rgp63. Ratones inmunizados oralmente con esta cepa desarrollaban inmunidad protectiva parcial.

La gp63 de *L.(V.) braziliensis* no estimula PBMC de pacientes infectados con *L.(V.) braziliensis* (Mendoça y col., 1991), como también ocurre con la gp63 purificada de *L. major* que no induce proliferación de PBMC de pacientes infectados con *L.(L.) major* (Jaffe y col., 1990).

1.1.7.2) Proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70)

Las proteínas de choque térmico son un grupo de moléculas sintetizadas en respuesta a una variedad de estímulos: cambio brusco de temperatura, carencia de nutrientes, presencia de radicales libres e infección viral y por parásitos (Craig y col., 1993; Lindquist y Craig, 1988; Lindquist, 1986). El representante mejor estudiado de esta familia es la proteína de choque térmico de 70 kDa, la HSP70. Las células eucariotes contienen una variedad de genes hsp70 cuyas proteínas han sido descritas como "chaperonas moleculares" (Georgopoulus, 1992; Ellis y Van der Vies, 1991; Ellis, 1987). Estas moléculas modifican la conformación de proteínas mediante

el ensamblaje/desensamblaje de complejos proteícos facilitando su transferencia a través de las membranas celulares como: núcleo, mitocondria y microsoma (Gething y Sambrook, 1992; Langer y Neupert, 1991). Basados en estudios funcionales y estructurales de la HSP70, se ha sugerido que la porción N-terminal contiene la actividad ATPasa, mientras que la región C-terminal es importante en el reconocimiento de substrato (Flaherty y col., 1990).

En algunos casos, hay genes que codifican hsp70 que son expresadas constitutivamente. No son inducibles por calor pero presentan la misma secuencia de aminoácidos y son referidos como hsc70 (heat shock cognate). En contraste, hay otros genes que codifican hsp70 inducibles por calor (hsp70), mientras que otros son regulados por glucosa (grp78) (Shinnick, 1991).

Las HSP70 de una variedad de agentes infecciosos incluyendo *Leishmania* han sido estudiadas. El rol exacto de estas moléculas en el proceso infeccioso no se conoce. No obstante, es claro el carácter inmunodominante de estas proteínas como blancos de anticuerpos y células T. Además, HSP70 son antígenos dominantes de otros agentes infecciosos incluyendo *Trypanosoma*, *Plasmodium falciparum*, *Schistosoma mansoni*, *Theileria annulata*, *Candida albicans*, *Histoplasma capsulatum* (Shinnick, 1991).

Lee y col., 1988 informaron el hallazgo de las hsp70 de *L.(L.) major* al rastrear una biblioteca genómica de esta especie usando el gen hsp70 de *T. brucei* como sonda. Los 5 genes hsp70 de *L.(L.) major* estaban organizados en 2 loci diferentes. Cuatro genes estaban organizados en "tandem" en el locus I, y un quinto gen en el locus II. Se determinó que la unidad repetitiva era de 3,6 Kb y presentaba 380 pb de región intergénica (locus I). La secuencia codificante de la hsp70 de *L.(L.) major* tiene un marco de lectura abierta de 658 aminoácidos. La región codificante presenta una homología nucleotídica de 80% y aminoacídica de 89% con la hsp70 de *T. brucei*. La transcripción de los genes del locus I se induce por calor, mientras que la transcripción del quinto gen es constitutiva. Los 5 genes están localizados en un único cromosoma de 1.000 Kb.

Searle y col., 1989 encontraron una familia de genes relacionados con hsp70 en este parásito, por rastreo de una biblioteca genómica de *L.(L.) major* con una sonda hsp70 humana (Hunt y Morimoto, 1985). Dicha sonda reconocía al menos 3 genes relacionados con diferentes número de coplas cada uno. De los 3 genes, 2 son

expresados constitutivamente (hsp70.1, hsp70.4). En contraste, transcritos del tercer gen (Lm ADNc 7.5) de promastigotes de fase estacionaria (estado infectivo) exhibían niveles incrementados de ARN comparados con promastigotes de fase logarítmica (no infectivos) (Coulson y Smith, 1990). Ningún gen se indujo por calor. Basados en estos estudios el genoma de *L.(L.) major* contiene al menos 4 secuencias diferentes relacionados con hsp70, los cuales están en 5 loci cromosomales separados.

MacFarlane y col., 1990 identificó un ADNc al rastrear una biblioteca de *L.(L.) donovani* en λgt11 con el suero de un paciente con Leishmaniasis Visceral. El antígeno expresado por el clon era reconocido por 50% de los sueros de pacientes con Leishmaniasis Visceral, más no por los sueros de pacientes con Leishmaniasis Cutánea, ni Enfermedad de Chagas. El recombinante contenía un inserto de 600 pb con homología a HSP70. Posteriormente, se aisló un recombinante de una biblioteca genómica y se completó la región codificante constituída por 653 aminoácidos.

La comparación de secuencias reveló un 70% de similitud con la HSP70 humana (Hunt y Morimoto, 1985), un 85% con la HSP70 de *T. brucei* (Glass y col., 1986) y más del 95% con la proteína de *L.(L.) major* (Lee y col., 1988). Los genes que codifican para esta hsp70 de *L.(L.) donovani* están en un sólo cromosoma, repetidos 12 veces cubriendo un tándem directo de 3,7 Kb. Sólo una banda de 3,5 Kb. fue detectada en Northern blots de ARN de promastigotes de *L.(V.) braziliensis*, *L.(L.) mexicana*, *L.(L.) tropica*, *L.(L.) arabica* y *L.(L.) donovani* hibridizados con la sonda del ADNc de 600 pb. La porción C-terminal de la HSP70 de *L.(L.) donovani* es antigénica. Wallace y col. (1992) determinaron los epítopes involucrados utilizando péptidos sintéticos. Así se logró identificar al hexámero EADDRA, como el epítope inmunodominante de células B usando suero de un paciente con Leishmaniasis Visceral.

El mismo enfoque fue seguido por Amorin y col. (1991) luego de rastrear una biblioteca de ADNc de *L.(V.) braziliensis* con el suero de un paciente con Leishmaniasis Mucocutánea. Se aisló un ADNc que contenía un inserto de 2,5 Kb. reconocido por sueros de pacientes con Leishmaniasis Mucocutánea, más no por sueros de pacientes con Leishmaniasis Cutánea. El inserto al ser secuenciado exhibía homología con la HSC70 de *L.(L.) donovani* (Mc. Farlane y col., 1990) y a la HSC70 humana (Dworniczak y Mirault, 1987). La porción C-terminal del inserto fue subclonada y expresada en vectores de expresión. Como describimos anteriormente,

también en este caso esta región región fue reconocida por sueros de pacientes con Leishmaniasis Mucocutánea más no así por sueros de pacientes con Leishmaniasis Cutánea.

Paralelamente, Levy-Yeyati (Tesis doctoral, 1992) aisló la porción C-terminal de la hsp70 de *L.(V.) braziliensis* de una biblioteca de ADNc en λgt11 usando una táctica mixta: rastreo inmunológico con anticuerpos inmuno-seleccionados contra el recombinante RA1 (hsp70 de *T. cruzi*) y rastreo con una sonda radioactiva del inserto del recombinante RA1. Trabajando con réplicas de filtros se identificó un fago recombinante (denominado Lbb1) que era positivo en ambos rastreos. Al secuenciarlo demostró ser la hsp70 de *L.(L.) braziliensis*.

Searle y col., 1993 obtuvo anticuerpos específicos para la HSP70.1 de *L.(L.) major* y estudió con ellos la localización de la proteína por inmunofluorescencia indirecta y ensayos de marcaje con oro coloidal. Estos anticuerpos reconocían una molécula de 65 KDa localizada en la mitocondria, en todos los estadíos del ciclo de vida del parásito.

También en otros kinetoplástidos, tales como *T. cruzi* (Engman y col., 1989) y *Crithidia fasciculata* (Effron y col., 1993), miembros de la familia HSP70 han sido detectados en la mitocondria. El análisis de la secuencia de aminoácidos del gen HSP70 mostraba una alta conservación en aquellos aminoácidos implicados en la unión del ATP y calmodulina. Este hallazgo sugiere que el gen de hsp70 de *Leishmania* sp es una proteína que une ATP y que puede ser regulado por calmodulina. El rol específico de esta molécula en *Leishmania* sp es incierto, pero basados en la analogía con otras proteínas relacionadas a las HSP70 mitocondriales, sugieren que esta proteína puede estar involucrada en el transporte de otras proteínas hacia la mitocondria, por lo tanto funcionando como una chaperona molecular.

En cambio, Searle y Smith, 1993b usando el mismo tipo de análisis determinó que la proteína HSP70.4 está localizada en el citoplasma del parásito.

Estudios sobre la localización cromosómica de hsp70 en *L.(L.) major* por CHEF u OFAGE informan que los genes están en una banda cromosómica de 1.200 Kb (Hanekamp & Langer, 1991). Otros autores detectaban una banda de 1,000 Kb en *L.(L.) major* (Lee y col., 1988) ó 1.300 Kb (Giannini y col., 1990).

Bock y col., 1993 informó el hallazgo de los genes hsp70 de *L.(L.) amazonensis* al rastrear primero una biblioteca de ADNc en λgt10 y luego bibliotecas genómicas en EMBL3 y pWE15 con una sonda del gen hsp70 de *Drosophila melanogaster*. El mapa físico construído en base a fragmentos sobrepuestos revelaron que 7 genes hsp70 estaban organizados en un locus de 24 Kb conteniendo repeticiones en tandem de 3,5 Kb (unidad repetitiva). Además, se hallaron cósmidos cubriendo una región cromosómica diferente indicando una octava secuencia hsp70 localizada en un sitio distante. Los datos de Southern sugieren la existencia de genes hsp70 adicionales o pseudogenes. La secuencia de la HSP70 de *L.(L.) amazonensis* tiene un 96% de identidad aminoacídica con la de *L.(L.) donovani* (Mc.Farlane y col., 1990) y un 95% con la de *L.(L.) major* (Lee y col., 1988). Tiene una homología de 85% con la *T. brucei* (Glass y col., 1986) y un 81% con la de *T. cruzi* (Requena y col., 1989), mientras que con la HSC70 cognata humana un 72% y con la HSP70 inducible un 68% de homología.

El tetrapéptido repetido GGMP, encontrado en las HSP70 de otros tripanosomátidos está ausente en la secuencia de *L.(L.) amazonensis*. A su vez, se identificaron elementos regulatorios potenciales de choque térmico en la región 5' no codificante, junto con dos sitios diferentes de poliadenilación distanciados por 100 bp.

Recientemente, Quijada y col. (1996) han aislado la hsp70 de *L.(L.) infantum* mediante el rastreo de una biblioteca de ADNc con sueros de perros que presentaban Leishmaniasis viscerocutánea. El clon aislado contenía los 20 últimos aminoácidos C-terminales. Posteriormente, se aisló un clon genómico conteniendo la secuencia completa de un gen hsp70. Se encontró que los genes hsp70 estaban organizados como una serie de unidades repetitivas en tandem de 3,7 Kb. La proteína HSP70 en *L.(L.) infantum* está constituída por 653 aminoácidos y está conservada cuando se la compara con las proteínas homólogas. Así posee un 73% de identidad con la HSP70 humana, un 85% con la HSP70 de *T. cruzi* y alcanzando un 98% con las HSP70 de las varias especies de *Leishmania* analizadas. Es llamativo la presencia de 2 repeticiones GGMP en la región C-terminal que son característicos de las HSP70 de los parásitos.

El análisis inmunológico indica que en la infección por *L.(L.) infantum* los anticuerpos anti-HSP70 generados están dirigidos contra determinantes específicos de la HSP70 del parásito y no se inducirían autoanticuerpos anti-HSP70 durante la infección.

Algunos autores han sugerido un rol para HSP70 en la virulencia y resistencia de *Leishmania* (Smejkal y col., 1988). Estos autores describieron que *L.(V.) guyanensis* en choque térmico cambiaba de morfología (de promastigote a amastigote) aumentando su infectividad, midiendo este efecto por el tamaño de la lesión en hamsters.

1.1.7.3) Proteínas Ribosomales P

La subunidad mayor del ribosoma contiene una estructura con forma de dedo que sobresale del cuerpo de la subunidad, conocida como pedúnculo ribosomal. El pedúnculo ribosomal está involucrado en la unión de los factores de traducción, dependientes de la hidrólisis del GTP, durante la síntesis de proteínas (Liljas, 1982) y está formado por proteínas pequeñas con características inusuales. Están presentes en copias múltiples en el ribosoma y son ácidas, en contraste con la mayoría de las proteínas ribosomales, que son de copia única y básicas. Estas proteínas, denominadas proteínas A (ácidas) o proteínas P contienen un 20% de alaninas, pocos residuos aromáticos, sólo 1 ó 2 argininas, no poseen cisteínas y poseen una carga negativa neta generada por la concentración de ácido glutámico (E) en su extremo C-terminal.

Ya se informó el aislamiento, caracterización y expresión de los genes de la proteína ribosomal P0 de *L.(L.) infantum* (Soto y col., 1993). Los 2 genes estarían unidos en tandem y son idénticos en la región codificante, pero difieren en su región intergénica. Las regiones 3' no codificantes de los 2 genes son diferentes en tamaño.

La secuencia de aminoácidos presenta cierto grado de conservación con las proteínas ribosomales P0 de organismos eucariotes y en particular con la de *T. cruzi*.

Por Northern se demostró la presencia de 2 clases de transcriptos.

Soto y col. (1993) también aislaron y caracterizaron las proteínas ribosomales P2α y P2β de *L.(L.) infantum*. Estos genes estaban organizados como 2 "clusters" génicos independientes. Cada cluster contendría 2 genes unidos en tandem que codificarían para proteínas idénticas.

Cada una de las proteínas codificadas por los clusters (llamados LiP' y LiP, respectivamente) son divergentes en secuencia, mostrando los rasgos característicos de las proteínas P eucarióticas del grupo P2. A pesar de la conservación de

secuencia en la región codificante de cada uno de los genes en el cluster, las regiones no codificantes 5' y 3' son heterogéneas en secuencia.

El mismo grupo (Soto y col., 1995) informó el hallazgo que un alto porcentaje de sueros de perros afectados por Leishmaniasis viscerocutánea contienen anticuerpos que reaccionan con la proteína ribosomal P0 de *L.(L.) infantum* (LiP0) e identificaron el mayor determinante antigénico, la secuencia AAKEEPEESDEDDFGMG adyacente al extremo C-terminal de la proteína. También encontraron que anticuerpos anti-LiP0 no reaccionan con el determinante antigénico de las proteínas ácidas LiP2, indicando que la proteína LiP0 es un antígeno independiente en la forma canina de la infección.

Luego, Soto y col. (1995) informan sobre la presencia de anticuerpos contra las proteínas ácidas ribosomales P2α y P2β de *L.(L.) infantum* en el suero de perros infectados con el parásito. Mediante el uso de péptidos sintéticos localizaron el epítope antigénico de estas proteínas en una región adyacente al dominio C-terminal, conservado entre las proteínas P de eucariotes, salvo en las P0 de protozoarios. Los anticuerpos anti-P producidos durante la infección por *L.(L.) infantum* no reconocen el dominio C-terminal conservado de las proteínas P del parásito, en contraste con lo informado para la Enfermedad de Chagas y el Lupus Eritematoso Sistémico.

El epítope antigénico de las proteínas LiP2α y LiP2β es casi idéntico: (E/A)AKK(E/D)EPEEE(E/-)A. Además, no se encontró reactividad contra las proteínas P de *T. cruzi* y humanas en suero de perros infectados con *L.(L.) infantum*.

También, Skeiky y col. (1994) informaron el clonado y la caracterización del antígeno ribosomal P0 de *L.(L.) chagasi* (LcP0) en un intento por identificar antígenos *Leishmania*-específicos. La proteína es homóloga a las proteínas ribosomales P0 de *T. cruzi* (TcP0) y humana (HuP0). A diferencia de la mayoría de eucariotes superiores, pero similar a TcP0, LcP0 tiene una secuencia C-terminal similar a las proteínas ribosomales ácidas de arquebacterias. Mediante el uso de péptidos sintéticos se demostró que mientras en la infección por *T. cruzi*, los anticuerpos anti-TcP0 están dirigidos contra el dominio C-terminal de TcP0, los sueros de pacientes infectados por *L.(L.) chagasi* contienen anticuerpos reactivos contra epítopes que no están ubicados en la región C-terminal de LcP0. Los anticuerpos anti-LcP0 en suero de pacientes infectados por *L.(L.) chagasi* representan la primera desviación de la respuesta anti-P típica.

1.1.7.4) Glicoconjugado de superficie: Lipofosfoglicano (LPG)

El lipofosfoglicano (LPG) (Fig. 5) es el mayor glicoconjugado de los promastigotes y está localizado sobre toda su superficie, incluyendo el flagelo (King y col., 1987; Pimenta y col., 1991). Cada célula contiene varios millones de moléculas de LPG (Orlandi y Turco, 1987; McConville y col., 1990;1991). El LPG contiene cuatro dominios: a) un ancla lipídico fosfatidilinositol, b) un núcleo de fosfosacáridos, c) una región repetitiva de azúcares fosforilados, d) una pequña estructura oligosacarídica terminal. Mientras que los dominios del núcleo glicano y de ancla lipídico se conservan entre las especies, las unidades oligosacarídicas fosforiladas y la estructura terminal presentan polimorfismo.

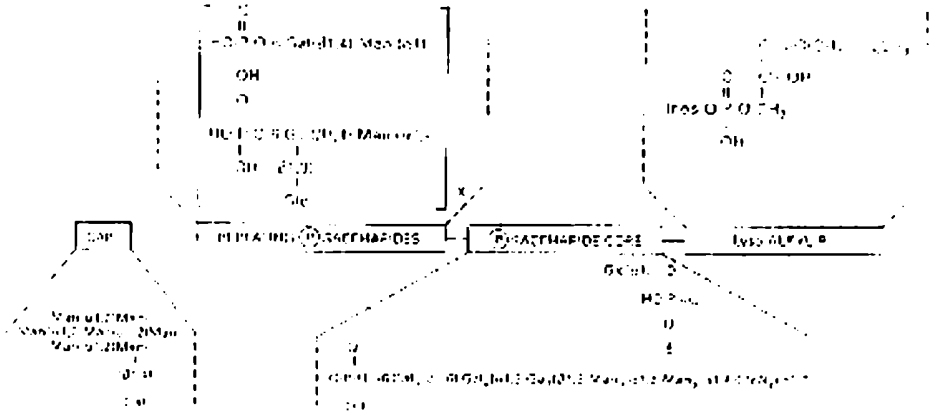


Fig. 5 Estructura del LPG

La elongación del LPG en los metacíclicos de *L. (L.) major* trae como consecuencia un engrosamiento del glicocalix (Pimenta y col., 1991) y promovería la supervivencia del parásito en el hospedador (Sacks, 1989). Este engrosamiento controlaría la activación por complemento, evitando el acceso del complejo de ataque a la membrana celular del parásito (Puentes y col., 1988; 1991).

Schlein y col., 1990 propusieron que el LPG modularía la actividad de las enzimas proteolíticas, retardando la digestión del alimento sanguíneo y promoviendo la supervivencia del parásito.

Davis y col., 1990 propusieron que durante la metaciclogénesis, en el LPG hay un pronunciado decrecimiento en la abundancia relativa de las unidades repetitivas con cadenas laterales de βGal o Galβ1-3Galβ- y un correspondiente incremento en unidades repetitivas sin cadenas laterales o con cadenas laterales de Arapα1-2Galβ1-. Esto explicaría la perdida relativa en la unión a la lectina PNA (Peanut Aglutinin), por parte de los promastigotes metacíclicos, ya que la mayoría de los residuos de galactosa terminal expresados sobre el LPG de procíclicos de la fase logarítmica (PNA^+) se han perdido o se han cubierto con una arabinosa terminal.

Se ha demostrado que el LPG está directamente involucrado en mediar la unión de los promastigotes de *L.(L.) major* al intestino medio de *P. papatasi* (Pimenta y col., 1992).

Estos hallazgos sugieren que moléculas semejantes a lectinas estarían asociadas al intestino del vector (Wallbanks y col., 1986) y servirían como sitios de unión del parásito, y para el caso de *P. papatasi*, tendrían especificidad por residuos terminales de galactosa.

El LPG podría proteger los promastigotes contra la actividad hidrolítica dentro del intestino del flebótomo (Schlein y col., 1990).

El LPG disminuiría la tasa de citólisis por parte del macrófago sobre el parásito, sugiriendo que este glicoconjugado permitiría a *Leishmania* sobrevivir en presencia de enzimas hidrolíticas (Eilam y col., 1985). El LPG podría ser un quelante de cationes divalentes, tales como el ión ferroso, previniendo la producción, via reacción de Fenton, de radicales hidroxilos durante la activación del macrófago (Homans y col., 1992).

El LPG estaría involucrado también en la supresión del "burst respiratorio" a través de la inhibición de la actividad de la Proteína Kinasa C (McNeely y col., 1989). El LPG podría proteger a los promastigotes por secuestro de los radicales libres generados durante el burst respiratorio (Chan y col., 1989).

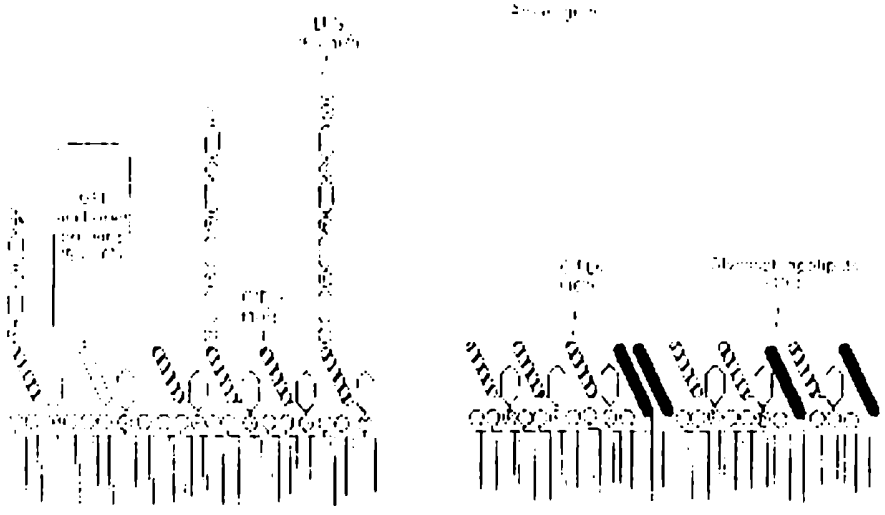


Fig. 6 Esquema de las principales moléculas de la membrana de *Leishmania* spp.

El LPG induciría una reacción de hipersensibilidad retardada en ratones infectados con *L.(L.) major* (Moll y col., 1989). Sin embargo, Mendoça y col. (1991) encontraron que la estimulación de la respuesta de células T de pacientes con Leishmaniasis cutánea con el LPG de *L.(V.) braziliensis* era inducida por contaminantes proteicos asociados al LPG.

Mientras que el LPG no parece ser capaz de inducir una respuesta de células T, el glicoconjugado podría actuar como un adyuvante natural para las proteínas con las cuales está fuertemente asociados (Jardim y col., 1991; Russo y col., 1992).

1.1.8) La genética de *Leishmania*

1.1.8.1) La organización del ADN genómico

El genoma de *Leishmania* consiste de ADN nuclear, ADN mitocondrial referido como ADN de kinetoplasto (ADNk) y ADN extracromosómico.

1.1.8.1.1) ADN nuclear

El tamaño del genoma de *Leishmania* varía dependiendo de las especies. Los valores varían de $4x10^7$ pb para *L.(L.) donovani* (León y col., 1978) a $1x10^8$ pb para *L.(V.) braziliensis* (Villalba y Ramirez, 1982). Estos valores aproximados representarían aproximadamente 0.116 pg ADN/célula.

En la literatura, se informa que la mayoría de los genes nucleares identificados en *Leishmania* están presentes en múltiples copias unidas. Entre algunos ejemplos de familias de genes repetidos tenemos la histona H2B (Genske y col., 1991), los genes de tubulina (Spithill y Samaras, 1985), el miniexón (Landfear y col., 1986), ARNr (León y col., 1978), hsp83 (Shapira y Pinelli, 1989; Shapira y Pedraza, 1990) y proteínas reconocidas por sueros tales como gp63 (Button y col., 1989), gp46 (Lohman y col., 1990) y la hsp70 (Lee y col., 1988).

Por otra parte, no se ha observado en los genes investigados la presencia de intrones. Las regiones codificantes son usualmente más ricas en contenido de GC que las regiones no codificantes (Clayton, 1988).

Leishmania sp contiene aproximadamente entre 25-30 cromosomas (Comeau y col., 1986; Giannini y col., 1986) que pueden ser visualizados por PFGE u otras variantes de esta técnica. Se ha informado de la presencia de polimorfismo en el tamaño de los cromosomas en *Leishmania* (Lighthall y Giannini, 1992). Se han construído bibliotecas cromosoma-específica para la elaboración de mapas físicos y genéticos de los cromosomas de *Leishmania,* como por ejemplo cromosomas que presentan gp63 y hsp70 (Ajioka y col., 1992).

1.1.8.1.2) ADN del kinetoplasto

Los miembros del orden Kinetoplástida se caracterizan por la posesión de grandes cantidades de ADN mitocondrial que está localizado en una estructura en forma de disco llamada el kinetoplasto. El ADN del kinetoplasto consiste de miles de moléculas de ADN circulares concatenadas en una malla plana, en la cual dos tipos de moléculas circulares de ADN se distinguen: los maxicírculos y minicírculos. En la malla del ADN del kinetoplasto, entre 20 a 50 maxicírculos están presentes con variaciones de tamaño entre las distintas especies de 20 a 39 Kb, junto con miles de

minicírculos, cuyo tamaño varía entre 0,5 a 2,8 Kb (Arts y Benne, 1996). En general, los minicírculos de *Leishmania* miden alrededor de 0.7-0.9 Kb con un 72-73% de bases A+T (Clayton, 1988). Todos los minicírculos de *Leishmania* spp. tienen una región conservada de 13 pb.

El rasgo distintivo del ADNk es la heterogeneidad de secuencia de sus minicírculos. Los minicírculos debido a su alto número de copias y heterogeneidad de secuencia, son un buen blanco para diseñar métodos de diagnóstico de las *Leishmania* del Nuevo Mundo (Barker y Butcher, 1983; Romero y col., 1987; Lopez y col., 1988; De Bruijn y Barker, 1992) y en los complejos de las *Leishmania* del Viejo Mundo (Barker y col., 1986; Barker, 1989; Smith y col., 1989).

1.1.8.1.3) ADN circular extracromosómico

La presencia de ADN extracromosómico en *Leishmania* está relacionado con procesos de amplificación génica, en los cuales una limitada porción del genoma aumenta el número de copias. Algunos de ellos fueron seleccionados por resistencia a drogas. Todas estas moléculas son circulares y constituyen 5-10% del ADN total del parásito (Beverley, 1991).

1.1.9) Los antígenos de *Leishmania* y la respuesta inmune a la infección

1.1.9.1) La respuesta inmune a la infección y autoinmunidad

La infección del mamífero por los promastigotes resulta en el establecimiento de amastigotes en las células fagocíticas mononucleares. El éxito de una infección parasitaria depende de la entrada y supervivencia del parásito en el tipo celular apropiado, por lo general el macrófago (Alexander y Russell, 1992). El parásito habita en la vacuola parasitófora, en la cual está expuesto a proteasas que pueden destruir la integridad de la membrana y permitir que antígenos internos del parásito puedan ser procesados y presentados por los macrófagos en la superficie celular (Kaye, 1987). Los estudios en Leishmaniasis murina determinaron que la naturaleza de la respuesta de la células T determina la resolución de la enfermedad (Cox y Liew, 1992; Liew y O'Donnell, 1993; Reed y Scott, 1993). Las células T $CD4^+$ serían las

responsables de la resistencia o susceptibilidad luego de una infección por *L.(L.) major*, mientras que las células $CD8^+$ podrían estar asociadas con el control de la enfermedad. No obstante, la resistencia a la re-infección con *L.(L.) major* y *L.(L.) donovani* parece estar asociado con células T $CD4^+$ y $CD8^+$ por igual. Los linfocitos $CD4^+$ pueden ser divididos en 2 grupos basados en el patrón de las linfoquinas producidas:

a) Las células Th1 se caracterizan por la producción de IL-2 e IFN-γ responsables de hipersensibilidad de tipo retardado (DTH).

b) Las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-10 y IL-13 que están involucradas en la producción de anticuerpos por células B, así también como en el cambio en la clase de anticuerpo (Romagnani, 1991).

La predominancia del desarrollo del subset Th1 conducirá a la resistencia mientras que el subset Th2 inducirá susceptibilidad. La existencia de análogos humanos a Th1 y Th2 está en discusión.

Barral-Neto y col. (1992) informó que una forma en la que *Leishmania* sp. puede sobrevivir en el medio ambiente hóstil del macrófago es porque el parásito induce al macrófago a producir grandes cantidades del factor transformante de crecimiento beta (TGF-β) que favorece la exacerbación de la enfermedad.

Por otro lado, se sabe que IL-12 producido por el macófago permite la diferenciación de las células T $CD4^+$ en el subset Th1 y por consiguiente la resolución de la enfermedad (Gazzinelli, 1996).

Otro factor importante es la constitución genética del hospedador. Esta conduce o a la multiplicación limitada de los parásitos o a la proliferación incontrolada de los amastigotes (Bradley y Kirkley, 1972; Crocker y col., 1987).

Varias enfermedades causadas por parásitos, bacterias y virus están asociados con la inducción de autoanticuerpos. Este mecanismo involucra la imposibilidad de discriminar entre lo propio y lo no propio conduciendo a la síntesis de anticuerpos dirigidos contra componentes propios (autoanticuerpos). Los autoanticuerpos contra antígenos nucleares, tales como ADN fueron observados en pacientes con Leishmaniasis Cutánea y Visceral (Galvao-Castro y col., 1984; Bohme y col., 1986). La inducción de autoanticuerpos en Leishmaniasis podía ser atribuída a la hiper-gammaglobulinemia observada en pacientes con Leishmaniasis visceral, liberación de antígenos de *Leishmania* cuando está rodeado de células hospedadoras o al

mimetismo molecular entre antígenos de *Leishmania* y ribonucleoproteínas (Argov y col., 1989).

1.1.9.2) Vacunación e Inmunoprofilaxis

Un enfoque para la inducción de protección es la inoculación de parásitos totales (atenuados, muertos o lisados) (Pessoa, 1941; Greenblatt, 1985). La Leishmaniasis cutánea causada por *L.(L.) major* ha sido el blanco de la mayoría de los intentos de vacunación en humanos. Una vacuna de promastigotes vivos ha sido evaluada con esta forma clínica de la enfermedad (Greenblatt, 1985; Greenblatt, 1988; Gunders, 1987). Aún cuando la vacuna confirió resistencia a la infección, un porcentaje significativo de personas que lo recibió desarrolló lesiones cutáneas. Vacunas con parásitos muertos están aún en estado experimental. Pruebas de vacunación preliminar contra LC con promastigotes muertos con fenol han dado resultados contradictorios (Greenblatt, 1985; Pessoa, 1941).

Otro enfoque es el fraccionamiento subcelular de los parásitos con el fin de identificar, aislar e inducir protección con antígenos purificados. Niveles de protección completa o apreciable contra LC y LV se lograron en el modelo ratón usando antígenos definidos, como gp63 mezclado con adyuvantes, o incorporado en liposomas (Russel y Alexander, 1988), o expresado en *Salmonella typhimurium* (Yang y col., 1990), y otros glicoconjugados en conjunción con adyuvantes (Champsi y McMahon-Pratt, 1988; Handman y Mitchell, 1985; Jaffe y col., 1990; McConvillle y col., 1987).

Mediante el uso de péptidos sintéticos correspondientes a la estructura primaria de la gp63, se han caracterizado epítopes de células T de ratón, que activan células Th1, las cuales inducen inmunoprotección contra LC (Jardim y col., 1990), o células Th2, que incrementan la progresión de la enfermedad (Liew y col., 1990). Se están evaluando antígenos de *Leishmania* sp con la finalidad de identificar epítopes que induzcan una respuesta de células T apropiada en humanos (Burns y col., 1991; Mendoça y col., 1991; Mendoça y col., 1990; Reed y col., 1990). Por ejemplo, se ha mostrado que gp63 desarrolla una fuerte respuesta proliferativa de células T (subset CD4) y la producción de IFN-γ en pacientes con Leishmaniasis (Mendoça y col., 1991; Russo y col., 1991).

La gp63 recombinante producida en *Escherichia coli*, también estimula células T de estos pacientes (Russo y col., 1991).

Además, la estimulación de linfocitos T aislados de pacientes con Leishmaniasis fue posible con proteínas asociadas al lipofosfoglicano (LPG) de *Leishmania* sp (Mendoça y col., 1991; Russo y col., 1992).

INTRODUCCIÓN

Enfermedad de Chagas

1.2) La Enfermedad de Chagas

1.2.1) Epidemiología

La Enfermedad de Chagas o Tripanosomiasis Americana afecta a unos 12-16 millones de personas en las áreas endémicas de 21 países Latinoamericanos, abarcando desde Méjico a Argentina (entre los paralelos 42°N a 46°S). Se ha calculado que habría un millón de casos nuevos de la enfermedad crónica y 45.000 muertes por año, con 100 millones de personas en riesgo de infección (Twelfth Programme Report, UNDP/World Bank/WHO/TDR, 1975-1994).

1.2.2) Vías de infección y ciclo de vida

La picadura del vector (vinchuca) en las horas de sueño nocturno, constituye la principal vía de infección de *Trypanosoma cruzi* (Brener, 1973). Inmediatamente después de succionar la sangre, el vector hematófago defeca liberando los parásitos (tripomastigotes metacíclicos) en las heces contaminadas. El prurito causado por la picadura lleva al individuo a facilitar el contacto de las heces contaminadas con la herida, favoreciendo la infección. Las mucosas bucal y conjuntiva son otras vías frecuentes de infección por *T. cruzi* (Romaña, 1963). Los tripomastigotes metacíclicos invaden células de varios tejidos, donde se diferencian a amastigotes, los cuales sufren ciclos de división binaria (cada 12 horas). Una proporción de los amastigotes se diferencian a tripomastigotes, los cuales liberados por lisis de la célula huésped, reingresan al torrente sanguíneo. Los tripomastigotes sanguíneos podrán infectar otras células y eventualmente podrán ser ingeridos por el vector. Al llegar al intestino medio del insecto, los tripomastigotes sanguíneos se diferencian en epimastigotes (forma replicativa) en el recto se diferencian a tripomastigotes metacíclicos, estadio infectivo del parásito, completándose el ciclo (García y Azambuja, 1991).

Se han descripto otras vías de infección como la congénita (Schmuñiz y Szarfman, 1977; Diaz, 1979), y la accidental por contaminación con heces de triatominos, con parásitos en cultivo, o bien con sangre de animales inoculados en el laboratorio y por transfusión sanguínea (Brener, 1990).

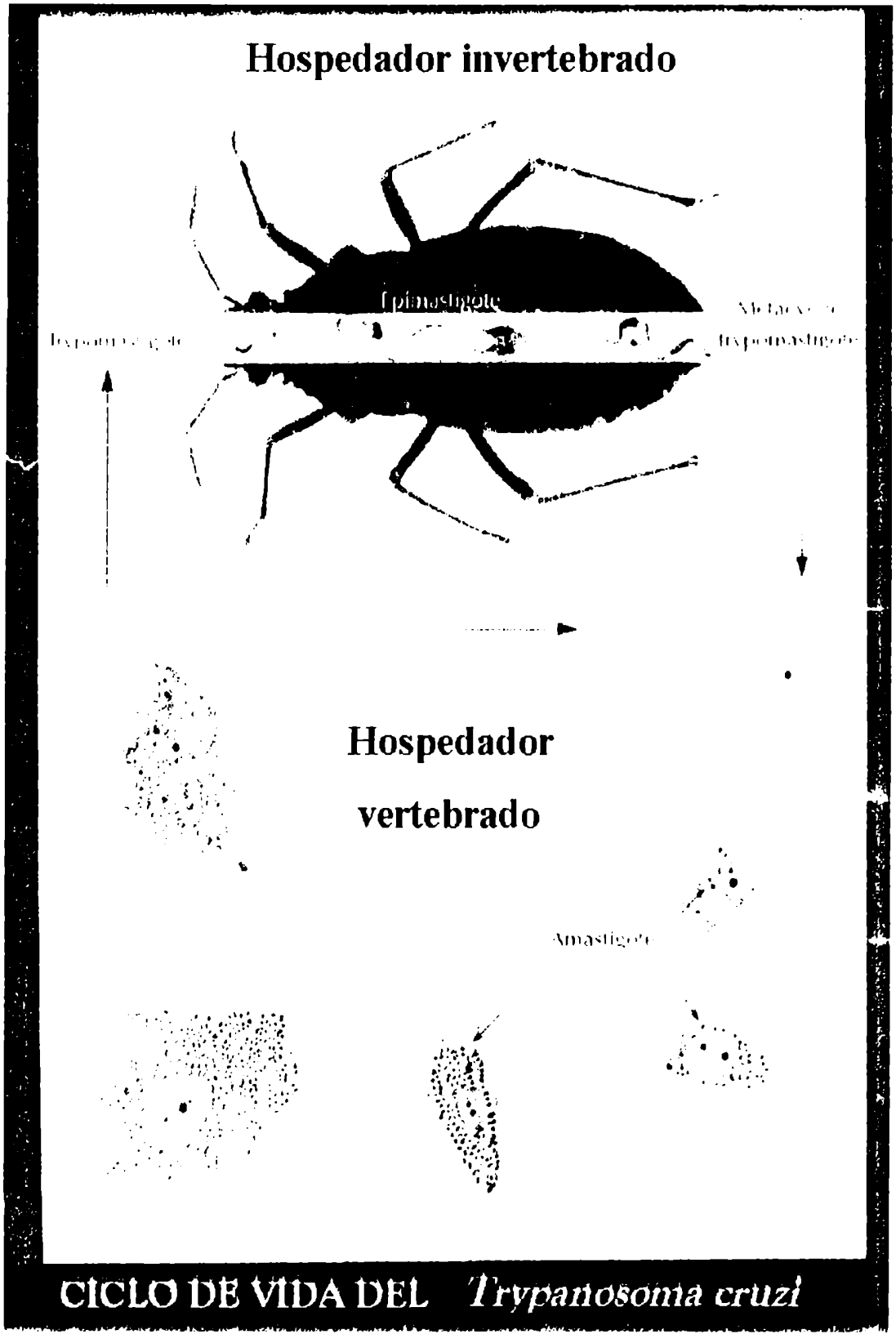


Fig. 7 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*

1.2.3) Fases de la Enfermedad de Chagas

1.2.3.1) La fase aguda

El periodo agudo es en general asintomático; se estima que más del 90% de los individuos infectados pasan a la fase crónica sin advertirlo (Rosenbaum, 1964). El conjunto de signos clínicos que caracterizan la fase aguda comprende: fiebre, parasitemia detectable, linfoadenopatía, hepatoesplenomegalia, vómitos, diarrea y especialmente, los signos de puerta de entrada, como el "ojo de Romaña". En un bajo número de casos (1-5%) se observa la aparición de una miocarditis, generalmente reversible, caracterizada por taquicardia, cardiomegalia y disfunción cardiaca, a veces acompañada por alteraciones electrocardiográficas (Laranja y col., 1956; Rosenbaum, 1964).

1.2.3.2) La fase crónica

La mayor parte de la población crónicamente infectada no presentan evidencias discernibles de la enfermedad; sólo un porcentaje de hasta el 30%, con grandes diferencias regionales, desarrolla al cabo de 10, 20 o más años, síntomas y/o signos de daño visceral. Esto es lo que se denomina Enfermedad de Chagas Crónica, cuya manifestación clínica más frecuente en la Argentina es una cardiopatía.

Otras alteraciones clínicas de la Enfermedad de Chagas crónica son las formas digestivas o megasíndromes (Koberle, 1968) y las alteraciones del sistema nervioso periférico (Sica y col., 1986; Losavio y col., 1989). La incidencia de las distintas manifestaciones varía considerablemente con la región geográfica considerada (Rezende, 1976).

Los hallazgos anátomo-patológicos de las etapas aguda y crónica de la Enfermedad de Chagas han sugerido que en la evolución de la misma podría estar involucrada la respuesta inmune del hospedador. El escaso número de parásitos y el tipo de células halladas en los infiltrados de las lesiones crónicas, han llevado a proponer que la patología chagásica crónica se desencadena como consecuencia de un proceso autoinmune (Hudson, 1985).

Sin embargo, el origen del fenómeno autoinmune ha sido tema de debate. Por un lado, se ha propuesto que los parásitos causan un desequilibrio en la regulación del sistema inmune, promoviendo la expansión policlonal de linfocitos B, con la consiguiente hipergammaglobulinemia y la aparición de autoanticuerpos (Said y col., 1985; D'Imperio Lima y col., 1986; Hontebeyrie-Joskowicz y col., 1987; Minoprio y col., 1988). Otras evidencias adjudican el origen autoinmune del Chagas crónico al mimetismo molecular (Damian, 1964), apoyado por evidencias de la existencia de determinantes antigénicos compartidos por el parásito y el hospedador (Sadigursky y col., 1982; Acosta y col., 1983; Petry y col., 1988; Van Voorhis y Eisen, 1989; Szarfman y col., 1982; Levin y col., 1989; Levitus y col., 1991; Kerner y col., 1991; Petry y Van Voorhis, 1991).

1.2.4) *Trypanosoma cruzi*

1.2.4.1) Ubicación sistemática

El agente causal de la Enfermedad de Chagas es el *Trypanosoma cruzi* cuya ubicación sistemática es la siguiente (Hoare, 1972):

Reino: Protista
Phylum: Sarcomastigophora
Sub-phylum: Mastigophora
Clase: Zoomastigophorea
Orden: Kinetoplastida
Sub-orden: Trypanosomatina
Familia: Trypanosomatidae
Género: Trypanosoma
Sub-género: Schizotrypanum
Especie: cruzi (Chagas, 1909)

1.2.4.2) Características del género *Trypanosoma*

El género *Trypanosoma* comprende parásitos digenéticos que presentan en su ciclo de vida la forma tripomastigote. Incluye 2 grupos de organismos:

1.2.4.2.1) Grupo Salivaria

Constituido por un conjunto de especies patógenas que se multiplican en el hospedador mamífero como tripomastigotes, completan su desarrollo en la glándula salival del vector y son transmitidos por inoculación con secreciones salivales (ej: *T. brucei*).

1.2.4.2.2) Grupo Estercoraria

Constituido por un conjunto de especies no patógenas (con excepción de *T. cruzi*), que se multiplican en el mamífero como amastigotes o epimastigotes, completan su desarrollo en el intestino del vector y son transmitidos por contaminación con las heces (Hoare, 1972).

1.2.5) Características de *Trypanosoma cruzi*

1.2.5.1) Formas de desarrollo de *T. cruzi*

Trypanosoma cruzi presenta 3 estadíos, distinguibles según las características del flagelo y la posición relativa del kinetoplasto respecto al núcleo celular (Brener, 1973).

1.2.5.1.1) Epimastigote

Es la forma flagelada replicativa en el intestino medio del insecto vector. El flagelo emerge de la región lateral anterior respecto a la dirección del movimiento del organismo y el kinetoplasto es anterior al núcleo celular.

1.2.5.1.2) Tripomastigote

Es la forma flagelada no replicativa dentro de ambos hospedadores. El flagelo emerge del extremo apical posterior y el kinetoplasto es posterior al núcleo celular. Se denominan tripomastigotes sanguíneos a las formas circulantes en el mamífero, y tripomastigotes metacíclicos a las formas diferenciadas en el insecto, que son las formas infectivas.
Los tripomastigotes sanguíneos pueden infectar macrófagos por un evento fagocítico (Zingales y col., 1985) y otros tipos celulares, por un evento dirigido por el parásito y mediado por receptores (Ortega-Barria y col., 1991; Schenckman, 1991).

1.2.5.1.3) Amastigote

Es la forma no flagelada, de localización intracelular en vacuolas acídicas (Ulises de Carvalho y col., 1989) y replicativa en el citoplasma del hospedador (Ley y col., 1990).

1.2.5.2) Hospedador

El ciclo de vida de *T. cruzi* involucra el desarrollo en 2 tipos de hospedadores:

1.2.5.2.1) Hospedador vertebrado

Más de cien especies de mamíferos, incluyendo el hombre, animales domésticos y reservorios silvestres pertenecientes a los ordenes Marsupialia, Edentata, Rodentia, Carnivora, Lagomorpha, Artiodactila, Chiroptera y Primata (Brener, 1979).

1.2.5.2.2) Hospedador invertebrado

Más de 80 especies de insectos pertenecientes a la familia Reduviidae, subfamilia Triatominae. Los géneros *Pastrongylus*, *Triatoma* y *Rhodnius* son los más frecuentes. Dado que los triatominos suelen picar en el rostro, se los ha denominado "barberos". En Argentina, el vector principal es el *Triatoma infestans*, del idioma quechua surge su denominación popular de "vinchuca" (Mazza, 1943).

1.2.6) Estrategias de evasión del parásito frente a la respuesta inmune del hospedador

T. cruzi tiene un estadío extracelular virulento, los tripomastigotes, que son refractarios a la lisis mediada por complemento (Nogueira y col., 1975). A diferencia de los epimastigotes que son menos virulentos y activan la vía alterna del complemento, los tripomastigotes son resistentes al complemento (Joiner y col., 1986).

T. cruzi penetra el macrófago por un evento fagocítico (Zingales y col., 1985). La entrada a otros tipos celulares se considera un evento activo dirigido por el parásito y mediado por receptores (Schenkman et al., 1991). Ouaissi y Capron (1989), sugirieron que la fibronectina actuaría como un puente para facilitar la unión y entrada del parásito a la célula hospedadora. Todos los estadíos de *T. cruzi* son capaces de unir fibronectina y su presencia en ensayos *in vitro*, aumenta la unión del parásito a las células blanco, pero sólo los estadíos virulentos logran entrar en células no fagocíticas, evidenciando que en la entrada interactúan otros factores. En 1987, Andrews y col., definieron inmunológicamente el epítope denominado Ssp3, específico de tripomastigote, que estaría involucrado en la unión del parásito a la célula blanco. Recientemente Schenckman y col. (1991), identificaron una trans-sialidasa de superficie en tripomastigotes de *T. cruzi*, capaz de transferir ácido siálico exógeno al epítope Ssp3. Esta enzima específica de estadío, se encuentra en la superficie del parásito. El grupo postula que la actividad trans-sialidasa de esta enzima provee a Ssp3 el grupo necesario para el reconocimiento de la célula blanco.

Además, en 1991 se describió una proteína que une heparina (llamada penetrina) como la responsable de la unión y penetración de *T. cruzi* a células de mamíferos (Ortega-Barría y col., 1991).

Dentro de la célula hospedadora, *T. cruzi* está contenido en vacuolas ácidas (Ulyses y col., 1989). Después de 1 ó 2 horas, los parásitos alterarían la membrana vacuolar quedando libres en el citoplasma para su replicación (Ley y col., 1990). Este evento está asociado con la liberación de una proteína funcional en el pH bajo de los fagolisosomas capaz de formar poros en la membrana vacuolar. Esta proteína (TC-TOX) está inmunológicamente relacionada con el factor C9 del complemento humano (Andrews y col., 1990). La reactividad inmunológica cruzada entre el factor C9 y TC-TOX, sugiere que las proteínas comparten determinantes antigénicos. Es cada vez más evidente que las proteínas capaces de formar poros en las membranas de células eucariotas tienen dominios conservados (Lichtenheld y col., 1989; Stanley y col., 1987). Estos resultados refuerzan la hipótesis de la actividad formadora de canales de TC-TOX.

1.2.7) Respuesta inmune del hospedador al parásito

Durante la fase aguda de la infección se encuentran parásitos en varios tejidos del hospedador (Zingales y col., 1985). A pesar de observarse una masiva proliferación de células T y B, este estadío está caracterizado en ratones por una severa inmunosupresión (Minoprio y col., 1986) junto con la ausencia, durante las 2 primeras semanas de infección, de cantidades detectables de IL-2 (Harel-Bellan y col., 1983) e IFN-γ (Plata y col., 1987) de modo que los bajos niveles de ambas linfoquinas podrían ser responsables, al menos en parte, por la relativa falta de actividad inmunológica. La eliminación de los parásitos por anticuerpos específicos que inducen su lisis y la activación de los macrófagos también estaría disminuida (Minoprio, 1991).

En el modelo experimental murino, se activan todos los tipos de linfocitos (CD4$\alpha\beta$, CD8$\alpha\beta$, CD8$\gamma\delta$, DNT$\gamma\delta$ y células CD5 B); su número y reactividad no serían compatibles con una respuesta específica contra el parásito (Minoprio y col., 1989). Se observa una expansión clonal de células B que segregan anticuerpos con isotipos específicos (IgG1 e IgG2) (Minoprio, 1989).

Se ha reportado la presencia de anticuerpos específicos contra el parásito en la fase aguda de la infección. Así, en 1987 Ibáñez y col., identificaron un antígeno liberado durante la fase aguda de la Enfermedad de Chagas; el antígeno denominado SAPA es detectable durante un corto periodo de la infección y es reconocido por un 93% de los

sueros de pacientes en fase aguda (Affranchino y col., 1989). Se ha planteado la posibilidad de que estas proteínas sean utilizadas por el parásito para evadir la acción del sistema inmunológico (Frasch, 1989).

La participación de los linfocitos T en la inmunidad a *T. cruzi* ha sido estudiada en el modelo experimental de ratón. Su importancia ha quedado demostrada por la susceptibilidad de los ratones atímicos (*nude*) y ratones depletados de células T a la infección con *T. cruzi* (Tarleton, 1990). La respuesta inmunológica protectora contra *T. cruzi* claramente requiere de la acción combinada de todo el sistema inmunológico, incluyendo los tipos celulares $CD4^+$ y $CD8^+$, células productoras de anticuerpos y actividad NK (Tarleton, 1990) donde la alteración de cualquiera de estos componentes volvería a los ratones incapaces de controlar la fase aguda de la infección.

Inmunizaciones con fracciones subcelulares, parásitos fijados o aún con antígenos parcialmente purificados (Segura y col., 1977) sólo producían inmunidad parcial.

1.2.7.1) Estudio de la respuesta humoral en la Enfermedad de Chagas

La infección activa con *T. cruzi* origina 2 clases de anticuerpos con actividades funcionales diferentes (Krettli y Brener, 1982). En primer lugar están aquellos anticuerpos capaces de proteger al hospedador. Son anticuerpos que se unen a parásitos vivos y los lisan en conjunción con el sistema del complemento, son los **anticuerpos líticos**. La segunda clase son los anticuerpos involucrados en la serología convencional y utilizados para tests diagnósticos de la Enfermedad de Chagas. Estos anticuerpos no son protectores, ni capaces de unirse a parásitos vivos determinados por fijación de complemento o inmunofluorescencia sobre tripomastigotes vivos, son los **anticuerpos serológicos** (Trischmann 1983; Krettli y col., 1982; Hammer y col., 1981). La actividad de los anticuerpos líticos declina más rápidamente que la de los anticuerpos responsables de la serología convencional detectados sobre parásitos fijados o aglutinación en látex (Krettli y col., 1982; Brener y col., 1990).

También ratones parasitológicamente curados por quimioterapia permanecen serológicamente positivos. En estos casos se demostró la existencia de antígenos parasitarios sobre células dendríticas (Andrade y col., 1990). Este mecanismo de "**memoria inmunológica**" podría ser la explicación de la serología positiva en los pacientes tratados (Andrade, 1991).

Es conocido para muchos parásitos intracelulares que la resistencia a la lisis mediada por complemento está regulada según el estadío de desarrollo del parásito (Franke y col., 1985; Budzco y col., 1975; Nogueira y col., 1975). Los tripomastigotes sanguíneos de *T. cruzi* son resistentes a la lisis mediada por complemento en ausencia de anticuerpos específicos de dicho estadío (Krettli y Brener, 1982); esto significaría que la lisis ocurre por la vía clásica del complemento (Reid, 1986). Sin embargo, se demostró que los anticuerpos líticos destruyen al parásito principalmente a través de la vía alterna del complemento (Kipnis y col., 1985).

1.2.8) Antígenos de *Trypanosoma cruzi*

El desarrollo de las técnicas de ADN recombinante y de anticuerpos monoclonales permitió la identificación y caracterización de un gran número de antígenos de *T. cruzi*. Se han descripto en la literatura proteínas relacionadas con la interacción parásito-hospedador (Zingales y Colli, 1985; Alves y col., 1986; Ouassi y col., 1986; Boschetti y col., 1987; De Arruda y col., 1989) y/o con capacidad de conferir protección frente a la infección (Snary, 1983; Scott y col., 1985; Yoshida y col., 1989; Ruiz y col., 1990; Ouassi y col., 1990). Otros antígenos estarían involucrados en la inducción de anticuerpos líticos (Mortara y col., 1988; Norris y col., 1989).

Los resultados de un estudio multicéntrico organizado por la Organización Mundial de la Salud revelaron la potencialidad diagnóstica de antígenos purificados y proteínas recombinantes de *T. cruzi* obtenidos en diferentes laboratorios (Ibañez y col., 1988; Levin y col., 1989; Lafaille y col., 1989; Hoft y col., 1989; Paranhos y col., 1990; Cotrim y col., 1990; Zingales y col., 1990; Moncayo y Luquetti, 1990).

Se identificaron antígenos reconocidos por sueros de pacientes chagásicos con compromiso cardiaco (Levin y col., 1989) o en las etapas más tempranas de la infección (Affranchino y col., 1989; Reyes y col., 1990). Estos podrían ser empleados en el pronóstico y diagnóstico diferencial.

En nuestro laboratorio, utilizando una biblioteca de expresión en λgt11, se han podido aislar dos tipos de antígenos recombinantes de *T. cruzi*:

a) antígenos capaces de reaccionar frente a sueros de pacientes con infección por *T. cruzi*, como JL7 y JL8 (Levin y col., 1989)

b) antígenos que reaccionan con sueros de pacientes con miocardiopatía chagásica crónica (MCC), como JL5 y JL9 (Levin y col., 1989).

1.2.8.1) Antígeno JL7

El antígeno recombinante JL7 codifica una secuencia repetitiva de 68 aminoácidos, similar a la presente en el antígeno 1 (Ibañez y col., 1988), al antígeno FRA (Lafaille y col., 1989) y el recombinante H49 (Cotrim y col., 1990). Se trata de un fragmento de una proteína flagelar de *T. cruzi* de aproximadamente 300 kDa (Lafaille y col., 1989) asociada al citoesqueleto e involucrada en la unión del flagelo al cuerpo celular del parásito (Cotrim y col., 1990).

La capacidad diagnóstica del antígeno JL7 fue evaluada mediante dos estudios multicéntricos usando un ensayo inmunodiagnóstico de placa de lisis (Moncayo y Luquetti, 1990; Levin y col., 1991). En ambos, JL7 obtuvo valores de índice Kappa mayores que 0.8, demostrando ser un excelente reactivo diagnóstico (Levin y col., 1991).

1.2.8.2) Antígeno JL5

El clon recombinante JL5 fue aislado en nuestro laboratorio por rastreo inmunológico de una biblioteca de ADNc de *T. cruzi* (estadío epimastigote) en λgt11 con el suero de un paciente chagásico con cardiopatía severa (Levin y col., 1989). Varias evidencias experimentales sugirieron que este antígeno, de 35 aminoácidos, codificaba para una proteína ribosomal P del parásito (Levin y col., 1989).

Con respecto a la antigenicidad de JL5, éste era reconocido predominantemente por sueros de pacientes chagásicos crónicos con cardiopatía severa, mientras que los sueros de individuos seropositivos sin compromiso cardiaco mostraban una reactividad baja o nula. Esta reacción también era negativa para los sueros de pacientes chagásicos agudos, con Leishmaniasis, con cardiomiopatía no-chagásica y para los sueros de individuos sanos (Levin y col., 1989).

1.2.8.3) Glicoproteínas mayores de superficie

Existen dos grupos mayoritarios de glicoproteínas de superficie, uno en el rango de los 70-75 kDa y el otro en el rango de los 80-90 kDa. Varios grupos han estudiado sus propiedades y funciones y existen aún discrepancias en los datos debidas sobre todo a las diferencias en las técnicas y cepas empleadas.

Snary y Hudson (1980) describieron una glicoproteína de 90 kDa presente en todos los estadios del parásito. Esta proteína también fue identificada por Zingales y col. (1982) quienes describieron una gp95 y una gp85 específica de tripomastigotes. A su vez, Nogueira y col. (1981 y 1982) informaron el hallazgo de una glicoproteína de 90 kDa expresada por estadíos específicos del hospedador mamífero que correspondería a la gp85.

Utilizando anticuerpos monoclonales contra epimastigotes, Snary y col. (1981) identificaron una gp72 específica de epimastigotes. Por su parte, Nogueira y col., (1981, 1982) describieron la existencia de una gp75 presente en los estadíos del insecto de *T. cruzi*. Algunas de estas glicoproteínas cumplirían funciones importantes en los mecanismos de escape y la internalización celular: la gp90 estaría involucrada en el mecanismo antifagocítico de los tripomastigotes y relacionada con la actividad neuraminidasa asociada al mecanismo de entrada a la célula (Nogueira y col., 1986). La gp85 (Zingales y col., 1982) se encuentra involucrada en la internalización del parásito en la célula hospedera. La ausencia de esta glicoproteína en tripomastigotes tratados con tunicamicina, inhibidor de la glicosilación, se correlaciona con la perdida de infectividad *in vitro* (Zingales y col., 1985). Además, anticuerpos contra esta proteína inhiben *in vitro* la infección a fibroblastos. Una gp85 sería también el receptor de fibronectina del parásito. Ouaissi y col., 1988 comprobaron que la fibronectina celular es capaz de modular la adhesión del parásito a las células del hospedador. Las proteínas de superficie de *T. cruzi* que actuarían como receptores de fibronectina fueron aisladas por cromatografía de afinidad y los anticuerpos contra estas proteínas reconocieron un polipéptido de 85 kDa (Ouaissi, 1988). Péptidos con la secuencia de la fibronectina RGD (Arg-Gly-Asp) reconocida específicamente por el receptor de fibronectina, fueron capaces de inhibir *in vitro* la entrada del parásito. Ratones inmunizados con estos péptidos fueron protegidos de una dosis letal de

tripomastigotes demostrando que la inhibición de la adhesión del parásito a la célula tendría utilidad en inmunoprofilaxis (Ouaisssi y col., 1986).

Mendoça-Previato y col., 1983, caracterizó una glicoproteína de 25 kDa a partir de extractos de epimastigotes de *T. cruzi,* encontrándola asociada a la membrana del parásito. La gp25 presenta interés diagnóstico y se ha determinado que reacciona con el 95% de los sueros humanos infectados por *T. cruzi* (Scharfstein y col., 1983). Estudios posteriores, identificaron esta proteína como una cistein-proteinasa de *T. cruzi* y encontraron una fuerte respuesta humoral en pacientes chagásicos crónicos (Cazzulo y col., 1991).

1.2.8.4) Antígenos involucrados en la inmunoprotección

Teniendo en cuenta la existencia de una respuesta inmune humoral protectora de la infección chagásica y que *T. cruzi* no experimenta variación antigénica como otros tripanosomátidos, se han encarado diversas formas de vacunación, utilizando tanto parásitos muertos o atenuados, homogenatos, glicoproteínas de superficie y fracciones subcelulares (Snary, 1983). En consecuencia, se han tratado de identificar antígenos involucrados en la protección tanto aquellos que median la lisis del parásito como aquellos capaces de generar anticuerpos neutralizantes. Así por ejemplo, la inmunización con la glicoproteína de superficie gp90 de epimastigotes (Snary y Hudson, 1979) protegió a ratones de la infección letal aguda (Scott y Snary, 1985).

Según Krettli y Brener (1982), los anticuerpos líticos sólo se producen durante infecciones activas. Se demostró que los sueros de pacientes crónicos con actividad lítica reaccionaron con una proteína de 160 kDa específica de tripomastigotes contra la que no se detectaron anticuerpos en sueros de pacientes chagásicos curados por quimioterapia (Martins y col., 1985). Norris y col. (1989) lograron purificar esta glicoproteína por inmunoafinidad a partir de tripomastigotes metacíclicos utilizando un anticuerpo monoclonal y verificaron que su inoculación producía en conejos anticuerpos capaces de lisar al parásito en presencia de complemento.

Yoshida (1986) inmunizó ratones con tripomastigotes metacíclicos muertos por tratamiento con Merthiolate y logró protegerlos contra la infección letal aguda. Los sueros de los ratones inmunizados produjeron *in vitro* la lisis mediada por complemento de tripomastigotes. Estos sueros y los de ratones infectados crónicos, capaces de

transferir resistencia y alta actividad lítica, inmunoprecipitaron proteínas de superficie de tripomastigotes metacíclicos de 77, 80 y 88 kDa Un anticuerpo monoclonal, IG7, que disminuyó la infectividad de metacíclicos en ratones, identificó una proteína de superficie específica de tripomastigotes metacíclicos de 90 kDa. Otro anticuerpo monoclonal que también produjo un efecto neutralizante en la infectividad de tripomastigotes metacíclicos está dirigido hacia glicolípidos de superficie de 35 y 50 kDa (Yoshida y col., 1989).

1.2.8.5) Antígenos involucrados en la inmunopatogénesis

Los conejos inmunizados con fracciones subcelulares de *T. cruzi* mostraron en el examen histopatológico, focos de miocarditis con infiltrado linfocitario (Texeira y col., 1975). El proceso inflamatorio fue más intenso en los animales inoculados con una fracción enriquecida en ribosomas, polirribosomas, microfilamentos y lisosomas pequeños (Texeira y col., 1975; Texeira y Santos Buch, 1974). Los linfocitos de conejos inmunizados con la fracción compuesta de núcleos y membranas plasmáticas y la compuesta de lisosomas y fragmentos de mitocondrias y retículo endoplásmico (Texeira y Santos Buch, 1974) lisaron fibras musculares infectadas y no infectadas (Santos Buch y Texeira, 1974).

Experiencias realizadas en ratones por Ruiz y col., (1985) mostraron que la mayoría de los ratones inmunizados con la fracción microsomal (análoga a la fracción ribosomal) desarrollaron miocarditis inflamatoria mientras que los inmunizados con la fracción citosólica mostraron predominantemente alteraciones en el Electrocardiograma (ECG). Esto indicaría que los mecanismos involucrados en la generación de la miocarditis y la destrucción del sistema de conducción del impulso eléctrico son diferentes dado que son provocados por inmunizaciones con fracciones antigénicas distintas (Ruiz y col., 1985). De la misma manera, López Bergami (tesis de Licenciatura, 1995) al inmunizar ratones con la porción C-terminal de la proteína P2β de *T. cruzi*, obtuvo alteraciones en el ECG y una reacción autoinmune contra proteínas de corazón de mamífero.

De Titto (1982 y 1985) midió la respuesta inmune humoral y celular de pacientes chagásicos contra estas fracciones del parásito. Comprobó que el título de anticuerpos contra la fracción microsomal y la respuesta linfoproliferativa hacia la fracción citosólica

son mayores en pacientes con enfermedad cardíaca de Chagas, sugiriendo una asociación entre la respuesta inmune contra estas fracciones y la patología cardíaca.

INTRODUCCIÓN

Infección Mixta

Leishmaniasis Mucocutánea
Enfermedad de Chagas

1.3) La infección mixta Leishmaniasis Mucocutánea/Enfermedad de Chagas

El conocimiento de la existencia de Leishmaniasis en la Argentina se remonta a informes del año 1916 (Segura y col. VI Congreso Argentino de Microbiología, Buenos Aires, 1995), aunque todavía hoy la prevalencia e incidencia de esta enfermedad no son conocidas. Sin embargo, la aparición de más de 500 casos en la provincia de Salta a partir de 1985, determinó un aumento del interés en esta infección parasitaria.

Los estudios realizados hasta el momento demuestran que la especie *Leishmania (Viannia) braziliensis* es la predominante en la Argentina (Salomón y col. XII Reunión Anual Sociedad Argentina de Protozoología, Buenos Aires, 1992) y ésta sería la causante de la aparición de lesiones mucocutáneas (WHO, Technical report, 1984).

Las zonas geográficas donde se han registrado casos de Leishmaniasis (Salta, Chaco y Tucumán) se superponen con áreas endémicas para la Enfermedad de Chagas.

Debido a esta superposición es factible la existencia de pacientes infectados por *L.(V.) braziliensis* y *T. cruzi* simultáneamente. Varios autores han sugerido la presencia de pacientes con infección mixta. En estos casos, la infección por *Leishmania* sp fue diagnosticada por la detección directa del parásito en las lesiones, en cambio la infección por *T. cruzi* sólo ha sido sugerida por la reactividad positiva frente a antígenos complejos de *T. cruzi* y a la presencia de alteraciones cardíacas típicas (Chiller y col., 1990; Levy-Yeyati y col., 1991).

Las reacciones serológicas convencionales (HAI, AD, IFI, ELISA) empleadas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas utilizan como antígeno el parásito entero o fracciones subcelulares de los mismos, lo que provoca errores diagnósticos debido a la existencia de antígenos de reactividad cruzada. El uso de antígenos purificados y específicos aparece entonces como la única alternativa para un diagnóstico seguro y confiable.

La terapia utilizada más frecuentemente para el tratamiento de Leishmaniasis, es una quimioterapia basada en compuestos derivados de Sb^5 (Glucantime® o Pentostam®), que debido a sus efectos colaterales (artralgias, mialgias, daño hepático, renal y cardíaco) podría ser fatal para enfermos chagásicos con compromiso cardíaco.

Por lo tanto, resulta indispensable perfeccionar al máximo el diagnóstico de estas infecciones en regiones donde la infección mixta es probable.

En nuestro laboratorio, Levy-Yeyati y col., 1991 había descripto que la hsp70 de *T. cruzi* y *L.(V.) braziliensis* eran antígenos inmunodominantes en la infección mixta *L.(V.) braziliensis/T. cruzi*.

OBJETIVOS

2) OBJETIVOS

Las evidencias presentadas en esta introducción indican que en Perú co-existen tres endemias causadas por kinetoplástidos. Una de ellas es la Leishmaniasis Cutánea Andina LCA causada por *Leishmania (Viannia) peruviana;* la segunda, debida a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, la cual causa diferentes formas clínicas de Leishmaniasis (LCS y LMC). La tercera es la Enfermedad de Chagas (ECh), con prevalencia en el sur peruano. En Bolivia se dan estas dos últimas. Actualmente, el diagnóstico de los síntomas clínicos de cada infección recibe confirmación serológica con ensayos cuyas bases antigénicas son extractos del parásito correspondiente. Sin embargo, y pese a que este tipo de reactivo diagnóstico confiere máxima sensibilidad, es un ensayo de escasa especificidad. Este problema del diagnóstico serológico ha sido solucionado para la Ech con la introducción de las técnicas de ADN recombinante. En efecto, estas técnicas permitieron el clonado molecular de antígenos de *Trypanosoma cruzi* reconocidos por una gran mayoría de pacientes chagásicos, que se han convertido en excelentes reactivos diagnósticos, de máxima sensibilidad y especificidad.

Este tipo de reactivo diagnóstico falta para la infección por *L.(V.) braziliensis* y *L.(V.) peruviana*. La existencia de tales reactivos (antígenos recombinantes) permitiría confirmar rápidamente el diagnóstico clínico de la enfermedad y de esta forma iniciar un agresivo régimen quimioterapéutico para favorecer una resolución temprana de la misma.

A partir de estas observaciones, los objetivos de esta tesis son los siguientes:

a) Caracterizar la respuesta humoral de los pacientes peruanos con Leishmaniasis Cutánea Andina (LCA), Leishmaniasis Cutánea Selvática (LCS) y Leishmaniasis Mucocutánea (LMC), de pacientes bolivianos con la infección mixta *L.(V.) braziliensis/T. cruzi* (IM) y pacientes argentinos con la Enfermedad de Chagas (ECh).
b) Una vez analizado el perfil de antígenos reconocido por los sueros peruanos, clonar y caracterizar antígenos de *Leishmania* sp. En particular antígenos de *L.(V.) peruviana* sobre los que no existe mayor información.

c) Probar la capacidad diagnóstica de los diferentes antígenos surgidos del trabajo sobre el objetivo b).

d) Formular, de ser posible un ensayo simple que permita el diagnóstico serológico de las infecciones mencionadas arriba con máxima sensibilidad y especificidad.

e) Analizar con el máximo detalle los casos de la infección mixta *L.(V.) braziliensis*/*T. cruzi* que son los que plantean mayores dificultades diagnósticas.

MATERIALES

Y

MÉTODOS

3.1) Bacterias y fagos

El vector de expresión λgt11 y la cepa hospedadora *E. coli* RY1090 (Young y Davies, 1983) se obtuvieron de Amersham. El fenotipo de la cepa RY1090 es: rk^- Lac^- Lon^- (genotipo relevante: hsd R, sup F, Δlac, Δlon, pMC9). El vector de expresión pGEX1λT se obtuvo de Pharmacia y las células hospedadoras DH5αF' y JM109 fueron de Stratagene. El vector M13mp18/EcoRI/BAP se obtuvo de Amersham. El plásmido pGEM3zf(+) fue obtenido de Promega.

DH5αF': F'/EndA1 hsdR17 (rK^- mK^+) supE44 thi^-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ(lacZYA$^-$ argF)U169 (Φ80dlacΔ(lacZ)M15).

JM109: 14^-($McrA^-$) recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17(rK^- mK^+) supE44 relA1 Δ(lac-proAB) [F' traD36 proAB $lacI^q$ ZΔM15].

El medio Luria-Bertani (LB) fue el cultivo líquido bacteriológico usado con todas las bacterias. LB es preparado con 10g de Bacto-triptona (DIFCO), 5g de extracto de levadura (DIFCO), 10g NaCl por litro de cultivo. Los medios sólidos se prepararon agregando 0.6% y 1.5% de agar (DIFCO) para el medio blando y duro, respectivamente. Las bacterias fueron mantenidas a 4°C en "*stabs*" de agar LB y fueron rastrillados sobre placas de agar LB e incubados a 37°C por toda la noche. Las células DH5αF' conteniendo el plásmido pGEX1λT fueron rastrillados sobre placas de agar LB conteniendo 100 μg/ml de ampicilina. Para mantenimiento por largos perlodos de tiempo, las bacterias fueron criopreservadas a -70°C en medio LB suplementado con 30% de glicerol estéril.

3.2) Sueros y anticuerpos

3.2.1) Sueros de pacientes con Leishmaniasis, Enfermedad de Chagas y otras enfermedades:

Los sueros de individuos infectados por *L.(V.) braziliensis* con Leishmaniasis cutánea selvática (LCS, N=12) y Leishmaniasis mucocutánea (LMC, N=45) fueron colectados en el Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", Lima, Perú y en el Instituto Boliviano de Biología de Altura (IBBA), La Paz, Bolivia. Los sueros de pacientes infectados con *L.(V.) peruviana* que padecían Leishmaniasis cutánea andina (LCA, N=23) fueron colectados en el Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", Lima, Perú. En todos los casos, la infección por *Leishmania* sp. fue determinada por signos clínicos, cultivo de parásitos e inoculación en hámsters (Grimaldi Jr. y Tesh R.B., 1993).

Los sueros correspondientes a la infección mixta *L.(V.) braziliensis/ T.cruzi* (N=6) fueron obtenidos de individuos bolivianos que presentaban lesiones en la mucosa facial características de la Leishmaniasis mucocutánea, conjuntamente con signos y/o síntomas de cardiopatía chagásica crónica. Estos pacientes fueron evaluados en el Instituto Boliviano de Biología de la Altura (IBBA).

Los sueros de pacientes infectados con *T. cruzi* (N=45) fueron proporcionados por el Servicio de Cardiología del Hospital "Ramos Mejía", Buenos Aires, Argentina. La evaluación clínica y electrocardiográfica de estos pacientes revelaba claros signos de cardiopatía chagásica crónica. En estos pacientes, la infección por *T. cruzi* fue determinada por hemoaglutinación pasiva, fijación de complemento e inmunofluorescencia indirecta (Camargo y col., 1986).

Los sueros de pacientes con enfermedades no relacionadas, tales como Malaria (N=10), Toxoplasmosis (N=5), Tuberculosis (N=5), Lepra lepromatosa (N=10) fueron proporcionados por el Instituto de Medicina Tropical "Alexander von Humboldt", Lima, Perú.

3.2.2) Anticuerpos monoclonales:

Para determinar la identidad de U4 como la hsp70 de *L.(V.) peruviana* se utilizó el anticuerpo monoclonal D4F18 que reconoce un epitope altamente conservado en las hsp70 de todas las especies ensayadas hasta el momento (Blisnick y col., 1988).

3.3) Parásitos

La cepa de *L.(V.) peruviana* usada para la construcción de la biblioteca de ADNc y otros estudios fue una cepa de referencia del banco de la Organización Mundial de la Salud codificado como MHOM/PE/84/LC26. Esta cepa fue inicialmente caracterizada mediante isoenzimas, hibridización de ADN de kinetoplasto y anticuerpos monoclonales como perteneciente al complejo *L. braziliensis* (Romero y col.,1987). Posteriormente, Arana y col. (1990) mediante estudios de isoenzimas identificaron a este parásito como *L.(V.) peruviana*. La construcción de la biblioteca de ADNc fue realizada con un clon de este aislado obtenido por dilución limitante. Para el aislamiento de ADN y proteínas de *L.(V.) braziliensis* se usó una cepa de referencia del banco de la Organización Mundial de la Salud codificado como MHOM/PE/84/LC53. Para la obtención del extracto proteico de *T. cruzi* se usó la cepa RA.

Los cultivos de *Leishmania* fueron mantenidos en frascos autoclavables y repicados en una cabina de clase II, como está establecido por las regulaciones GMAG. Los parásitos fueron cultivados en medio bifásico, cuya fase sólida era agar base sangre (Agar base sangre, DIFCO) suplementado con 15% de sangre defibrinada de conejo (Walton y col., 1977). La fase líquida era 0.9% NaCl. Otro medio usado para el crecimiento de *Leishmania* sp. fue el medio Schneider (DIFCO) suplementado con 15% Suero Fetal de Ternera (GIBCO). Los cultivos fueron mantenidos a 25°C y repicados continuamente. La contaminación bacteriana fue evitada con penicilina a una concentración final de 5.000 U/ml (Palomino y col.,1983).

3.4) Métodos generales de análisis y purificación de ácidos nucleicos

3.4.1) Aislamiento de ácidos nucleicos de *Leishmania*

3.4.1.1) Extracción de ADN genómico:

Los parásitos ($5x10^9$) fueron crecidos y pasados a través de una jeringa conteniendo lana de vidrio siliconizada para retener el agar del medio y fueron centrifugados. Inmediatamente, se lavaron con PBS (150 mM NaCl, 16 mM Na_2HPO_4, 4 mM NaH_2PO_4 pH 7.5) y resuspendieron en 10 ml de PBS. Luego, se añadió 10 ml buffer de lisis A (10 mM Tris-HCl, pH:7.5; 10 mM EDTA; 10 mM NaCl; 1% SDS) y se incubó por 15 minutos a 37°C. Se agregó Proteinasa K a una concentración final de 50 µg/ml e incubó a 50°C por 3 horas o por toda la noche. Se dializó contra buffer TE (10 mM Tris-HCl pH:8; 1 mM EDTA). Se extrajo una vez con fenol equilibrado, una vez con cloroformo y se precipitó con etanol absoluto.

3.4.1.2) Extracción de ARN total:

A un pellet de aproximadamente 10^7 parásitos se le adicionó 1 ml de solución denaturante (4M isotiocianato de guanidinio; 25mM citrato de sodio pH:7; 0.1M β-mercaptoetanol; 0.5% lauril sarcosine). El lisado se pasó a través de una pipeta Pasteur por 7-10 veces y el homogenato se transfirió a un tubo de polipropileno de 5 ml. Luego, se adicionó 0.1 ml de 2M acetato de sodio y se mezcló por inversión. Se agregó 1 ml de fenol equilibrado y se mezcló bien. Se agregó 0.2 ml de cloroformo, se mezcló e incubó por 15 minutos a 4°C. Se procedió a centrifugar por 20 minutos a 9.000 rpm a 4°C en un rotor SS-34. Se tomó el sobrenadante y se agregó 1 volumen de isopropanol y se colocaron las muestras a -20°C. Se centrifugó 10 minutos a 10.000xg a 4°C y se disolvió el ARN en 0.3 ml de solución desnaturalizante y se transfirió a un tubo Eppendorf. El ARN se precipitó con 0.3 ml isopropanol y se incubó 30 minutos a -20°C. Se volvió a centrifugar por 10 minutos a 10.000xg a 4°C y se resuspendió el pellet de ARN en 75% de etanol y se mezcló en un vortex por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, se centrifugó 5 minutos a 10.000 Xg, se

secó el pellet de ARN y se disolvió en 0.2 ml de agua tratada con dietilpirocarbonato (DEPC).

3.4.1.3) Cuantificación del ADN y ARN:

La concentración de ácidos nucleicos fue medida usando un espectrofotómetro Beckman. Para el caso de ADN se asume que 1 DO_{260} equivale a 50 µg/ml de ADN, mientras que para el ARN 1 DO_{260} equivale a 40 µg/ml de ARN.

3.4.2) Digestión de ADN genómico y ADN plasmídico con endonucleasas de restricción:

Las enzimas de restricción y su buffer apropiado fueron obtenidas de GIBCO BRL o New England Biolabs y fueron usados como lo recomiendan sus fabricantes. En el caso de ADN genómico, las restricciones fueron llevadas a cabo usando 10U de enzima/µg de ADN en un volumen total de 50 µl a la temperatura de incubación apropiada por 1 hora. Posteriormente, 10U adicionales de enzima fueron aplicados a la mezcla de reacción y la incubación se continuó por 2 horas más. La digestión de plásmidos se llevó a cabo usando 1U/µg de ADN en un volumen de 10 µl a 37°C por 1 hora.

3.4.3) Electroforesis en geles de agarosa:

Los fragmentos de ADN se separaron por electroforesis en geles de agarosa. El porcentaje de agarosa usado fue variable oscilando en el rango de 0.4-1%, dependiendo del tamaño de los fragmentos a resolver. Los geles se prepararon y la electroforesis se realizó en buffer TAE (0.04M tris-acetato/ 1mM EDTA, pH:8). Las muestras fueron mezcladas en proporción 1:5 con el buffer de siembra 6X (30% glicerol en agua/ 0.25% azul de bromofenol/ 0.25% de xileno cianol FF). La electroforesis se llevó a cabo en un aparato de electroforesis horizontal de BRL (Horizon) a voltajes cuyo rango oscilaba entre 20 y 100 V (voltaje constante) y por tiempos que variaban entre 1 y 18 horas dependiendo del tamaño del gel, del voltaje usado y la resolución requerida.

El ADN fue coloreado usando una solución de 1 μg/ml de bromuro de etidio en buffer TAE una vez terminada la electroforesis. Los ácidos nucleicos fueron visualizados en un trans-iluminador de luz UV de onda corta y fotografiado usando una cámara Polaroid con film tipo 665 o en un Baby Imager (Appligene).

La determinación del tamaño de los fragmentos de ADN se llevó a cabo mediante electroforesis en gel de agarosa usando marcadores de peso molecular apropiados. Los marcadores de peso molecular usados en este estudio fueron Φx-174/Hae III (BRL), 1 Kb ladder (Gibco BRL) y λ/Hind III (Promega). Los tamaños de los fragmentos de estos marcadores son:

Φx-174/Hae III (pb):1353, 1078, 872, 603, 310, 281, 271, 234, 194, 118, 72.

1 Kb ladder (pb): 75, 134, 154, 201, 220, 298, 344, 396, 506/517, 1.018, 1636, 2.036, 3.054, 4.072, 5.090, 6.108, 7.126, 8.144, 9.162, 10.180, 11.198, 12.216.

λ/Hind III (pb): 23,130 (47,7%); 9,416 (19,4%); 6,682 (13,52%); 4,371 (9,01%); 2,322 (4,78%); 2,027 (4,18%); 564; 125.

3.4.4) Recuperación de los fragmentos de ADN de geles de agarosa de bajo punto de fusión:

El fragmento de ADN a ser aislado fue sometido a una electroforesis en geles de 3% NuSieve (FMC) o 1% LMP agarosa (BRL), coloreado con bromuro de etidio y visualizado por radiación UV de onda larga (300-360 nm) por breve periodo de tiempo para reducir el daño al ADN. Posteriormente, se procedió a cortar el pedazo de gel conteniendo el fragmento de ADN de interés, el cual se colocó en un tubo Eppendorf, al que se agregaron 200 μl de buffer TE y 100 μl de acetato sodio 3M, pH:6. Se incubó el tubo a 65°C por 10 minutos. Luego, se agregó al tubo 500 μl de fenol a 65°C, se mezcló en vortex y centrifugó en una microcentrífuga de mesa a 12.000 Xg por 5 minutos. Se repitió una vez más la extracción con fenol. A la fase acuosa se le agregaron 2 volúmenes de etanol absoluto frío y se dejó en hielo por 10 minutos. Se centrifugó por 20 minutos y se lavó el pellet dos veces con 200 μl de etanol 80%. Se secó el pellet y resuspendió en buffer TE.

3.4.5) Transferencia de moléculas de ADN en geles de agarosa a membranas de Nylon (Southern blot):

La transferencia de fragmentos de ADN de geles de agarosa se realizó según Sambrook y col., 1989. Después de la electroforesis, se transfirió el gel a una fuente de vidrio y se cortaron las áreas del gel no usadas con un escalpelo. Se denaturó el ADN por inmersión del gel por 45 minutos en 1.5M NaCl/0.5M NaOH con agitación suave y constante. Luego, se lavó el gel con agua desionizada y se neutralizó por inmersión por 30 minutos en 1M Tris-HCl, pH:7.4/1.5M NaCl a temperatura ambiente con agitación suave y constante. Se cambió la solución de neutralización y se continuó incubando el gel por unos 15 minutos adicionales. Mientras el gel se encontraba en la solución neutralizante, se envolvió con papel Whatman 3MM un trozo Plexiglass para formar un soporte ligeramente más largo y ancho que el gel. Se colocó el soporte dentro de la fuente de vidrio y se llenó la bandeja con buffer de transferencia (10X SSC) (20X SSC: 3M NaCl/0,3M Na_3 Citrato) hasta que el nivel del líquido alcance la parte superior del soporte. Cuando el papel 3MM sobre la parte superior del soporte estuvo totalmente húmedo, se removieron las burbujas de aire con una varilla de vidrio. Se cortó el filtro de Nylon Hybond N^+ (Amersham) aproximadamente 1 mm más largo que el gel en ambas direcciones. Se usaron guantes y pinzas de extremos romos para manipular el filtro. Se removió el gel de la solución neutralizante, se lo invirtió de forma tal que la parte inferior se encontrara en la parte superior y se lo colocó sobre el soporte. Se aseguró que no haya burbujas entre el papel 3MM y el gel y se colocó en los alrededores (sin llegar a cubrir) del gel papel celofán o Parafilm. Se colocó el filtro de Nylon Hybond N^+ sobre el gel. De nuevo, se aseguró que no haya burbujas entre el filtro y el gel. Se humedecieron 2 trozos de papel Whatman 3MM (cortados exactamente del tamaño del gel) en 2X SSC y se colocaron sobre el filtro húmedo. Se retiró cualquier burbuja de aire con un varilla de vidrio. Se cortó una pila de papel toalla (5-8 cm de alto) ligeramente más pequeña que los papeles 3MM, los cuales se colocaron sobre los papeles 3MM. Se colocó una placa de vidrio sobre la pila de papel toalla y se colocó encima un peso de aproximadamente 500 g.

La transferencia de ADN se llevó a cabo por 20 horas. Cuando los papeles toalla se humedecieron, éstos debieron ser reemplazados. Finalizada la transferencia, se removieron la pila de papel toalla y los papeles 3 MM. Se volteó el gel y el filtro de

Nylon fue colocado estando el gel en la parte superior sobre hojas de papel 3 MM secas. Se marcaron las posiciones de los depósitos del gel sobre el filtro con un lápiz de punta fina. Se retiró el gel del filtro y se descartó el gel. Se incubó el filtro en 6X SSC por 5 minutos a temperatura ambiente para remover cualquier pedazo de agarosa pegado al filtro. Se removió el filtro y se colocó sobre papel toalla para secarlo por al menos 30 minutos a temperatura ambiente. Se fijó el ADN al filtro por exposición a una fuente de irradiación ultravioleta (254 nm) por 10 minutos.

3.4.6) Preparación de sondas radioactivas:

El ADN de los genes de las proteínas ribosomales P2α y P2β de *L.(L.) infantum* fueron proporcionados por el Dr. C.A. Alonso, Universidad Autónoma de Madrid. Los insertos fueron subclonados en pUC13 y liberados usando Eco RI (Soto y col., 1993). El clon recombinante correspondiente a la hsp70 de *L.(V) braziliensis* fue proporcionado por la Dra. Patricia Levy-Yeyati (INGEBI, Buenos Aires, Argentina). Este recombinante (Lbb1) proviene de una biblioteca de expresión en λgt11 y el inserto codifica la porción C-terminal de dicho gen. El tamaño del inserto es de 2.0 Kb.

Las sondas radioactivas se prepararon usando el kit comercial "Multiprime DNA labeling kit" (Amersham). El ADN ha ser marcado radioactivamente fue denaturado en un baño hirviendo por 5 minutos e inmediatamente colocado sobre hielo. La mezcla de reacción contenía el ADN denaturado (20 ng de inserto resuspendido en 5 µl), 5 µl de primer/BSA, 5 µl de buffer de reacción, 4 µl de dATP, 4 µl dGTP, 4 µl dTTP, 17 µl de agua, 3 µl [α-^{32}P] dCTP (3.000 Ci/mmol) y 3 µl del fragmento Klenow. La mezcla de reacción se incubó a 37°C por 30-45 minutos y se detuvo la reacción por la adición de 20mM EDTA pH:8. La sonda se purificó por precipitación diferencial con Acetato de amonio como lo recomiendan los fabricantes. La determinación de la eficiencia de marcado se realizó por medición de las cuentas por minuto de 1 µl de sonda marcada en un contador de centelleo.

3.4.7) Hibridización con sondas radioactivas:

Los filtros de Nylon fueron pre-hibridizados en bolsas de plástico con la mezcla "rapid hibridization" de Amersham por al menos 30 minutos a 65°C. Las sondas de ADN

marcadas radioactivamente ($1x10^6$ cpm) preparadas en la sección anterior fueron hervidas por 5 minutos y denaturadas al colocarlos en hielo por 10 minutos antes de adicionarla a la bolsa plástica conteniendo los filtros. La hibridización se llevó a cabo en un incubador a 65°C por 2 horas. Luego de la hibridización, los filtros fueron lavados con 2X SSC/ 0.1% SDS por 15 minutos (dos veces), 1X SSC/ 0.1% SDS por 15 minutos (dos veces) y 0.1X SSC/ 0.1% SDS por 15 minutos (una vez) a 65°C con agitación. Después de los lavados, los filtros fueron envueltos en papel celofán y expuestos a un film de rayos X (Fuji NIF-RK) a -70°C con pantallas intensificadoras.

3.5) Métodos generales para el análisis de proteínas:

3.5.1) Dosaje de proteínas:

Las concentraciones de las soluciones proteicas fue determinado por el método de Bradford (1976) usando un kit correspondiente de Amersham.

3.5.2) Preparación de extractos totales de *Leishmania sp.* y *T. cruzi:*

Los promastigotes (aproximadamente 10^6) fueron lavados por centrifugación con PBS/1% de glucosa. Posteriormente, fueron resuspendidos en agua destilada estéril, congelados inmediatamente por inmersión en nitrógeno líquido y lisados por tres ciclos de congelamiento-descongelamiento. Las muestras se almacenaron a -20°C.

3.5.3) Electroforesis en geles desnaturalizantes de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE):

La separación de las proteínas en una dimensión se realizó siguiendo el método descripto por Laemmli (1970) para geles discontinuos conteniendo SDS. Se utilizaron las cubas y accesorios de los sistema de Bio Rad (Richmond, CA, USA) "mini-protean II" para geles pequeños de 7x8 cm. Todos los reactivos empleados también fueron de Bio Rad (Richmond, CA, USA). Para el armado de un gel pequeño, se siguió la siguiente tabla:

a) Gel separador (0,375M Tris, pH: 8,8):

Soluciones madre	**Para una concentración final de acrilamida:**			
	7,5%	**10%**	**12%**	**15%**
30% acrilamida/0,8% bis-acrilamida	2,5 ml	3,3 ml	4,0 ml	5,0 ml
1,5M Tris-HCl, pH: 8,8	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
10% SDS	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml	0,1 ml
Agua destilada	4,9 ml	4,1 ml	3,4 ml	2,4 ml
10% persulfato de amonio	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl
TEMED	5 µl	5 µl	5 µl	5 µl
Total	**10 ml**	**10 ml**	**10 ml**	**10 ml**

Gel concentrador (0,125M Tris, pH: 6,8):

Soluciones madre	**Para una concentración final de acrilamida: 4%**
30% acrilamida./0,8% bis-acrilamida	0,67 ml
0,5M Tris-HCl, pH: 6,8	1,25 ml
10% SDS	50 µl
Agua destilada	3,05 ml
10% persulfato de amonio	25 µl
TEMED	5 µl
Total	**5 ml**

Para evitar la inhibición de la polimerización por contacto con el aire y obtener una interfase recta, luego de verter entre los vidrios la mezcla del gel separador, se colocó 0,2 ml de agua.

Ocurrida la polimerización (20 min. a temperatura ambiente), se volcó el agua y se completó el armado con la mezcla correspondiente al gel concentrador y el peine elegido.

Las muestras a analizar se colocaron en tubos Eppendorf, se completaron con un volumen de tampón siembra (0,02% azul de bromofenol, 4% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 20% glicerol, en TBS) y se calentaron a ebullición durante 3 min.

Como tampón de corrida se utilizó una solución 0,1% SDS, 192 mM glicina, 25 mM Tris-HCl, pH: 8,3. Las condiciones de migración fueron: 20 mA (corriente constante) por aproximadamente. 45 min.

3.5.4) Tinción de geles con Azul de Coomasie:

Los geles fueron coloreados con una solución de azul de Coomasie (40% metanol, 10% ácido acético, 0.1% azul de Coomasie R-250) durante 30 minutos. Posteriormente, los geles fueron decolorados con una solución decolorante rápida (50% metanol, 10% ácido acético) por 60 min. y con la solución decolorante (5% metanol, 10% ácido acético) por 6 horas.

3.5.5) Marcadores de peso molecular para SDS-PAGE:

Los pesos moleculares de las bandas de proteínas fue estimada por comparación con marcadores standard pre-coloreados SDS-PAGE de Bio Rad. Cinco µl de marcadores por carril fue usado. Los pesos moleculares aparentes en Daltons son como sigue: Fosforilasa B (106.000), Albúmina Sérica Bovina (80.000), Ovoalbúmina (49.500), Anhidrasa Carbónica (32.500), Inhibidor de Tripsina (27.500) y Lisozima (18.500).

3.5.6) Western-Blot:

Luego de realizada la electroforesis, los geles de poliacrilamida fueron transferidos a membranas de nitrocelulosa e incubados con anticuerpos (Towbin y col., 1977). Las transferencias se realizaron en un aparato Mini-Transblot de Bio Rad. Después de la electroforesis, los geles fueron incubados en buffer de transferencia (20mM Tris-HCl pH:7.4, 150mM glicina, 0.1% SDS, 20% metanol) por 15 minutos. Para llevar a cabo la

transferencia de un minigel (5.5x8 cm) una hoja de papel de nitrocelulosa (Hybond C, Amersham) y 2 hojas de papel Whatman 3MM fueron cortados del mismo tamaño del gel e incubados en el mismo buffer. La unidad de transferencia fue ensamblada y las proteínas transferidas por 60 minutos a 0.8 mA/cm^2 (corriente constante). Después de la transferencia, las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas con TBS e incubadas con sol. de bloqueo, 3% BSA en TBS (10mM Tris-HCl, pH:7.4/ 150mM NaCl) durante 60 minutos o por toda la noche a 4°C. Luego, los filtros fueron lavados con una TBS-Tw (0.05% Tween 20 en TBS). Todos los lavados fueron llevados a cabo por 3 veces de 5 minutos cada uno a temperatura ambiente. Inmediatamente, las membranas fueron incubadas con una dilución apropiada del primer anticuerpo (usualmente 1/400) en sol. de bloqueo por 1 hora a temperatura ambiente o por toda la noche a 4°C. Los anticuerpos unidos se detectaron utilizando el kit ABC Vectastain (Vector Laboratories). Siguiendo las especificaciones de los fabricantes, se agregó el segundo anticuerpo (anti-IgG humana total, biotinilado, preparado en cabra (kit ABC Vectastain, Vector Laboratories) diluido 1:200 en solución de bloqueo y se incubó por 45 min.

Luego de 3 lavados de 5 min. en TBS-Tw, se colocó el complejo avidina-biotina-peroxidasa, (preparado 30 min. antes como lo sugieren los fabricantes: 2 gotas de reactivo A (avidina DH) + 2 gotas de reactivo B (peroxidasa biotinilada) en 10 ml de TBS y se incubó por 45 min. adicionales. El exceso de complejo se eliminó con 3 lavados de 3 min. en TBS. Para el revelado, se agregaron 15 mg 4-cloro-1-naftol (Merck, Darmstadt, Germany) disueltos en 5 ml de metanol frío y 8 µl de H_2O_2 30% a 20 ml de TBS. Esta solución se volcó inmediatamente sobre el filtro y se incubó en la oscuridad hasta la aparición de las bandas (5 a 15 min.). La reacción se paró lavando el filtro con agua.

3.5.7) Ensayos de ELISA

Los ensayos de ELISA se realizaron básicamente como fue descrito por Mesri y col., 1990. Se emplearon como antígeno las proteínas de fusión GST-U4 y GST-JL7 y la proteína GST como control, todas ellas purificadas según se describe en 2.7.3. La cantidad óptima para cubrir cada pocillo se determinó a través de una curva con 50, 100, 200, 400 y 800 ng de proteína. Obteniéndose una DO_{415} máxima con 400 ng. Los sueros se emplearon diluidos 1:400, ya que á esta dilución los valores de DO_{415}

obtenidos para los sueros controles positivos se encontraban sobre la porción lineal de la curva. Brevemente, las placas de poliestireno (E.I.A. II Plus Microtritation plate, Flow Laboratories, Inc) se recubrieron con las proteínas recombinantes o con la GST sola diluidas en tampón carbonato pH:9,6 y se incubaron toda la noche a 4°C. Luego de lavarlas 3 veces con PBS/Tw, (PBS-0,05%/Tween 20) se incubaron con 200ul/pocillo de solución de bloqueo (5% leche descremada-PBS/Tw) y se incubó a 37°C por 1 hora. Luego de lavar nuevamente con PBS/Tw, se agregó 100 µl/pocillo de suero diluido en 2,5% leche descremada-PBS/Tw y se incubó a 37°C por 1 hora. Nuevamente, se lavaron los pocillos con PBS/Tw y se incubaron con 100µl de anti-IgG humana conjugados con fosfatasa alcalina diluida 1:1.000 en solución de bloqueo, por 1 h a 37°C. Finalmente, después de dos lavados con PBS/Tw20 y un lavado con PBS, se reveló incubando con 1mg/ml de p-nitrofenilfosfato (Sigma, St. Louis, MO, USA) en 0,15M NaCl, 0,9M Tris-HCl, pH: 8,2 durante 1h a 37°C. Los valores de densidad óptica (DO) se midieron a 415 nm en un lector BDSL Immunoskan 340 (Labsystems, Finland). La reactividad contra cada proteína de fusión se determinó restando los valores de DO obtenidos para cada suero contra las proteínas recombinantes y la GST sola. Estos valores se promediaron con los valores obtenidos en dos experiencias independientes.

3.6) Construcción de la biblioteca de ADNc de promastigotes de *L.(V.) peruviana* en λgt11

3.6.1) Purificación de los ARN polladenilados a través de columnas de oligo(dT)-celulosa

Los ARN poliadenilados fueron purificados del ARN total por cromatografía de afinidad sobre columnas de oligo(dT) celulosa de acuerdo a Aviv y Leder, 1972. Brevemente, 500mg de oligo(dT)-celulosa (Boehringer) fueron reconstituidos en buffer de aplicación (10mM Tris-HCl pH:7.4; 1mM EDTA; 0.5M NaCl; 0.1% SDS) y usados para cargar una columna de 0.5 ml de volumen hecha sobre una pipeta Pasteur de vidrio, la cual había sido previamente obturada en un extremo con lana de vidrio estéril. La matriz fue lavada con 20 ml de buffer de aplicación y con 10 ml 0.1M NaOH seguido de buffer de aplicación hasta que el eluyente fuera pH:7.4 (aproximadamente 20 ml). El ARN total

fue resuspendido en agua a un volumen final de 1.8 ml, incubado en un baño de agua a 65°C por 3 minutos e inmediatamente colocado sobre hielo. Posteriormente, 0.2 ml NaCl de un stock de 5M fue adicionado, siendo la concentración final 0.5M. Paso seguido, se colocó lentamente la muestra, la columna fue lavada con 30 ml de buffer de aplicación y el ARN unido a la columna eluido con 4 ml de buffer de elución (10mM Tris-HCl pH:7.4; 1mM EDTA; 0.1% SDS). Cada fracción (conteniendo 1ml) fue colectada y medida por espectrofotometría. Una mezcla de las fracciones exhibiendo la más alta concentración fue realizada y precipitada con 2.5 volúmenes de etanol frío. Los ARN poliadenilados fueron resuspendidos en TE y almacenados a -70°C.

3.6.2) Síntesis de ADNc

El ARN poliadenilado aislado de promastigotes de *L.(V.) peruviana* (cepa LC26) se empleó para preparar la biblioteca de ADNc por el método de Gubbler y Hoffman, 1983. Para tal propósito, el kit comercial "cDNA synthesis system plus" (Amersham) y los protocolos proporcionados por el kit fueron usados, a menos que sea especificado.
La síntesis de la primera cadena se realizó usando oligo(dT) priming del ARN poliadenilado en 20µl de reacción, conteniendo 4 µl del 5X buffer de reacción, 1µl de la solución de pirofosfato de sodio, 1µl del inhibidor de ribonucleasas de placenta humana, 2µl de la mezcla de deoxirribonucleótidos trifosfatados, 1µl de oligo(dT), 10µCi de [α-^{32}P] dCTP (3.000 Ci/mmol), 1µl de ARN poliadenilado (1µg) y 20U de transcriptasa reversa aviar (AMV). La mezcla de reacción fue incubada por 50 minutos a 42°C, y luego puestas sobre hielo. Dos alícuotas (1µl cada una) fueron removidas para el análisis de los productos de síntesis de ADNc. Los híbridos ADNc:ARNm fueron usados como molde para la síntesis de la segunda cadena, la cual fue realizada en un volumen final de 100 µl. Esta reacción contenía 18 µl de los productos de la primera cadena, 37.5 µl del buffer de reacción de la segunda hebra, 50 µCi de [α-^{32}P] dCTP (3.000 Ci/mmol), 0.8U de ribonucleasa H de *E. coli*, 23U de ADN polimerasa I de *E. coli* y llevados a volumen final con agua. Inmediatamente, la reacción se dejó proceder secuencialmente a 12°C por 60 minutos, 22°C por 60 minutos y 70°C por 10 minutos. Luego, 10U de T_4 ADN polimerasa fue adicionada y el tubo incubado a 37°C por 30 minutos. La reacción fue detenida por la adición de 4 µl de 0.25M EDTA pH:8.0. Dos

muestras de 1 µl fueron removidas para el análisis de los productos de ADNc. El ADNc de doble cadena fue purificado por extracción con fenol/cloroformo y precipitación con etanol con un volumen igual de 4M acetato amonio. Finalmente, el pellet fue disuelto en 10 µl de buffer TE y almacenado a -20°C.

3.6.3) Análisis de la síntesis de los productos de ADNc

La síntesis de los productos de ADNc fue seguida por marcado con [α-^{32}P] dCTP, donde la primera cadena fue marcada a una menor actividad específica que la segunda cadena. El producto de la reacción de síntesis fue calculado por la radioactividad incorporada en los ácidos nucleicos. Las dos muestras se removieron al final de los pasos de cada reacción de síntesis y se precipitaron con TCA (Sambrook y col.,1989). El porcentaje de incorporación se calculó considerando la radioactividad total obtenida en 2 µl de muestra.

3.6.4) Clonado de los ADNc en el vector de expresión λgt11

El clonado de los ADNc fue llevado a cabo usando el kit comercial "cDNA cloning system λgt11" (Amersham) y los protocolos proporcionados por los fabricantes, con ligeras modificaciones. Los ADNc fueron clonados en el vector λgt11/EcoRI/CIP.

3.6.4.1) Ligación de los adaptadores Eco RI a los ADNc

La ligación de los adaptadores Eco RI a los ADNc con extremos romos fue llevado a cabo usando un exceso de adaptadores Eco RI no fosforilados en una reacción de 20 µl. Aproximadamente, 400 ng de ADNc en 10 µl de buffer TE, 2 µl de L/K buffer, 2.5 µl de adaptadores Eco RI y 5U T_4 ADN ligasa fueron incubados a 12°C por 20 horas. La reacción fue detenida por la adición de 2 µl de 0.25M EDTA.

3.6.4.2) Purificación por columna/fraccionamiento de los ADNc-adaptadores

Los ADNc conteniendo el adaptador Eco RI fueron purificados de los adaptadores libres y fraccionados por tamaño mediante filtración en gel a través de una columna de Sefarosa CL-4B (Pharmacia) de 10 ml de volumen. Los 20 µl de muestra conteniendo los ADNc-adaptadores y los adaptadores libres fueron colocados sobre la columna. Fracciones de 100 µl fueron colectadas y analizadas por medición de cuentas Cerenkov en un Contador de Centelleo. Las fracciones con las más altas cpm fueron mezcladas.

3.6.4.3) Ligación de los ADNc-adaptadores a los brazos del vector λgt11

Novecientos µl de la mezcla de ADNc seleccionados fueron fosforilados usando 100 µl L/K buffer y 80U de T_4 Polinucleótido Kinasa e incubado a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, la mezcla de reacción fue extraída con fenol y precipitada con etanol. Los ADNc fueron resuspendidos en buffer TE (aproximadamente 100 ng/µl). Cien ng de los ADNc-adaptadores fosforilados fueron ligados con 1 µg (1 µl) de los brazos λgt11/EcoRI/CIP conteniendo 0.5 µl de 10mM ATP, 0.5 µl L/K buffer y 0.5 µl T_4 ADN ligasa (2.5U) en un volumen total de 5 µl. La reacción fue colocada en un baño de agua a 12°C por 16 horas.

3.6.4.4) Empaquetamiento *in vitro* de los fagos

El empaquetamiento fue llevado a cabo usando un kit comercial (Gigapack, Stratagene), el cual contenía dos extractos, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. Los productos de cada ligación fueron empacados independientemente y diluidos en 500 µl con buffer SM (100mM NaCl; 8mM $MgSO_4$; 50mM Tris-HCl pH:7.5; 0.01% gelatina) y 20 µl cloroformo fue adicionado. Los fagos fueron mantenidos a 4°C por largos períodos de tiempo.

.3.6.5) Análisis de los fagos recombinantes

3.6.5.1) Crecimiento y preparación de bacterias competentes para plaquear fagos:

Las bacterias fueron crecidas a partir de una colonia *E. coli* Y1090, en medio LB conteniendo 50 μg/ml de ampicilina y 0.4% de maltosa. Las células fueron incubadas a 37°C hasta alcanzar una DO_{600} de 0.5. Las células fueron cosechadas y resuspendidas en 15 ml de 10mM $MgSO_4$ frío y estéril. Preferentemente, las células competentes para plaqueo de fagos fueron usadas frescas. Estas fueron almacenadas a 4°C por menos de una semana.

3.6.5.2) Plaqueo de fagos:

Para plaquear una suspensión de fagos en placas de agar LB de 90 mm, 100 μl de células competentes fueron mezcladas con la dilución apropiada de fagos en un tubo de 5 ml e incubadas a 37°C por 30 minutos. Luego, 3 ml de agar blando fundido y mantenido a 50°C fue vertido sobre la suspensión de bacterias-fagos, mezclado y vertido sobre una placa de agar pre-calentada a 42°C. La placa fue dejada sobre una superficie nivelada antes de ser colocada en el incubador. Al cabo de 3 horas de incubar la placa sembrada, a 42°C se comenzaron a visualizar pequeñas placas de lisis. A partir de este momento se puede inducir la expresión de las proteínas de fusión con IPTG y transferirlas a filtros de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England) para visualizar la reactividad de las proteínas de fusión con los sueros. El plaqueo para el rastreo inmunológico y amplificación de la biblioteca de ADNc fue similar, pero utilizando placas de 150 mm, 250 μl de células competentes de plaqueo de fagos y 6.5 ml de agar blando.

3.6.5.3) Titulación de los fagos recombinantes:

Los stocks del fago λ de la biblioteca fueron titulados por plaqueo de diferentes diluciones sobre células competentes. El título de las unidades formadoras de placa (ufp) por ml fue calculado multiplicando el número total de placas de lisis por la

dilución. Diluciones de la biblioteca se plaquearon para determinar la proporción de fagos recombinantes (blancos) y fagos no recombinantes (azules) por selección de color, en la presencia de IPTG y X-Gal. Para placas de agar LB de 90 mm preparadas como se describió previamente se adicionó 30 µl de 100mM IPTG y 30 µl de 2% X-Gal.

.3.6.5.4) Amplificación de ADN por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Los estudios de PCR fueron llevados a cabo de acuerdo a Saiki y col., (1988) a partir de ADN (20 ng) o placas de lisis de bacteriófagos. El ADN para la amplificación de recombinantes λgt11 fue realizada de tacos de agarosa conteniendo las placas de fagos aislados. Estas placas fueron eluidas en 0.2 ml de buffer. SM por 30 minutos a 4°C, centrifugadas por 5 minutos y 5 µl del sobrenadante cuidadosamente removidos y usados para la amplificación de PCR. El buffer de reacción 10X fue preparado con 100 mM Tris-HCl, pH:8.4; 15 mM $MgCl_2$; 500 mM KCl, 1 mg/ml gelatina, alicuotado y almacenado a - 20°C. Los primers "forward" y "reverse" se aparean a los extremos 5'y 3' del sitio de clonado EcoRI en λgt11 se usaron, siendo su secuencia la siguiente:

λgt11 forward: 5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG-3'
λgt11 reverse: 5'-TTGACACCAGACCAACTGGTAATG-3'

La reacción de amplificación fue realizada en 100 µl de reacción conteniendo 10 µl de buffer de reacción 10X, 2 µl 10 mM dATP, 2 µl 10 mM dCTP, 2 µl 10 mM dGTP, 2 µl 10 mM dTTP, 10 µl de una solución 10 µM de cada cebador, 50 µl ADN o fago eluido y 10 µl de agua. Las muestras fueron cubiertas con 100 µl de aceite mineral. Las muestras fueron inicialmente denaturadas a 95°C por 30 segundos, después de lo cual 2U Taq ADN polimerasa (Promega) fueron adicionadas. Las etapas de apareamiento inicial fue realizado a 65°C por 1 minuto y las etapas de apareamiento subsiguientes fueron a 60°C por 1 minuto y las etapas de elongación fueron a 70°C por 1 minuto. El tiempo de elongación fue incrementándose un 3% después de cada ciclo. Los ciclos (30) se llevaron a cabo utilizando una Cambio Intelligent heating block (Genesis Instruments, Cambridge, UK). Después del último ciclo, todas las muestras fueron llevadas a una

extensión final de 70°C por 10 minutos. Diez µl de los productos de amplificación fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa (1.4%).

3.6.5.5) Amplificación de la biblioteca de ADNc:

La amplificación de la biblioteca de ADNc fue llevada a cabo por plaqueo de la biblioteca sobre células Y1090 a alta densidad (8.000 recombinantes por caja de agar LB de 15 mm). Luego de la aparición de las placas de lisis, las placas fueron removidas de 42°C y colocadas a 4°C. Luego, 10 ml de buffer SM fue agregado por placa y dejado por toda la noche con agitación suave. Al día siguiente, la suspensión de fagos fue colectada, centrifugada y al sobrenadante se le agregó 5% de cloroformo. La biblioteca amplificada fue titulada como se mencionó anteriormente. El título obtenido de cada biblioteca fue de $1x10^9$ a $1x10^{10}$ ufp/ml. Las bibliotecas de ADNc amplificadas fueron alicuotadas y parte de ellas criopreservada con DMSO de acuerdo a Sambrook y col., (1989). El resto de la biblioteca fue mantenida a 4°C.

3.6.6) Preparación en gran escala de ADN de fagos λgt11:

Tres x 10^6 ufp del fago recombinante de interés y 3 ml de un cultivo de toda la noche de células Y1090 (crecidos en LB-50 µg/ml de ampicilina) resuspendidos en 10mM $MgSO_4$ fueron adicionados a 100 ml de medio LB suplementado con 150 µl 1M $MgSO_4$ y dejado crecer por toda la noche. Al día siguiente, el cultivo fue centrifugado a 7.000 rpm por 10 minutos, 80 ml del sobrenadante fue tomado y suplementado con 200 µl de ARNasa de un stock de 10 mg/ml, 80 µl de ADNasa de un stock de 10 mg/ml y se dejó incubando por 1 hora a 37°C (la adición de ADNasa fue para remover el ADN bacteriano, el ADN del fago recombinante está protegido de la digestión por la presencia de su cápside). Subsecuentemente, 4 ml de 20% PEG-8.000/2.5M NaCl fue agregado por cada 25 ml de sobrenadante y colocado a 4°C por 2 horas. La mezcla fue centrifugada por 40 minutos a 18.000 rpm y el pellet resuspendido en 2 ml de buffer TE al que se le adicionó 80 µl de EDTA y dejado 10 minutos a temperatura ambiente.

Luego la mezcla fue extraída con fenol:cloroformo, precipitada con 0.3M acetato sodio pH 6.0 y 2.5 volúmenes de etanol absoluto frío. El ADN fue resuspendido en buffer TE y almacenado a -20°C.

3.6.7) Rastreo inmunológico de la biblioteca de ADNc

3.6.7.1) Método de rastreo:

La biblioteca de ADNc amplificada fue rastreada según Huynh y col. (1985) con anticuerpos inmunopurificados a partir de sueros de pacientes con Leishmaniasis. Brevemente, $3x10^4$ ufp fueron mezcladas con células *E. coli* Y1090 competentes y plaqueadas como antes se mencionó. Las placas fueron incubadas a 42°C hasta la aparición de pequeñas placas de lisis (λgt11 contiene un gen represor termosensible, cI^{857}, cuyo producto es inactivo a 42°C). Luego, se colocó sobre el agar un filtro de nitrocelulosa seco (Millipore) previamente embebido en 10mM IPTG y se incubó a 37°C por 4 horas. Antes de remover los filtros, éstos fueron marcados con agujas para su posterior orientación, lavados con TBS-Tw (TBS conteniendo 0.05% de Tween-20) e incubados por 1 hora o toda la noche con la solución bloqueadora (ver Western blot). Las placas fueron mantenidas a 4°C. Luego, los filtros fueron lavados con TBS-Tw e incubados con el primer anticuerpo (anticuerpos inmunopurificados como se indica más adelante) por 3 horas con agitación a temperatura ambiente o por toda la noche a 4°C. Los filtros fueron lavados 3 veces por 5 min. con TBS-Tw. Se continuó como se describió para Western blot.

3.6.7.2) Inmunopurificación de anticuerpos contra proteínas recombinantes:

Los anticuerpos contra las proteínas de fusión utilizadas para el rastreo fueron inmunopurificados a partir de sueros de pacientes siguiendo el método descrito por Hall y col (1984). Las proteínas se inmovilizaron sobre nitrocelulosa incubando un filtro de Hybond C (Amersham) de 5 cm^2 con 3ml de proteína de fusión purificada β-galactosidasa/Lbb1 (gentilmente cedida por la Dra. Patricia Levy-Yeyati) durante 2 h a temperatura ambiente. Se lavó 10 min. con TBS para eliminar el exceso de proteína,

se bloqueó (ver Western blot) durante 20 min. y se incubó durante toda la noche a 4°C con 5ml del suero de un paciente con Leishmaniasis mucocutánea diluido 1:10 en solución de bloqueo y conteniendo 30% de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para λgt11 salvaje (ver más adelante). Se lavó 3 veces por 10 min. con TBS-Tw y 2 veces con 0,15M NaCl-0,05% Tween 20. La elución se llevó a cabo incubando el filtro durante 30 min. con 5ml de 0,2M glicina, 0,15M NaCl, 10ug/ml BSA, 1mM PMSF, 0,05% Tween, pH: 2.8. El material eluido se pasó a un tubo y, manteniéndolo en hielo, se neutralizó con 5ml de 1M Tris-HCl pH: 8.0 y 2ml de solución de bloqueo. Esta preparación se alicuotó y se guardó a -20°C.

3.6.7.3) Preparación de lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para λgt11 salvaje:

El lisado de *E. coli* Y1089 lisógena para λgt11 salvaje utilizado para competir la reactividad inespecífica de los sueros, se preparó a partir de 1l de cultivo. Brevemente, un cultivo de 3ml saturado se diluyó en 1l de medio LB-ampicilina y se dejó crecer hasta una DO_{600}=0.4. La inducción de la replicación del fago se produjo incubando a 42°C durante 30min. Luego se agregó IPTG (5mM final) y se incubó a 37°C por dos horas más para la expresión de la proteína recombinante. Las bacterias se centrifugaron a 1500g por 10min a temperatura ambiente, se resuspendieron en 50ml de TBS y se lisaron por tres ciclos de congelamiento y descongelamiento. El homogenato final se guardó a -20°C.

3.6.8) Rastreo de la biblioteca con sondas marcadas radioactivamente:

Del mismo modo descrito para el rastreo inmunológico, se plaquearon 3-5x10^4 ufp por placa de 15 cm. de diámetro. Se dejaron crecer 6 horas o toda la noche a 37°C, luego se colocaron a 4°C durante 1 hora antes de comenzar la transferencia. Para la transferencia, se utilizaron filtros de Nylon Hybond N^+ previamente rotulados y por duplicado. Se apoyó suavemente el filtro sobre la placa durante 1 minuto, mientras se marcó con tinta china y un alfiler atravesando el filtro y el agar. El filtro duplicado se transfirió 2 minutos y se lo marcó del mismo modo y en la misma posición que el original. Luego de la transferencia se embebieron los filtros en la solución denaturalizante (0.5M NaOH/ 1.5M NaCl) a temperatura ambiente durante 1 minuto.

Los filtros se trataron con la solución neutralizante (0.5M Tris-HCl, pH:8/ 1.5M NaCl) en las mismas condiciones 2 veces durante 3 minutos y luego se lavaron con agitación suave en 2X SSC. Los filtros se secaron a temperatura ambiente sobre papel Whatman y luego se fijó el ADN por exposición durante 5 minutos a luz ultravioleta. Los filtros así tratados se hibridizaron con sondas radioactivas como se indica en la sección de hibridización de Southern-blots.

3.6.9) Aislamiento de los clones recombinantes positivos de λgt11:

Los filtros de nitrocelulosa conteniendo las señales positivas fueron alineadas con las cajas originales y un trozo de agar conteniendo el fago de interés extraído con Tip P-1.000 estéril previamente cortado en la punta y colocado en un tubo Eppendorf conteniendo 500 µl de buffer SM al que se le añadió 20 µl de cloroformo. Estos fagos fueron plaqueados a baja densidad y rastreados nuevamente para confirmar su identidad. Este procedimiento fue repetido al menos 3 veces hasta obtener un clon positivo aislado. Los fagos positivos fueron mantenidos a 4°C. Las placas de lisis picadas de una placa fresca daban stocks de 10^6 a 10^7 ufp/ml.

3.6.10) Ensayo de placa de lisis:

Para la formación del césped bacteriano, se mezclaron 0.5 ml de células de plaqueo de fagos con 3 ml agar blando (previamente fundido y mantenido a 50°C), se sembraron sobre una placa de agar LB-ampicilina y se dejaron crecer a 37°C por 30 minutos. Luego se depositaron 1 µl de cada preparación de fagos amplificados (aproximadamente 10^{10} ufp/ml). Se dejó secar por 10 minutos junto al mechero y luego la placa se incubó a 42°C por 40 minutos (al final de esta etapa podía observarse el comienzo de la lisis bacteriana). Por otro lado, se recortaron tiras de nitrocelulosa (Hybond-C, Amersham, Buckinghamshire, England) que se sumergieron en una solución 10mM IPTG y se dejaron secar sobre papel filtro. Las tiras de filtro así preparadas se apoyaron sobre los fagos sembrados y se incubó la placa a 37°C por 2 horas (durante esta etapa se produce la inducción de la expresión de la proteína de fusión, que junto con las proteínas bacterianas y del fago quedan inmovilizadas sobre

el filtro). Luego, se retiraron las tiras de nitrocelulosa y se colocaron directamente en la solución de bloqueo y se continuó como se describió para el rastreo inmunológico.
En este ensayo se usaron los fagos recombinantes Lbb1 (porción C-terminal de la hsp70 de *L.(V.) braziliensis*, RA1 (porción C-terminal de la hsp70 de *T. cruzi*), JL7 (proteína flagelar de *T. cruzi*, recombinante diagnóstico de la Enf. de Chagas), JL5 (antígeno marcador de cardiopatía chagásica).

3.7) Producción de proteínas de fusión

3.7.1) Subclonado de ADNc en pGEX1λT:

Los insertos de los fagos recombinantes U4 y Lbb1 fueron subclonados en el vector de expresión pGEX1λT (Pharmacia Inc). Este vector permite la expresión de proteínas foráneas fusionadas con la enzima Glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*. Además de poseer un promotor muy fuerte como el promotor ptac, posee el gen lac I^q, que codifica para el super-represor del operon lac y permite la inducción de la síntesis de la proteína de fusión por un análogo sintético de la lactosa como el IPTG. El sitio de clonado permite la inserción de fragmentos de ADNc provenientes de bibliotecas de expresión en λgt11 o λZAP II.
Otra ventaja que presenta este vector es la existencia de reconocimiento de corte de la enzima trombina, lo que permitiría clivar la proteína de fusión y obtener así la proteína de interés en forma pura.
Para obtener el inserto de fagos recombinantes, éstos se crecieron en cultivo líquido, previa infección de las bacterias *E. coli* Y1090 competentes en cultivos de 500 ml de medio LB. Luego, se indujo la fase lítica por incubación a 42°C por 6 horas. Posteriormente, los fagos fueron precipitados con 20% PEG 6.000/2.5 M NaCl, incubados 1 hora sobre hielo y centrifugados a 14.000 Xg por 20 minutos. Se retiró todo el líquido conteniendo el PEG y el pellet fue resuspendido en 6 ml de buffer TNE (10mM Tris-HCl, 100mM NaCl, 1mM EDTÁ pH: 8.0). Paralelamente, se equilibró en buffer TNE una columna de 6 ml de DEAE-celulosa (DE-52, Whatman). Los fagos resuspendidos fueron cargados en la columna de DE-52, descartándose el volumen muerto. Se colectaron las fracciones siguientes y se precipitaron con un volumen de isopropanol frío. Luego de centrifugar a 14.000 x g por 20 min., el pellet de fagos fue

resuspendido en 0.5 ml de buffer TE. Se realizaron dos extracciones con fenol, dos con cloroformo y se precipitaron con 50 µl 3M NaCl y 1.25 ml de etanol absoluto frío. Se incubó por 20 minutos a -70°C y luego se centrifugó a 13.000 Xg por 20 minutos. El pellet de ADN del fago recombinante fue lavado dos veces con 1 ml de etanol 70% y secado al vacío. El pellet seco fue resuspendido en 50 µl de buffer TE y una alícuota corrida en geles 0.7% de agarosa para posterior análisis. Para liberar el inserto de ADNc contenido en el fago recombinante, se digirió con Eco RI:

Buffer de restricción React 3 (BRL)	5 µl
Agua destilada	20 µl
ADN fago recombinante (1 µg/µl)	20 µl
Eco RI (BRL, 20 U/µl)	5 µl

Se incubó la reacción a 37°C por unas 2 horas. Se verificó la digestión completa al correr una alícuota de la restricción en un gel nativo de 0.4% de agarosa. Debido a que la proporción de masa del vector al inserto era muy grande, por lo que se necesitaba una cantidad muy grande de ADN digerido para ver el tamaño del inserto, la verificación indirecta de corte completo fue la visualización de los dos brazos del vector. Una vez verificada la digestión total, se precipitó el ADN y se resuspendió en 20 µl de buffer TE. A su vez se estimó la concentración de ADN en 20 ng/µl.

Paso seguido se procedió a ligar los insertos de los fagos recombinantes en el vector de expresión pGEX1λT como se describe a continuación:

	Autolig. (µl)	**Lig.1:1** (µl)	**Lig.1:3** (µl)	**Lig.1:5** (µl)
Buffer ADN ligasa 10X (BRL)	1	1	1	1
pGEX1λT/Eco RI/CIP (20 ng/µl)	1	1	1	1
ATP (10 mM)	1	1	1	1
Agua destilada	6	5	3	1
Inserto (20 ng/µl)	-	1	3	5
T_4 ADN ligasa (BRL, 10 U/µl)	1	1	1	1

Se incubaron las ligaciones a 16°C por toda la noche.

3.7.2) Preparación de células competentes y transformación:

Todas las soluciones, tubos, pipetas y el rotor fueron enfriados a 4°C antes de usarlos. Para la preparación de las células DH5αF' competentes, 100 ml de bacterias fueron crecidas a 37°C en un incubador con agitación orbital a una densidad de aproximadamente 0.6 OD_{550}. Las células fueron centrifugadas a 5.000 rpm por 10 minutos a 2°C y el pellet fue resuspendido en 0.25 vol. de 0.1M $MgCl_2$ y subsecuentemente centrifugado como antes. El pellet fue suavemente resuspendido ahora en 0.05 vol. de 0.1M $CaCl_2$ y colocado en hielo por 45 minutos. Las células fueron centrifugadas bajo las mismas condiciones usadas previamente. Finalmente, las células fueron cuidadosamente resuspendidas en 0.05 vol. de solución de almacenamiento (0.1M MOPS pH:6.5; 50mM $CaCl_2$; 20% glicerol) e incubadas en hielo por 20 minutos antes de ser alicuotados en tubos Eppendorf. Inmediatamente, la suspensión de células fue congelada en un baño de etanol/hielo seco y almacenada a -70°C hasta su uso.

La reacción de ligación fue colocada en un baño de agua a 65°C por 10 minutos y la mitad del volumen de la reacción inicial (5 µl) diluido 5 veces con buffer TE.

El resto de la mezcla de ligación fue mantenida a -20°C. La mezcla de ligación diluida fue mezclada suavemente con 150 µl de células competentes incubada en hielo por 30 minutos. Inmediatamente se realizó un shock térmico a 42°C por 1 minuto y posteriormente se agregaron 500 µl de medio LB y se incubó a 37°C por 45 minutos. Alícuotas de 50, 100 y 150 µl fueron plaqueadas en cajas de agar LB suplementadas con 50 µl de 0.1M IPTG, 50 µl de 125 mg/ml X-gal y 50 µg/ml ampicilina. Las cajas fueron incubadas a 37°C por toda la noche. De ambas placas se tomaron 5 colonias blancas y 1 azul y se realizaron minipreparaciones para extraer plásmidos y se dejaron crecer en LB-ampicilina (50 µg/ml) por toda la noche. Al día siguiente se extrajeron plásmidos por el método de lisis alcalina (Birmboin y Doly, 1979) y se corrieron en un gel de 0.7% agarosa con marcadores de peso molecular. Para verificar que estas colonias blancas contenían el inserto deseado se realizó una restricción con la enzima Eco RI y el producto de las restricciones se corrieron en geles de 0.7% de agarosa usando como control el plásmido aislado de la colonia azul cortado con Eco RI.

Como el clonado era bi-direccional había que determinar luego cuál de las colonias recombinantes tenía el inserto subclonado en fase con la Glutatión-S-transferasa (GST) de *Schistosoma japonicum*. Para lo cual se crecieron las colonias recombinantes en LB-ampicilina por 2 horas a 37°C con agitación vigorosa. Luego se le adicionó IPTG a 0.1 mM final y se continuó la incubación por 4-6 horas adicionales. Luego se cosecharon las células por centrifugación a 13.000 Xg por 1 minuto. El pellet celular se resuspendió en 0.3 ml de PBS conteniendo 0.1 mM final de PMSF y 1% Tritón X-100 y se rompieron las células por 15 ciclos de congelamiento/descongelamiento. Luego se centrifugó la muestra y se colectó el sobrenadante, al que se le adicionó 50 µl de 50% Glutatión-agarosa (Sigma) equilibrado en PBS y se incubó a temperatura ambiente por unos 20 minutos con agitación suave. La matriz fue colectada por centrifugación a 1.000 rpm por 10 minutos y lavada por 3 veces con 1 ml de PBS/0.1% Tritón X-100. Luego del último lavado, todo el líquido fue retirado con una pipeta Pasteur con punta afilada y al pellet se le agregaron 25 µl de tampón de siembra 2X (0,02% azul de bromofenol, 4% SDS, 10% β-mercaptoetanol, 20% glicerol en TBS). Las muestras así tratadas se colocaron en un baño hirviendo por 3 minutos, se centrifugaron por 1 minuto y el sobrenadante se sembró en un gel 12% SDS-PAGE. Los productos se analizaron por tinción con Azul de Coomasie y Western blot.

3.7.3) Producción en gran escala de la proteína de fusión:

A partir de 100 ml de cultivo saturado, se preparó 1 litro de cultivo, el cual se dejó crecer por 2 horas más a 37°C con agitación vigorosa. Luego se le agregó IPTG al 0.1 mM final y se continuó con la agitación por 6 horas adicionales. Paso seguido, se cosecharon las bacterias por centrifugación a 3.000 rpm por 10 minutos en una centrífuga refrigerada Sorvall en un rotor GSA. El pellet fue resuspendido en 5 ml de PBS, conteniendo 1% Tritón X-100, 0.1 mM PMSF y sometido a 20 ciclos de congelamiento/descongelamiento. El homogenato bacteriano fue centrifugado a 13.000 rpm por 10 minutos en un rotor SS-34 a 4°C. El sobrenadante fue colectado y colocado sobre una columna de 1 ml de Glutatión-agarosa (Sigma, St. Louis, MO). El efluente se pasó 3 veces por la columna de afinidad. Luego, la columna se lavó con 20-50 volúmenes de PBS/0.1% Tritón X-100.

La proteína de fusión fue eluida al pasar 3 volúmenes de 5 mM glutatión reducido (Sigma, St. Louis, MO) en PBS. Se colectaron fracciones de 0.5 ml cada una, las que luego se analizaron por Western blot.

3.8) Secuenciamiento de los clones recombinantes

3.8.1) Subclonado en los vectores M13mp18 y pGEM3zf(+):

Las ligaciones del ADNc al vector M13mp18/EcoRI/BAP se realizó como se describió para el subclonado en vector de expresión pGEX1λT. Para el caso de transformación de células competentes con ligaciones de M13mp18 RF, se tomó 0.2 ml de bacterias competentes en frío, al cual se le agregó 5 µl de la reacción de ligación y se incubó sobre hielo por 1 h. Luego, se realizó un shock térmico de 2 minutos a 42°C y se le agregaron 0.2 ml de un cultivo saturado de células DH5αF', 35 µl de 2% X-Gal, 20 µl de 100mM IPTG. Se mezcló con 3 ml de agar blando fundido y mantenido a 48°C y se volcó suavemente sobre una placa de 9 cm de diámetro de agar duro y se incubó toda la noche a 37°C. Se identificaron las placas de retardo de crecimiento bacteriano y se extrajo el ADN simple cadena como se indica más adelante para su posterior secuenciamiento manual o automático. Para el subclonado del ADNc U4 en pGEM3zf(+), el inserto U4 fue liberado del plásmido de expresión pGEX1λT mediante el corte con la enzima Eco RI (1.600 pb) y luego la región codificante (550 pb) separada de la 3' no codificante (1.050 pb) por corte con la enzima Sal I. Ambos fragmentos fueron purificados de geles preparativos NuSieve como se describe en 2.4.4 y ligados al vector pGEM3z(+)/Eco RI/Sal I. Se identificaron las colonias que habían incorporado los plásmidos recombinantes por digestión doble con Eco RI/Sal I. Las bacterias recombinantes fueron crecidas y procesadas como se indica en 2.8.2.1.2 para su secuenciamiento automático usando primers marcados con colorantes fluorescentes.

3.8.2) Preparación del ADN para secuenciación:

3.8.2.1) Preparación del ADN del fago M13

Se inoculó 10 ml de medio 2X YT con una colonia de *E. coli* crecida en agar mínimo glucosa y se dejó crecer con agitación durante toda la noche a 37°C. Este cultivo se diluyó 1:100 en medio 2X YT y se agregó el trozo de agar conteniendo la placa de retardo de interés. Se dejó crecer a 37°C por 6-7 horas con agitación. El cultivo se centrifugó a 2.500 rpm por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo estéril y se volvió a centrifugar a 5.000 rpm por 10 min. Al sobrenadante se agregó 1 ml de 20% PEG 6.000/2,5M NaCl, se mezcló bien y se incubó a 4°C por 30 min. Luego de centrifugar a 10.000 rpm por 10 min., las partículas de M13 se resuspendieron en 400 µl de TE. El ADN simple cadena se aisló por 2 extracciones con fenol saturado con Tris-HCl pH 8.0 seguidas de dos extracciones con cloroformo. El ADN se precipitó con 40 µl acetato sodio, pH: 5,2 y 1 ml 95% etanol. Luego de 20 min. a -70°C se centrifugó por 15 min. a 13.000rpm. Se aspiró el sobrenadante, se lavó el pellet con 70% etanol y se lo secó al vacío. El ADN se disolvió finalmente en 20 µl de TE y se cuantificó por electroforesis en geles de agarosa o espectrofotometría.

3.8.2.2) Preparación de plásmidos:

Las bacterias transformadas se crecieron a saturación en LB-ampicilina. Una alícuota de 1,5 ml se centrifugó por 1 min. a 13.000g y el pellet bacteriano se resuspendió en 200 µl de solución GTE (50 mM glucosa; 25 mM Tris-HCl, pH: 8,0; 10 mM EDTA, pH: 8,0). Se agregaron 300 µl de 0,2N NaOH/1% SDS, se mezcló por inversión e incubó en hielo por 5 min. Se neutralizó agregando 300 µl de 3M acetato potasio, pH: 4,8, se mezcló por inversión e incubar en hielo por 5 min. Los restos celulares se removieron por centrifugación por 10 min. a temperatura ambiente y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio. Se agregó ARNasa A (libre de ADNasa) a una concentración final de 20 µg/ml y se incubó a 37°C por 20 min. Se realizaron dos extracciones con 400 µl cloroformo/alcohol isoamílico. El ADN se precipitó agregando un volumen de isopropanol y centrifugando por 10 min. a temperatura ambiente.

El pellet se lavó con 0,5 ml de 70% etanol, se secó al vacío y se resuspendió en 32 µl agua desionizada. Se volvió a precipitar agregando 8 µl de 4M NaCl y 40 µl 13% PEG 8.000 y dejando en hielo por 20 min. Se centrifugó por 15 min. a 4°C a 1..000g. Luego de remover cuidadosamente el sobrenadante, el pellet se lavó con 0,5 ml de 70% etanol, se secó al vacío y se resuspendió en 20 µl de agua desionizada.

3.8.3) Secuenciación manual:

La secuenciación de ácidos nucleicos se llevó a cabo por el método de terminación de la cadena con dideoxinucleótidos (Sanger, 1977). Para ello se utilizó el kit de secuenciación Sequenasa 2.0™ (USB Corp.) y el primer universal de M13mp18 provisto por el mismo kit. Se siguieron las instrucciones indicadas por los fabricantes con 1µg (5 µl) de ADN simple cadena de los fagos recombinantes. Por cada reacción de secuencia se utilizaron 5 µCi [α-^{35}S] dATP (1,250 Ci/mmol). Se corrieron geles de poliacrilamida de 6-8% dependiendo de la zona a resolver y 7M urea. Se usaron las siguientes soluciones:

Buffer Sequenase 5X :	200mM Tris-HCl, pH:7.5
	100mM $MgCl_2$
	250mM NaCl
Mezcla de marcado (dGTP) 5X :	7.5µM dGTP
	7.5µM dCTP
	7.5µM dTTP

Mezcla de terminación ddG (dGTP) : 80µM dGTP, 80µM dATP, 80µM dCTP, 8OµM,dTTP, 8µM ddGTP, 50mM NaCl.
Mezcla de terminación ddA (dGTP) : 80µM dGTP, 80µM dATP, 80µM dCTP, 8OµM dTTP, 8µM ddATP, 50mM NaCl.

Mezcla de terminación ddT (dGTP) : 80μM dGTP, 8OμM dATP, 80μM dCTP, 80μM dTTP, 8μM ddTTP, 50mM NaCl.
Mezcla de terminación ddC (dGTP) : 80μM dGTP, 80μM dATP, 80μM dCTP, 80μM dTTP, 8μM ddCTP, 50mM NaCl.

Buffer de dilución de enzima : 10.0 mM Tris-HCl pH 7.5
5.0 mM DTT
0.5 mg/ml BSA.

Buffer Mn : 0.15 M Isocitrato de sodio
0.10 M $MnCl_2$.

Solución de parado : 95% Formamida
20 mM EDTA
0.05% azul de bromofenol
0.05% xileno cianol

Se utilizó generalmente 500ng de ADN simple cadena (el volumen de la solución de ADNsc no debe exceder los 7 μl).

A) Mezcla de "annealing":

ADN	7 μl
Buffer sequenasa	2 μl
Primer	1 μl
Total	10 μl

Se calentó a 65°C 2 minutos en un baño seco y se dejó enfriar lentamente hasta alcanzar una temperatura menor a 35°C. Luego se colocó en hielo. Mientras se enfriaba la reacción se prepararon 4 tubos conteniendo 2.5 μl cada uno la mezcla de terminación (ddA, ddC, ddG, ddT).

B) Reacción de marcación:

A la mezcla de "annealing" se agregaron:

DTT 0.1 M	1 µl
mezcla de marcación (l:5)	2 µl
[α-^{35}S] dATP	0.5 µl
Sequenasa 2.0 (l:8)	2 µl

Se mezcló e incubó a temperatura ambiente durante 3 min.

C) Reacción de terminación:

Se transfirieron 3.5 µl de la reacción de marcado a cada tubo de terminación (ddA, ddC, ddG, ddT) y se continuó la incubación a 37°C por 5 minutos. La reacción se paró por agregado de 4 µl de solución de parado a cada uno de los tubos. Las muestras se calentaron a 75°C por 2 minutos antes de colocarlas en el gel. Se sembraron 3 µl de reacción por calle del gel.

Los geles desnaturalizantes para secuenciación fueron de 6 % de poliacrilamida, y permitieron leer hasta 400 bases desde el inicio de la reacción.

Se preparó una solución stock de acrilamida 40% de la siguiente forma:

Acrilamida	38 g
Bisacrilamida	2 g
Agua para 100 ml	

Se disolvió la solución por calentamiento a 37°C .La solución para los geles de secuencia se armó en 100 ml en Erlenmeyer de la siguiente forma:

42 g urea (7 M final)

15 ml de acrilamida 40 % (6 % final)

TBE 1X hasta 100 ml

Luego de disolver la úrea, se agregaron 100 µl de TEMED y 280 µl persulfato de amonio 10 %.

Se utilizaron vidrios de 30x40 cm. Los vidrios se limpiaron bien y luego se impermeabilizaron con un algodón embebido en Silic-glass o Sigmacote (Sigma). Se

usaron espaciadores de 0.4 mm y se sellaron los vidrios con cinta. Luego se volcó el gel con una inclinación de 45° continuamente para no interrumpir el flujo y evitar burbujas de aire. Antes de la polimerización se colocó el peine en posición invertida en la parte superior y se dejó toda la noche a temperatura ambiente. Al otro día se montó el gel sobre la cuba en posición vertical, se colocó el peine introduciéndolo en el gel hasta pinchar la acrilamida y se agregó buffer TBE 1X en la parte superior e inferior de la cuba. Se pre-corrió el gel a 60 W durante 30 minutos antes de sembrar para que los vidrios adquirieran una temperatura homogénea. Se sembraron 3 µl de cada reacción. Como regla general, el segundo depósito se sembró 30 minutos después de salir el colorante azul de bromofenol. La corrida del gel se paró cuando salió el azul de bromofenol del segundo depósito.

El gel se desmontó de la cuba y se separó un vidrio (el gel queda adherido al otro). Se fijó durante 15 minutos en una mezcla 10% metanol /10% ácido acético y luego se lavó con abundante agua destilada. Luego se colocó sobre el gel un hoja de papel Whatman 3 MM, se cubrió con papel celofán y se secó durante 3 horas en una secadora de vacío Hoeffer modelo SE 1160. Finalmente, el gel seco se expuso con pantalla intensificadora a -70°C durante 2 días.

3.8.4) Secuenciación automática

Se usó el sistema de secuenciación modelo 373 de Applied Biosystems, que es un instrumento automático con barrido de gel. El ADN se preparó como se describe más adelante. Las reacciones de secuenciamiento se llevaron a cabo con primers marcados con colorantes fluorescentes, en lugar de la usual marca radioactiva. Los colorantes marcados pueden ser incorporados en el ADN usando primers marcados con el colorante en el extremo 5' o dideoxinucleótidos terminadores marcados con colorante en el extremo 3'. Comúnmente, se usan ADN polimerasas, como AmpliTaq® y T_7 ADN polimerasa pueden ser usados para la extensión del primer.

Los cuatro diferentes colorantes fluorescentes permiten distinguir los productos de las cuatro reacciones de secuenciamiento. Estas reacciones son combinadas y sembradas sobre un carril del gel de secuencia. Hasta 36 templados pueden ser analizados simultáneamente en un gel.

Los fragmentos de ADN marcados con el colorante son sometidos a una electroforesis en gel de acrilamida y separados de acuerdo a su tamaño. Cuando los fragmentos alcanzan un posición fija por encima de la cámara inferior de buffer, la fluorescencia de los colorantes es excitada por la luz del láser, el cual hace un barrido de atrás hacia adelante a lo largo de esta área del gel. Un tubo fotomultiplicador (PMT) detecta la luz fluorescente y lo convierte en una señal eléctrica. Estas señales son luego transmitidas a la computadora y almacenadas para su eventual procesamiento.
Durante un experimento de barrido, el modelo 373 realiza un barrido del ancho del gel 600 veces por hora. Cada barrido consiste de 4 pasadas, una vez a través de los 4 diferentes filtros coloreados. Para cada color, la señal que corresponde a la cantidad de fluorescencia son medidas en 194 canales separados a través del gel. El modelo 373 puede secuenciar 550 bases por hasta 18 muestras en 8 horas y 36 muestras en aproximadamente 17 horas.

3.9) Análisis estadísticos:

Para evaluar el valor diagnóstico de los diferentes recombinantes se utilizó el índice kappa. Para cada recombinante se calculó la sensibilidad como el número de muestras positivas por serología clásica y el ensayo en placa de lisis dividida por el número de muestras encontradas positivas por la serología clásica (sensibilidad=a/A). La especificidad fue calculada como el número de muestras negativas determinado por la serología clásica y por ensayo de placa de lisis, dividido por el número de muestras negativas determinado por la serología clásica (especificidad=b/B). La concordancia observada fue estimada como Po=a+b/T, donde T era el número total de sueros. Los verdaderos positivos obtenidos por azar fue calculado como ae=A.a/T. La concordancia esperada por azar, Pe=2(ae)+D-A/T; donde D corresponde al número total de muestras negativas. El índice kappa se calculó como K=(Po-Pe)/(1-Pe). Este índice es 0 cuando la concordancia es sólo al azar, alcanza el valor de 1 cuando hay una total concordancia y muestra valores negativos en los casos cuando la discordancia es más que meramente casual (Camargo y col., 1986; Moncayo y Luquetti, 1990).

3.10) PCR de los sueros de pacientes con la infección mixta *L.(V.) braziliensis*/*T. cruzi*

Para la detección de ADN de *Leishmania* spp. y/o *T. cruzi* de los sueros de pacientes con la infección mixta *L.(V.) braziliensis*/*T. cruzi* (50 µl) se incubaron con Proteinasa K (1mg/ml final) a 55°C por 15 min. Luego, las muestras fueron hervidas a 95°C por 20 min., se centrifugó a 10.000 rpm por 10 min. y se tomaron 5µl para la reacción de PCR. Se usó el protocolo "hot start" en las reacciones de amplificación con el uso de Ampliwax Gem (Perkin-Elmer) para separar las 2 fases (Chou y col., 1992).
La fase inferior consistía de 5µl de 10X buffer Taq ADN polimerasa; 7,2µl de una mezcla 10mM dNTP; 13,5µl 25mM $MgCl_2$ y 200 ng. de los primers específicos tanto de *Leishmania* spp. como de *T. cruzi* y 27,3µl de agua.
La fase superior consistía de 7,5µl de la muestra de ADN; 2,5µl buffer Taq ADN polimerasa; 2,5U Taq ADN polimerasa y agua hasta 25µl.

3.10.1) PCR de *Leishmania* spp.

Se usaron los primers que están dirigidos para amplificar la región conservada del ADN del kinetoplasto de los minicírculos de varias cepas de *Leishmania* spp.:

V1: 5' GGG(G/T)AGGGGCGTTCT(G/C)CGAA 3'
V2: 5' (G/C)(G/C)(G/C)(A/C)CTAT(A/T)TTACACCAACCCC 3'

3.10.1.1) Condiciones del PCR

La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador modelo 9600 Perkin-Elmer Cetus.
1 ciclo: 94°C por 5 minutos
33 ciclos: 94°C por 30 segundos
50°C por 20 segundos
72°C por 20 segundos
1 ciclo: 72°C por 10 minutos.

3.10.2) PCR de *T. cruzi*

Se usaron los primers que están dirigidos para amplificar la región variable de los minicírculos de *T. cruzi* :

oligo 121: 5' AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA 3'
oligo 122: 5' GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA 3'

3.10.2.1) Condiciones de PCR:

La reacción de PCR se llevó a cabo en un Termociclador modelo 9600 Perkin-Elmer Cetus, usando 2 ciclos a 98°C por 1 min. y 64°C por 2 min. Luego, 33 ciclos a 94°C por 1 min. y 64°C por 1 min. y finalmente un ciclo de extensión a 72°C por 10 min.

Los productos amplificados se corrieron en un gel de 2% agarosa Nu-Sieve con maracadores adecuados. Se espera un amplicón de 120 pb. en el PCR de *Leishmania* spp., mientras que en el PCR de *T. cruzi* se espera un amplicón de 330 pb.

3.11) Digitalización de las figuras

Las figuras fueron digitalizadas en un Scanner de página completa ScanMaker, Microtek, modelo E3 y armadas usando el programa de manejo de imágenes Paint Shop Pro 3,1 (JASC, inc.).
La impresión se hizo usando papel especial HP Bright White de Hewlett Packard, en una impresora Deskjet 600, Hewlett Packard.

RESULTADOS

4.1) Respuesta humoral en Leishmaniasis Cutánea Andina (LCA), Leishmaniasis Cutánea Selvática (LCS), Leishmaniasis Mucocutánea (LMC), la infección mixta *Leishmania (Viannia) braziliensis*/*Trypanosoma cruzi* (IM) y la Enfermedad de Chagas (ECh)

Para evaluar la respuesta humoral desarrollada por pacientes con LCA, LCS, LMC, IM y ECh, se llevaron a cabo experiencias de Western blot con extractos de parásitos y los sueros de cada grupo. El perfil antigénico de los extractos proteicos de *L.(V.) peruviana*, *L.(V.) braziliensis* y *T. cruzi* con sueros de pacientes con Leishmaniasis y la Enfermedad de Chagas se muestran en la Fig. 8 (los resultados que se muestran en esta figura son representativos de un gran grupo de sueros analizados por Western blot; en esta primera etapa se analizaron 9 de 23 sueros LCA, 10 de 11 sueros LCS, 38 de 45 sueros LMC, 5 de 6 sueros IM y 40 de 45 sueros ECh).

Observamos en los sueros de pacientes con LCA a dilución 1:100 una débil reacción con el extracto proteico de *L.(V.) peruviana*. Una de la bandas reconocidas con más intensidad dentro del marco de una reacción general suave, corresponde a una proteína de 70 kDa (Fig. 8A, calle 1). Los sueros de pacientes con LCS también presentan una reacción débil con el extracto proteico de *L.(V.) braziliensis*, pero reconocen intensamente una proteína de 70 kDa (Fig. 8A, calle 2). Los sueros de pacientes con LMC muestran una reacción fuerte con proteínas parasitarias en un amplio rango de pesos moleculares (Fig. 8A, calle 3). Se destaca la reacción contra una proteína de 70 kDa, como se observa para pacientes con LCA y LCS. Cabe destacar que el perfil de la calle 3 de la Fig. 8A fue obtenido con una dilución 1:500 del suero, mientras que los resultados de la calle 1 y 2 fueron obtenidos con una dilución 1:100, indicando un mayor nivel de anticuerpos contra proteínas parasitarias en LMC.

En IM existe una fuerte respuesta humoral contra las proteínas de *L.(V.) braziliensis* (Fig. 8A, calle 4), entre las cuales se destaca, notablemente, la proteína de 70 kDa. Una banda del mismo peso molecular también es reconocida en el extracto de *T. cruzi* (Fig. 8A, calle 5). Como fue demostrado anteriormente (Mesri E., Tesis doctoral, 1990; Levitus G., Tesis doctoral, 1991; Kaplan D., Tesis doctoral, 1995) los sueros chagásicos crónicos presentan niveles elevados de anticuerpos contra un amplio espectro de antígenos del extracto de *T. cruzi* (Fig. 8, calle 6).

A diferencia de lo observado con los sueros de pacientes con Leishmaniasis, la proteína de 70 kDa no es inmunodominante en la infección chagásica.

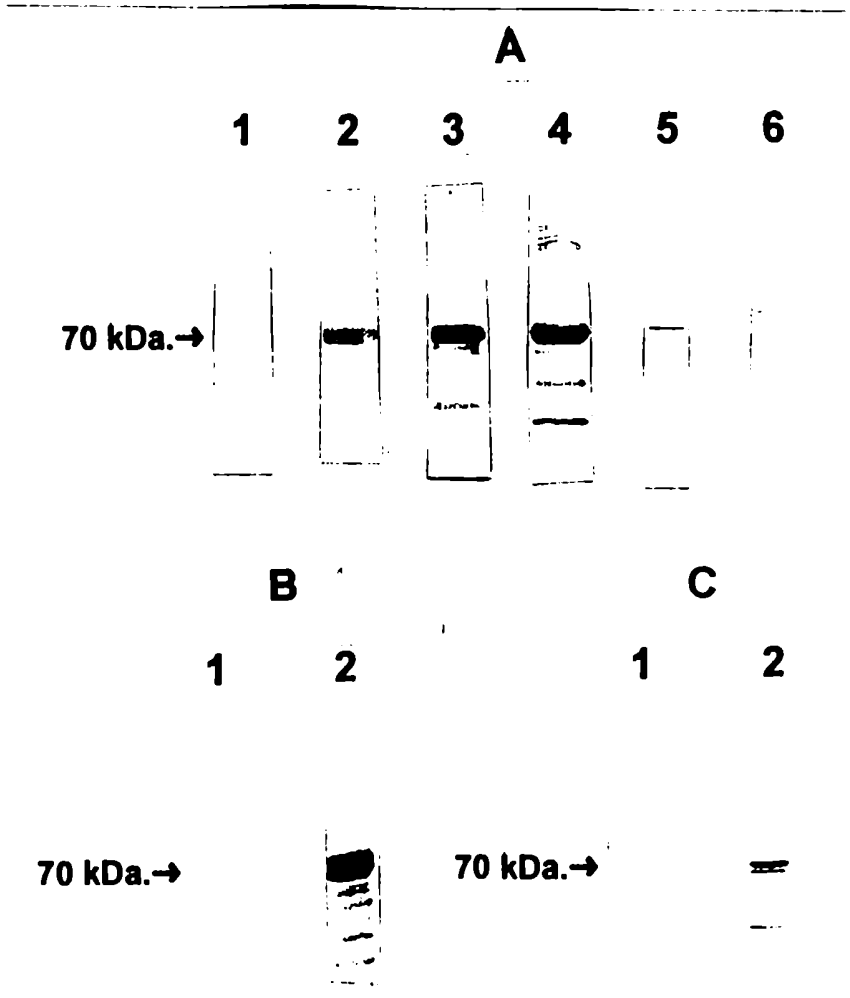


Fig. 8: Reacción de los sueros leishmánicos y chagásicos con proteínas de *L.(V.) peruviana*, *L.(V.) braziliensis* y *T. cruzi* analizadas por Western blot. Los extractos proteicos (30µg/calle) se separaron por electroforesis en geles pequeños de poliacrilamida (7,5%). (A): reacción de los sueros LCA, LCS, LMC, IM y ECh con los extractos de parásitos homólogos. Calle 1, reacción de un suero LCA (1:100) con proteínas de *L.(V.) peruviana*. Calle 2, reacción de un suero LCS (1:100) con proteínas de *L.(V.) braziliensis*. Calle 3, reacción de un suero LMC (1:500) con proteínas de *L.(V.) braziliensis*. Calle 4, reacción de un suero IM (1:500) con proteínas de *L.(V.) braziliensis*. Calle 5, reacción del mismo suero IM (1:500) con proteínas de *T. cruzi*. Calle 6, reacción de un suero chagásico (1:500) con proteínas de *T. cruzi*. (B): Reacción cruzada entre los sueros LCA y LMC con extractos de parásitos heterólogos. Calle 1, reacción de un suero LMC (1:500) con proteínas de *L.(V.) peruviana*. Calle 2, reacción de un suero LCA (1:100) con proteínas de *L.(V.) braziliensis*. (C): reacción cruzada entre sueros LMC y ECh con extractos de parásitos heterólogos. Calle 1, reacción de un suero LMC (1:500) con proteínas de *T. cruzi*. Calle 2, reacción de un suero ECh (1:500) con proteínas de *L.(V.) braziliensis*.

El perfil de los sueros de pacientes con las distintas formas clínicas de Leishmaniasis pone de manifiesto la importancia de la reacción con la proteína de 70 kDa. Dos fenómenos son evidentes: la reacción cruzada de los sueros de individuos con LCA y LMC (Fig. 8B, calle 1 y 2), y entre los sueros de individuos con ECh (Fig. 8C, calle 1) y LMC (Fig. 8C, calle 2).

A partir de lo observado, se supuso que la banda de 70 kDa podría ser la proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70). Esto se confirmó utilizando el anticuerpo monoclonal (AcM) D4F18 que reconoce las HSP70 (Blisnick y col., 1988). Se observa que este AcM reconoce la HSP70 de varias especies de *Leishmania* sp, como por ejemplo: *L.(V.) braziliensis*, *L.(V.) peruviana*, *L.(V.) panamensis*, *L.(V.) guyanensis* y *L.(L.) chagasi* (Fig. 2, calles 1, 2, 3, 4, 5 y 6). Llama la atención que el AcM en el extracto de *L.(L.) chagasi* reconoce una banda aproximadamente 68 kDa, ligeramente inferior a la HSP70 de las otras especies de *Leishmania* sp analizadas (Fig. 9, calle 5).

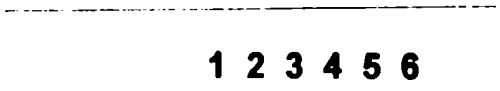


Fig. 9 Reacción del AcM D4F18 con extractos proteicos de diferentes especies de *Leishmania* sp. Los extractos proteicos (50µg/calle) se separaron por electroforesis en geles grandes de poliacrilamida (7,5%).
Calle 1 y 6: extracto de *L.(V.) braziliensis*
Calle 2: extracto de *L.(V.) peruviana*
Calle 3: extracto de *L.(V.) panamensis*
Calle 4: extracto de *L.(V.) guyanensis*
Calle 5: extracto de *L.(L.) chagasi*
La flecha indica la posición de la proteína HSP70 (70 kDa).

Se observa que la banda de 70 kDa reconocida por un suero LMC (Fig. 10, calle 1) y la banda reconocida por el AcM D4F18 (Fig. 10, calle 2) tienen movilidades semejantes.

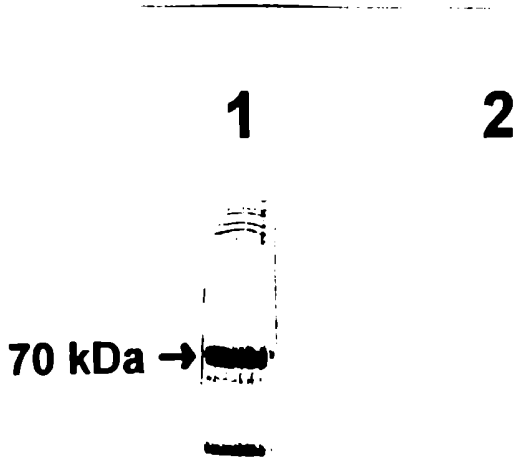


Fig. 10 Reacción del suero LMC 145 y el AcM D4F18 con la proteína de 70 kDa de *L.(V.) braziliensis* por Western blot. Los extractos de *L.(V.) braziliensis* (30µg) se corrieron en un gel 7,5% SDS-PAGE y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Se reveló con el suero LMC 145 (calle 1) o con el AcM D4F18 (calle 2).

El laboratorio disponía de un recombinante, Lbb1 (Levy-Yeyati P., Tesis doctoral, 1992) que cubre los 228 aminoácidos C-terminales de la proteína HSP70 de *L.(V.) braziliensis*. Esto permitió realizar un mapeo epitópico grueso para determinar la importancia de esta región en la inducción de la respuesta anti-HSP70 en Leishmaniasis. Así, se realizó una experiencia de competición, en la cual un suero LMC se hizo reaccionar con un extracto de *L.(V.) braziliensis* antes (Fig. 11, calle 1) y después de pre-incubarlo con el recombinante Lbb1 (Fig. 11, calle 2). La desaparición específica de la reacción con la banda de 70 kDa indica la identidad de la banda y al mismo tiempo ubica los epítopes en la región C-terminal de la proteína.

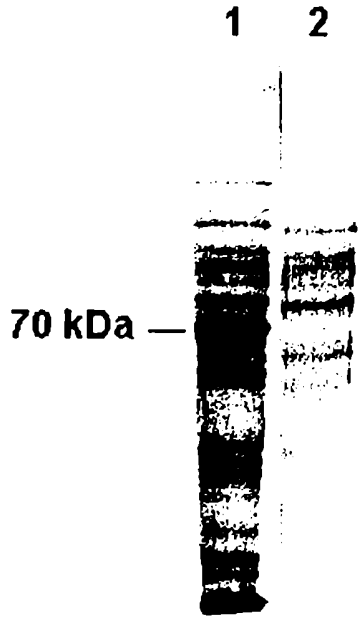


Fig. 11 Inhibición de la reactividad anti-HSP70 de un suero LMC con el recombinante Lbb1.
El homogenato total de *L.(V.) braziliensis* (50µg/calle) se resolvió en geles de poliacrilamida y se transfirió a membranas de nitrocelulosa. Las tiras de nitrocelulosa fueron incubadas con el suero LMC 143 (1:2.000) calle 1, o con la misma dilución del suero pre-incubada durante 1 hora con 20µg de la proteína de fusión GST-Lbb1, calle 2.

Durante esta serie de experiencias se observó un fenómeno sobre el que no existen antecedentes en la literatura. Los sueros de los pacientes LMC 143 y 145 poseían títulos muy elevados de anticuerpos anti-*Leishmania* (véase calle 1 de la Fig. 10 las reacción del suero 145, dilución 1:5.000). Estos sueros conservaban reactividad inclusive hasta dilución 1:20.000. En este caso la única banda reconocida en el Western blot era la de 70 kDa (Fig. 12).

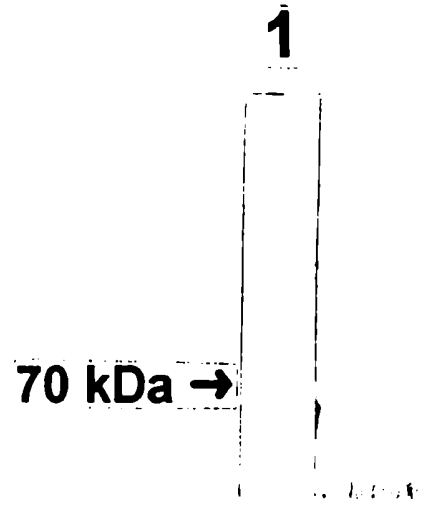


Fig. 12 Reactividad del suero LMC 145 con el extracto *de L.(V.) braziliensis* a altas diluciones. El extracto de *L.(V.) braziliensis* (30µg) se corrió en un gel 7,5% SDS-PAGE y transfirió a membranas de nitrocelulosa. Una tira (calle 1) fue revelada con el suero LMC 145 diluído en 1:20.000.

4.2) Construcción de una biblioteca de expresión en λgt11 de *L. (V.) peruviana*

Dado que ya se disponía de las HSP70 de *L.(V.) braziliensis* y *T. cruzi*, se decidió completar la caracterización de la respuesta anti-HSP70 en Leishmaniasis y clonar el ADNc de la HSP70 de *L.(V.) peruviana*. Con este fin, se construyó una biblioteca de expresión de *L.(V.) peruviana* en el vector λgt11 a partir de ARN poly-adenilado de promastigotes de la fase estacionaria temprana de la cepa LC26 de *L.(V.) peruviana*.
Se sintetizaron 431.2 ng de ADNc simple cadena, indicando que se transcribió un 43.12% del ARN poly-adenilado y 355 ng de ADN doble cadena dando una eficiencia de transcripción de 82,4% (Tablas 1 y 2).

Tabla 1.

Síntesis de ADNc de *L.(V.) peruviana*

ARNm	1 μg
Transcriptasa Reversa	20 U/μg
Primera cadena ADNc sintetizada	431,2 ng
Porcentaje ARN transcripto	43,12%
Segunda cadena ADNc sintetizado	355 ng
Porcentaje segunda cadena ADNc transcripto	82,4%
Cantidad total de segunda cadena sintetizada	711 ng

Tabla 2.

Clonado de ADNc de *L.(V.) peruviana* en λgt11

Brazos λgt11/Eco RI/CIP	1 μg
Inserto ADNc LC26	50 ng
Eficiencia de clonado (ufp/μg inserto)	$2x10^7$

El porcentaje de fagos recombinantes con inserto presentes en la biblioteca fue de un 80%, dando una eficiencia de clonado de $2x10^7$ ufp/µg de inserto. La biblioteca sin amplificar tenía un título de $2x10^6$ ufp totales y al amplificarla alcanzó un título de $1x10^8$ ufp/ml. El tamaño promedio de los insertos de la biblioteca de ADNc se analizó por PCR (Saiki y col., 1988). Los fragmentos amplificados a partir de los insertos de 10 fagos recombinantes tomados al azar variaron entre 400 y 1.300 pb, mientras que la amplificación de un fago no recombinante (placa de lisis azul) no dio producto de amplificación (resultados no mostrados).

4.3) Clonado y caracterización de la hsp70 de *L.(V.) peruviana*

4.3.1) Aislamiento del clon U4

El aislamiento de la hsp70 de *L.(V.) peruviana* se realizó simultáneamente por rastreo inmunológico con anticuerpos anti-Lbb1 y el ADNc de Lbb1 marcado radioactivamente (Materiales y Métodos). Se rastrearon 100.000 fagos independientes de la biblioteca de expresión de *L.(V.) peruviana* con los anticuerpos anti-Lbb1 del suero de un paciente con LMC (ver suero de la Fig. 8A, calle 3, y Apéndice) y con la sonda correspondiente. Trabajando con réplicas se identificaron 3 fagos recombinantes que eran positivos por ambos rastreos. Se seleccionó el recombinante U4 por poseer la más alta reactividad con el anticuerpo anti-Lbb1 y dar una señal muy fuerte de hibridización con la sonda Lbb1. El tamaño del inserto contenido en el recombinante U4 se determinó por digestión con Eco RI, dando un tamaño de aproximadamente 1,6 Kb.

4.3.2) Secuenciación del clon U4

El inserto fue subclonado en el vector M13mp18 para su secuenciación. La secuencia del ADNc de U4 no se pudo completar con el "primer forward" (-40) de M13mp18, leyéndose sólo 400 pb de la región codificante (Figs. 14a y 16).

Para completar la secuencia se sintetizó un oligo (5' TCGAAGGAAGAGTACAGGCA 3') basado en la secuencia nucleotídica obtenida. Desafortunadamente, el "primer" se unía inespecíficamente a otras regiones del ADNc, dando lecturas de bases superpuestas. Se intentó leer desde el extremo 3' no codificante usando el "primer forward" sobre la hebra complementaria del ADNc de U4. Luego de leer el adaptador, usado para la construcción de la biblioteca y la cola de poly-A, no se pudo leer más (Figs. 14a, flecha a la derecha y 17).

Este resultado coincide con lo informado por Yeyati en su tesis doctoral (Levy-Yeyati, 1992) cuando analizó la secuencia del recombinante Lbb1. En su tesis, Yeyati informa sobre la presencia de una región 3' no codificante no secuenciable debido probablemente a la presencia de secuencias repetitivas y un alto contenido de bases GC. Este fenómeno también fue informado por otros investigadores (Lee y col., 1988; Mc.Farlane y col., 1990; Bock y Langer, 1993).

Finalmente, se diseñó otra estrategia para completar la lectura de la secuencia codificante. Al analizar la secuencia nucleotídica de las HSP70 de *L.(V.) braziliensis* (Levy-Yeyati P., Tesis doctoral, 1992) y la de *L.(L.) amazonensis* (Bock y Langer, 1993) se observó que la secuencia correspondiente al último codón codificante y el codón de terminación correspondía al sitio de corte de la enzima Sal I (Fig. 14a). Esto permitió realizar un clonado direccional por corte con Eco RI para liberar el inserto y con Sal I para separar la región codificante de la no codificante. Efectivamente, al cortar con Eco RI y Sal I se obtienen 2 fragmentos: uno de 550 pb, correspondiente a la región codificante (Fig. 13, calle 2) y el otro de 1.050 pb correspondiente a la región 3' no codificante incluyendo la cola de poly-A (Fig. 13, calle 3).

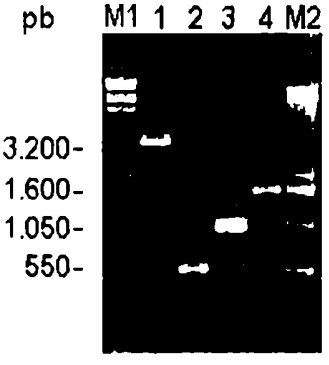


Fig. 13 Fragmentos derivados de U4 utilizados en el subclonado.
Los fragmentos purificados correspondientes a la región codificante (550 pb, calle 2) y no codificante (1.050 pb, calle 3) de U4, así como el inserto completo (1.600 pb, calle 4) y el vector pGEM3zf(+) digerido con Eco RI y Sal I se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa (1%) y revelaron con Bromuro de Etidio. M1: marcador λ/Hind III y M2 marcador 1 Kb ladder.

Estrategia de secuenciación del recombinante U4 de *L.(V.) peruviana*

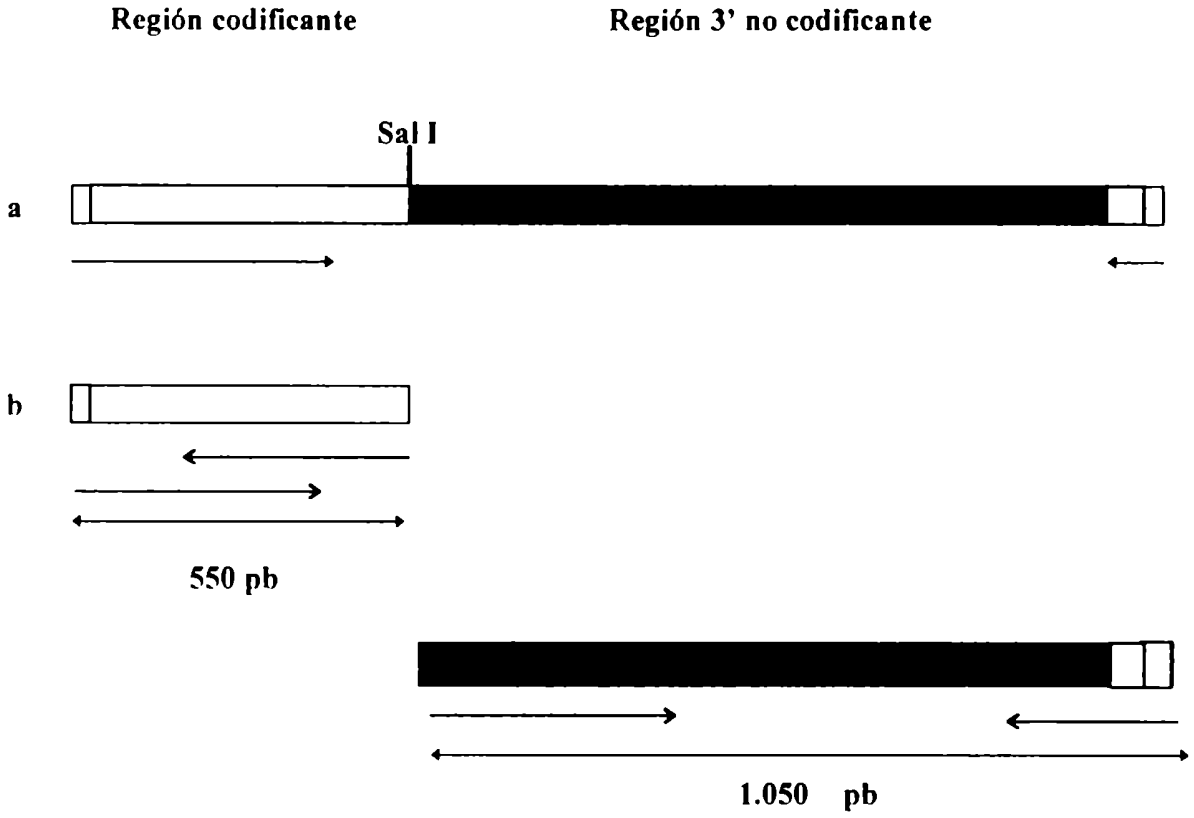


Fig. 14 Estrategia de secuenciación del recombinante U4 de *L.(V.) peruviana*

a) Diagrama del ADNc contenido en el recombinante U4 y la estrategia usada para la secuenciación parcial del recombinante. b) Diagrama de la región codificante y no codificante del recombinante U4 obtenidas por corte con Sal I y la estrategia de secuenciación para completar la región codificante. Las áreas claras corresponden a la secuencia del adaptador usado en el clonado. El área punteada clara corresponde a la región codificante. El área negra corresponde a la región 3' no codificante. El área gris corresponde a la cola de poly-A. Las flechas indican la región secuenciada y las flechas de dos cabezas indican el tamaño de las regiones codificante y 3' no codificante respectivamente.

U4 tiene un marco de lectura abierto de 525 pb que codifica los 174 aminoácidos C-terminales de la HSP70 de *L.(V.) peruviana* (Fig. 15). De los 1.075 pb correspondientes a la región 3' no codificante, se leyeron aproximadamente 300 pb posteriores al codón de terminación. Desde el poly A se leyeron aproximadamente 300 pb (Fig. 19). Una vez subclonados los fragmentos, se utilizó la secuenciación automática para completar la lectura de las diferentes regiones de U4 (Figs. 16-19).

GAATTCGAGGATCCGGGTACCATGG CG TTC GAC CTG GAC GCG AAC GGC ATC CTG AAC GTG
F D L D A N G I L N V

TCC GCG GAG GAG AAG GGC ACC GGC AAG CGC AAC CAT ATC ACC ATC ACC AAC GAC
S A E E K G T G K R N H I T I T N D

AAG GGC CGA CTG AGC AAG GAC GAG ATC GAG CGC ATG GTG AAC GAT GCG TCG AAG
K G R L S K D E I E R M V N D A S K

TAC GAG CAG GCC GAC AAG ATG CAG CGC GAG CGC GTG GAG GCG AAG AAC GGC CTG
Y E Q A D K M Q R E R V E A K N G L

GAG AAC TAC GCG TAC TCG ATG AAG AAC ACG GTC TCC GAC ACG AAC GTG TCC GGC
E N Y A Y S M K N T V S D T N V S G

AAG CTG GAG GAG AGC GAC AGG TCC GCG CTG AAC TCG GCG ATC GAC GCG GCG CTG
K L E E S D R S A L N S A I D A A L

GAG TGG CTG AAC AGC AAC CAG GAG GCG TCG AAG GAA GAG TAC GAG CAC CGC CAG
E W L N S N Q E A S K E E Y E H R Q

AAG GAG CTG GAG AGC ACA TGC AAC CCG ATC ATG ACC AAG ATG TAC CAG AGC ATG
K E L E S T C N P I M T K M Y Q S M

GGC GGC GGC GCG GGC GGC ATG CCC GGC GGT ATG CCG GAC ATG AGC GGC ATG GGC
G G G A G G M P G G M P D M S G M G

GGT GGT GCG GGT CCG GCC GCC GGA GCC TCC TCC GGC CCC AAG GTC GAG GAG GTC
G G A G P A A G A S S G P K V E E V

GAC TAG GCTCTGTGTGCACCACCGGCTGTAGTGCTCGCGGGTGAATGCCATATATCCTGCTCACGCCGC
D *

TGATGTATGTTTGGTTGTTGGCGGATGCGGGTTCGCTGATGCCGTGGAGATACTCCTCGAACTGATGGATA

TGGTGCTACTATGTCCTGTTCAGGTGTTTTCTTGCCTTGCTTTGACGCGCGGGTGTCTTACAGTGGCGCTG

CGACTCTTTCTCCTCGCATATGCGGCGTGTCTCTCCGTGTGTGTATGTCTTAAAAAAATTTTGGTGTGTTT

AAAATTTCCTTCCTTTGGTACTAGAGCGTTTT..(#)..TTTTTTTTAATTTTTTCCCCCCCTTTTGGGCC

TTTTTTCCCCGGGTTTTCCCCCCCTTTTTTTTTCCCCGCCCTTCCCCTTTTTTTTCCCCCCCCCCCCCCCC

CCCTTTTTTCCTTTTTTCCCCCGGGGGAAAATAAAAAAAATAAATAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAA

AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA CCATGGTACCCGGATCCTCGAATTC

Fig. 15 Secuencia nucleotídica parcial y de aminoácidos del recombinante U4 correspondiente a la porción C-terminal de la HSP70 de *L.(V.) peruviana*. El adaptador usado en el clonado está subrayado.
región no secuenciada, * codón de terminación.

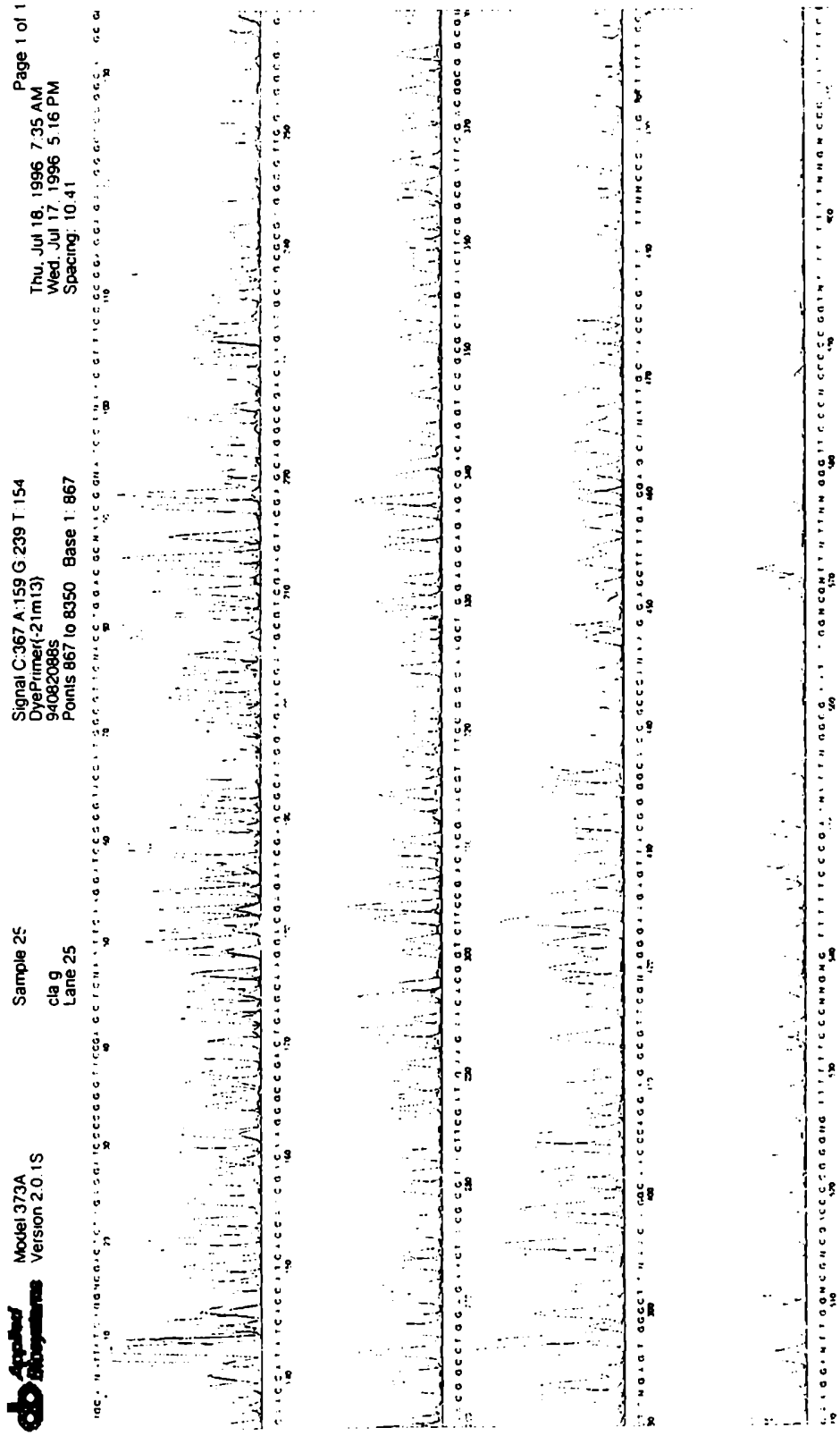


Fig. 16 Secuencia automática de la región codificante del ADNc de U4 (Fig. 14a, flecha izquierda)

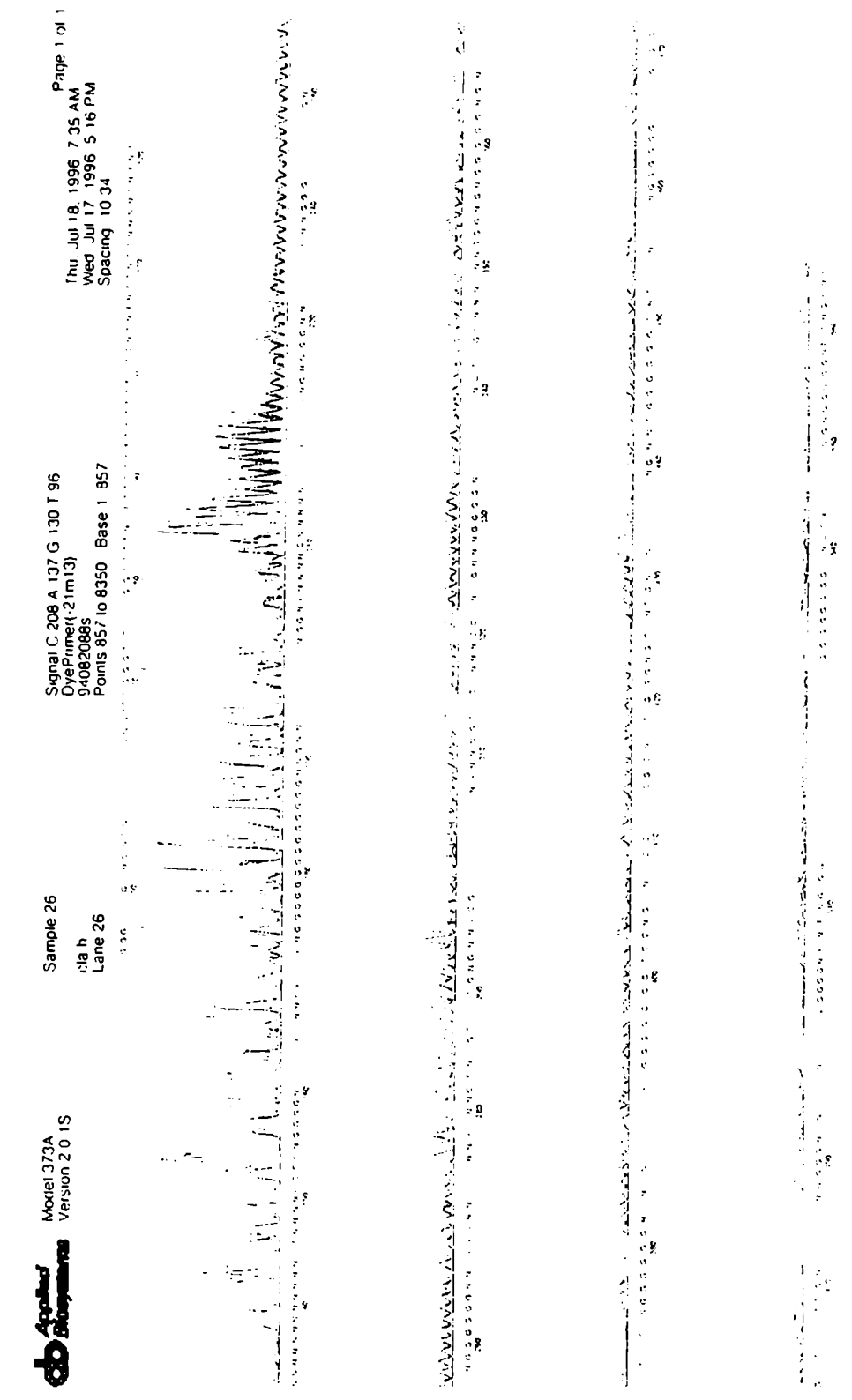


Fig. 17 Secuencia automática del extremo 3' de la región no codificante del ADNc de U4 (Fig. 14b, fragmento de 1.050 pb flecha derecha).

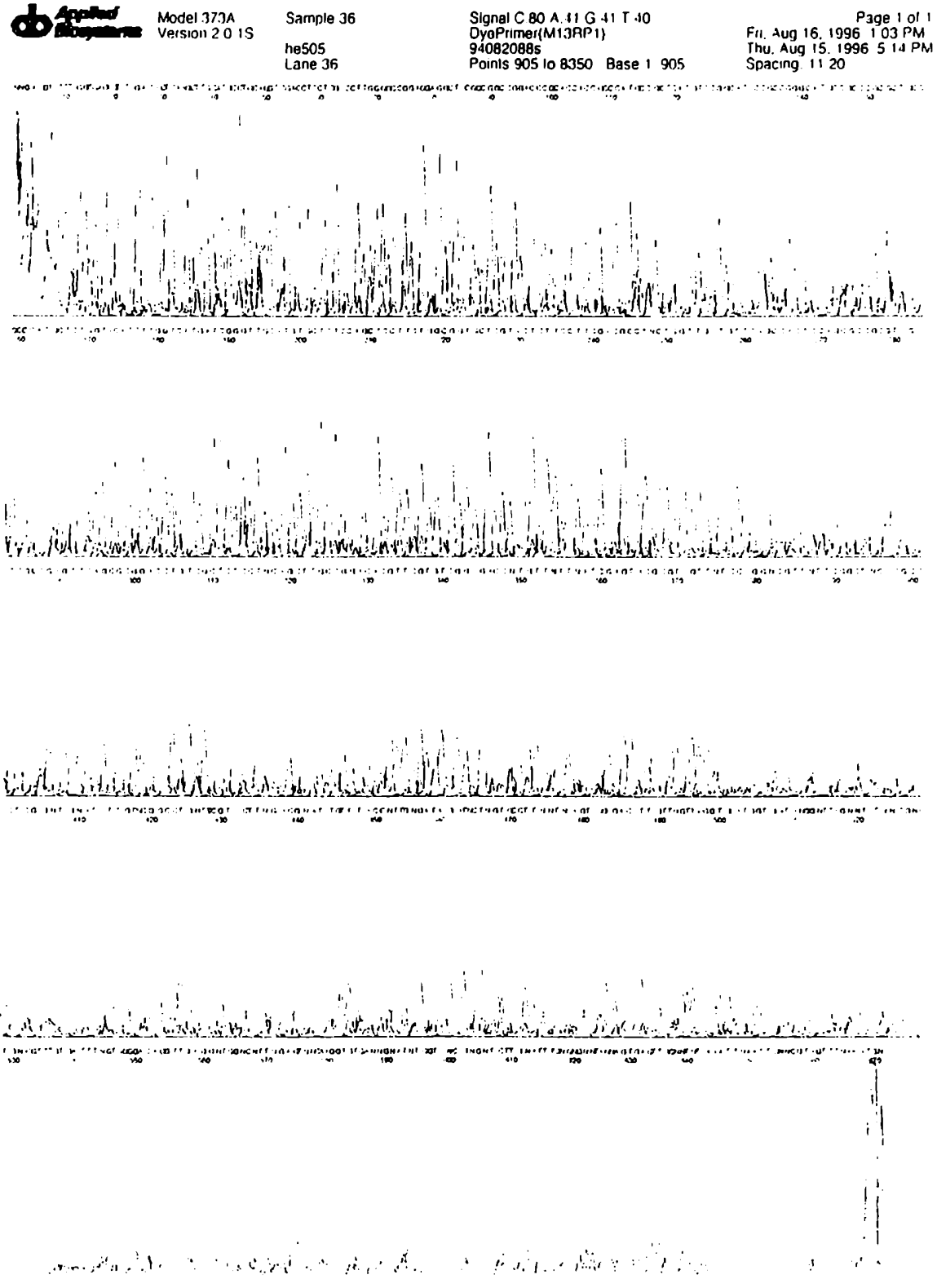


Fig. 18 Secuencia automática del extremo C-terminal de la región codificante del ADNc U4 (fragmento de 550 pb en la Fig. 13, calle 2 y Fig. 14b, fragmento de 550 pb flecha derecha). Se muestra la secuencia de la cadena complementaria del inserto 550 pb.

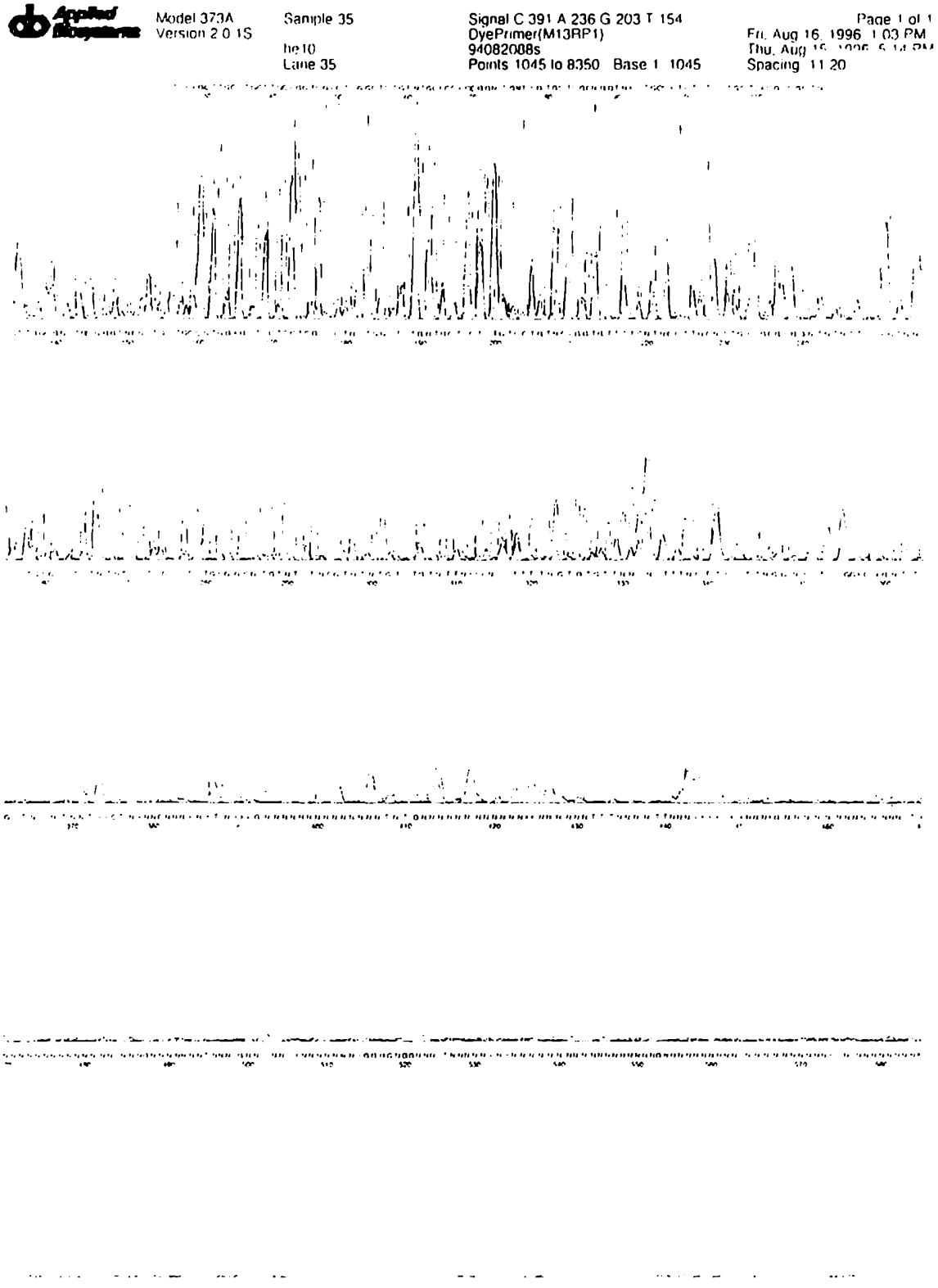


Fig. 19 Secuencia automática del extremo 5' de la región no codificante del ADNc de U4 (fragmento de 1.050 pb en la Fig. 13, calle 3 y Fig. 14b, fragmento de 1.050 pb flecha izquierda)

Del análisis del marco de lectura abierto del recombinante U4 en un banco de datos se observa que dicho recombinante presenta homología con la porción C-terminal de las proteínas de choque térmico de 70 kDa (HSP70) ya informadas para otros kinetoplástidos (Lee y col., 1988; Mc.Farlane y col., 1990; Bock y Langer, 1993; Quijada y col., 1996). Las HSP70 de los kinetoplástidos muestran homología, sobre todo en la región N-terminal, donde se localizan los sitios de unión al ATP y calmodulina, ligandos que modulan su actividad como chaperonas moleculares. Previamente, en el laboratorio se habían aislado los ADNc de las porciones C-terminales de las hsp70 de *T. cruzi* (recombinante RA1, 236 aminoácidos) y de *L.(V.) braziliensis* (recombinante Lbb1, 228 aminoácidos) (Levy-Yeyati P., Tesis doctoral, 1992). Ambos recombinantes presentan una homología que decae hacia el extremo C-terminal, donde se observan el mayor número de substituciones no conservativas (ver Introducción). En la Fig. 20 se comparan los últimos 174 aminoácidos C-terminales de los 3 recombinantes.

Al comparar la secuencia de aminoácidos del recombinante U4 con Lbb1 observamos una homología de 98% (97% identidad y 1% substituciones conservativas), mientras que con el recombinantes RA1, la homología alcanza un 87% (74% identidad y 13% substituciones conservativas). La gran homología entre los recombinantes U4 y Lbb1 coincide con los resultados de la Fig. 1 y 2, donde se demuestra la conservación de epítopes en las dos especies de *Leishmania* sp. Llama la atención la presencia de 2 motivos GGMP en U4 y Lbb1 y 6 en RA1.

```
U4    F D L D A N G I L N V S A E E K G T G K R N H I T I T N D
Lbb1  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
RA1   . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . Q . V . . . .

U4    K G R L S K D E I E R M V N D A S K Y E Q A D K M Q R E R
Lbb1  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . D A
RA1   . . . . . A D . . . . . S E . A . . . A Q . . E . . D .

U4    V E A K N G L E N Y A Y S M K N T V S D T N V S G K L E E
Lbb1  L . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
RA1   I D . . . . . F . . . . . N E P . . A . . I . .

U4    S D R S A L N S A I D A A L E W L N S N Q E A S K E E Y E
Lbb1  . . . . . L . . . T . . . . . . . . . . . . . . . . .
RA1   A . K N T I T . . V E E . . Q . . . N . . . . . . . . .

U4    H R Q K E L E S T C N P I M T K M Y Q S M G G G A G G M P
Lbb1  . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . . .
RA1   . . . . . N L . T . . . . . G . . A . - . . . .

U4    G G M P - - - - - - - - - - - - - - - - D M S G M G G G A
Lbb1  . . . . - - - - - - - - - - - - - - - . . . . . . . . Q
RA1   . . . . G G M P G G M P G G M P G G M P - - - - - - . . .

U4    G P A A G A S S G P K V E E V D
Lbb1  . . . . . . . . . . . . . . .
RA1   N . S S - - . . . . . .
```

Fig. 20 Comparación de la secuencia de aminoácidos de la porción C-terminal de las hsp70 de *L.(V.) peruviana* (U4), *L.(V.) braziliensis* (Lbb1) y *Trypanosoma cruzi* (RA1). Los puntos indican aminoácidos idénticos. Los guiones se introdujeron para permitir un mejor alineamiento de la secuencia. El motivo repetitivo GGMP está subrayado. Se comparan los 174 últimos aminoácidos C-terminales de los 3 recombinantes.

4.3.3) Organización genómica del locus hsp70 en *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis*

Para confirmar la identidad del inserto U4 y compararlo con Lbb1 se analizaron Southern blots de ADN genómico de *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis* y digeridos con diferentes enzimas de restricción (Fig. 21 y 22, respectivamente).

Se observa para la mayoría de las enzimas evaluadas una o dos bandas hibridizantes, lo que sugiere que el gen de la HSP70 de estas especies estaría organizado en un locus genómico. Sin embargo, teniendo en cuenta la organización multicopia en tandem que los genes hsp70 mantienen en la mayoría de las especies de *Leishmania* sp (ver Introducción), las bandas hibridizantes en las digestiones Pst I, Sal I, Bgl II, Bam HI, Sma I y Hae III, reflejarían las unidades repetitivas del tandem. Mientras que la banda de 23 Kb de las digestión Eco RI, Kpn I y Hind III representa el cluster que contiene las unidades repetitivas (Figs. 21 y 22).

Como era de esperar siendo dos especies tan emparentadas, el análisis del Southern blot de *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis* muestran la ausencia de polimorfismo inter-especies con las enzimas estudiadas.

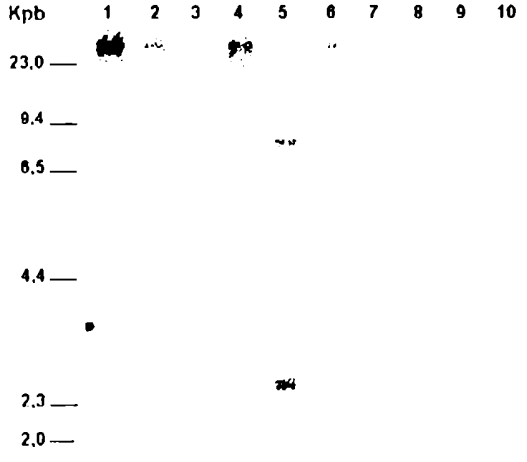


Fig. 21 Análisis de la organización genómica de la HSP70 de *L.(V.) peruviana* por Southern blot.
El ADN genómico de *L.(V.) peruviana* (20 µg/calle) sin digerir (calle 1) y digerido con las enzimas de restricción Pst I, Sal I, Kpn I, Bgl II, Hind III, Bam HI, Eco RI, Sma I y Hae III (calles 2 a 10, respectivamente) fue sometido a electroforesis en gel de agarosa (0,8%), transferido a membranas de nylon e hibridado con una sonda radioactiva correspondiente al clon U4.

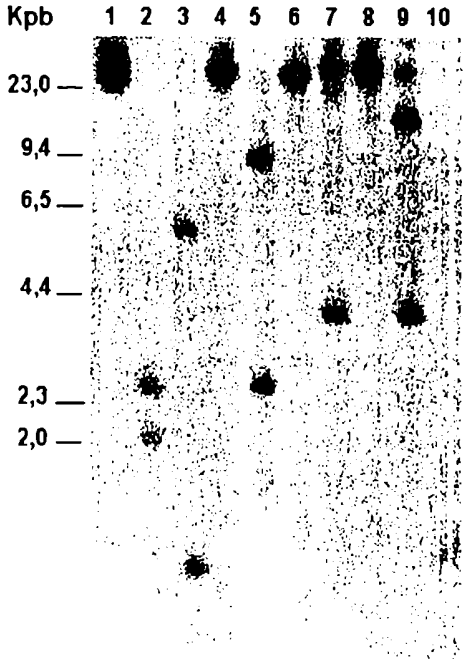


Fig. 22 Análisis de la organización genómica de la HSP70 de *L.(V.) braziliensis* por Southern blot.
El ADN genómico de *L.(V.) braziliensis* (20 µg/calle) sin digerir (calle 1) y digerido con las enzimas de restricción Pst I, Sal I, Kpn I, Bgl II, Hind III, Bam HI, Eco RI, Sma I y Hae III (calles 2 a 10, respectivamente) fue sometido a electroforesis en gel de agarosa (0,8%), transferido a membranas de nylon e hibridado con una sonda radioactiva correspondiente al clon U4.

4.3.4) Subclonado y expresión de las HSP70 de *Leishmania (Viannia) peruviana* y *L.(V.) braziliensis* en cultivos bacterianos

Con el fin de evaluar la respuesta humoral anti-HSP70 de pacientes con Leishmaniasis los ADNc de las porciones C-terminales de las hsp70 de *L.(V.) peruviana*, *L.(V.) braziliensis* y *T. cruzi* se subclonaron en el vector de expresión pGEX1λT. Del subclonado del recombinante U4 en pGEX1λT se obtuvieron 2 plásmidos recombinantes (pU4.2 y pU4.5), que habían incorporado el inserto, pues al digerir los plásmidos recombinantes con Eco RI, liberaban un fragmento de 1,6 Kb correspondiente al ADNc clonado (Fig. 23A, calles 5 y 6). Como el subclonado fue bi-direccional, quedaba por determinar si los ADNc habían sido clonados en la orientación adecuada, lo que permitiría la expresión de una proteína de fusión con la proteína "carrier", Glutatión S-transferasa (GST). Por esta razón, se analizó la expresión de la proteína de fusión por Western blot, usando como inmunosonda el suero de un paciente con LMC (143) que presenta títulos elevadísimos de anticuerpos anti-HSP70 (ver Fig. 11).

En la Fig. 23B calles 3 y 4, se muestra la reactividad de una banda de 47 kDa para ambos clones recombinantes que corresponde a la expresión de una proteína de fusión (GST-U4), lo que indicaba el clonado de U4 en la orientación adecuada.

Del subclonado del recombinante Lbb1 en pGEX1λT se obtuvieron también 2 clones recombinantes (pLbb1.2 y pLbb1.6), cuyos plásmidos al ser digeridos con Eco RI liberaron un fragmento de 2 Kb, correspondiente al ADNc Lbb1 (Fig. 23A, calle 7). En forma similar a lo realizado para el clonado del ADNc de U4, se verificó el clonado en la orientación correcta. Un primer análisis de las proteínas recombinantes expresadas indicaban que sólo el recombinante pLbb1.6 había sido clonado en la orientación correcta, obteniéndose una proteína de fusión de 53 kDa (Fig. 23B, calle 1). Ensayos posteriores demostraron que el otro recombinante (pLbb1.2) expresaba poca proteína de fusión (datos no mostrados). La razón de esta expresión disminuida no se ha elucidado.

Fig. 23 Subclonado en pGEX1λT de U4 y Lbb1.

A) Plásmidos aislados de las bacterias no recombinantes (calle 2) o recombinantes U4.2 (calle 3), U4.5 (calle 4) y Lbb1.6 (calle 5). Los plásmidos pU4.2, pU4.5 y pLbb1.6 se digirieron con Eco RI (calles 6, 7 y 8, respectivamente). Calle 1: Marcador λ/Hind III. La figura corresponde a un gel de agarosa 1% teñido con Bromuro de Etidio.

B) Análisis de la expresión de proteína recombinante U4 y Lbb1 por Western blot.

Las bacterias recombinantes fueron crecidas a 37°C, inducidas con IPTG y sonicadas. El sobrenadante colectado e incubado con glutation-agarosa. Luego de varios lavados, a la matriz se le adicionó loading buffer. Las muestras se corrieron en un gel 10% SDS-PAGE y se transfirieron a membranas Hybond C. El Western blot se reveló con un suero LMC 145 (1:5.000). Calle 1: Lbb1.6, calle 2: pLbb1.2, calle 3: pU4.5, calle 4: pU4.2, calle 5: no recombinante.

Del subclonado del ADNc contenido en el fago recombinante RA1, se obtuvo un clon recombinante, cuyo plásmido al ser digerido con Eco RI liberaba el inserto de 939 pb y por Western blot expresaba una proteína de aproximadamente 55 kDa (Fig. 24, calle 1) reconocida por el suero LMC 143 (datos no mostrados).

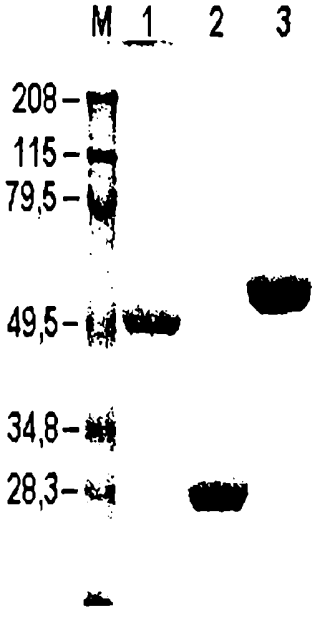


Fig. 24 Subclonado en pGEX1λT de los ADNc de RA1 y JL7.
Análisis de la expresión de proteína recombinante RA1 y JL7 por SDS-PAGE.
Las bacterias recombinantes fueron crecidas a 37°C, inducidas con IPTG y sonicadas. El sobrenadante colectado e incubado con glutation-agarosa. Luego de varios lavados, se adicionó a la matriz loading buffer. Las muestras se corrieron en un gel 10% SDS-PAGE.
M: Marcador de peso molecular; calle 1: GST-RA1; calle 2: JL7, clonado en forma invertida; calle 3: GST-JL7.

4.3.5) Reactividad humoral contra el recombinante U4 en diferentes infecciones

Dado que los epítopes de HSP70 se concentran en su extremo C-terminal (ver pag. 93, Fig. 11 de la presente tesis, Wallace y col., 1992 y Amorin y col., 1992) decidimos evaluar la respuesta anti-HSP70 usando como antígeno el recombinante U4. Es importante destacar, además, que U4 contiene el único epítope que ha sido completamente mapeado en Leishmaniasis humana entre los residuos 520 y 540 de la proteína (Wallace y col., 1992) y el epítope reconocido por el AcM. Se realizaron 3 ensayos diferentes: ELISA, Ensayo de Placa de Lisis (EPL) y Western blot.

4.3.5.1) ELISA

Los resultados de los ensayos de ELISA se resumen en la Tabla 3 y la Fig. 25. La reactividad anti-U4 de los sueros de pacientes con LCA y LCS resulta débil como se preveia de acuerdo a los resultados de la Fig. 8. La mayoría de estos sueros no reacciona con U4. Sobre los 23 sueros LCA, sólo 8 son positivos (35%), mientras que sólo 4 de 11 muestras LCS son positivas (36%). Esto contrasta con lo observado para LMC, donde 38 de 45 (84%) sueros analizados provenientes de Perú y Bolivia reaccionan intensamente con U4, con valores de densidad óptica oscilando entre 0,65-3,35 (Fig. 25).

Los sueros de pacientes con IM (todos provenientes de Bolivia) presentan un 60% de positividad con U4 (3/5). Estos tres sueros reaccionaron con valores de densidad óptica semejantes a los obtenidos para LMC (Fig. 25 y Tabla 4).

Cuando se evaluó la reactividad de los sueros chagásicos crónicos se observó que 8 de los 45 sueros analizados (18%) reaccionaban con U4 con valores de densidad óptica ligeramente superiores a la línea de corte, indicando probablemente la presencia de anticuerpos anti-HSP70 contra epítopes compartidos entre ambos parásitos. Este resultado coincide parcialmente con lo informado sobre la reactividad de la HSP70 de *Leishmania* sp. con sueros chagásicos, donde a pesar de la homología (aproximadamente 85%) entre las HSP70 de ambos Tripanosomátidos, los sueros chagásicos no reaccionan con la HSP70 de *Leishmania* sp. (Mc.Farlane y col., 1990; De Andrade y col., 1992; Quijada y col., 1996).

En el grupo de enfermedades no relacionadas, sólo 2 sueros, uno de un paciente con Malaria y otro con Lepra lepromatosa, reaccionan con U4 con densidades ópticas ligeramente superiores a la línea de corte (un informe completo de estos resultados se encuentran en el Apéndice).

Tabla 3

Evaluación de la reactividad de los sueros LCA, LCS, LMC, IM, ECh y Enfermedades no relacionadas contra U4 medida por ELISA

Enferm	N	+	%
LCA	23	8	35
LCS	11	4	36
LMC	45	38	84
IM	5	3	60
ECh	45	8	18
ENR	28	2	7

N: Número total de sueros
+: Sueros positivos; %: Porcentaje de sueros positivos
ENR: Enfermedades no relacionadas

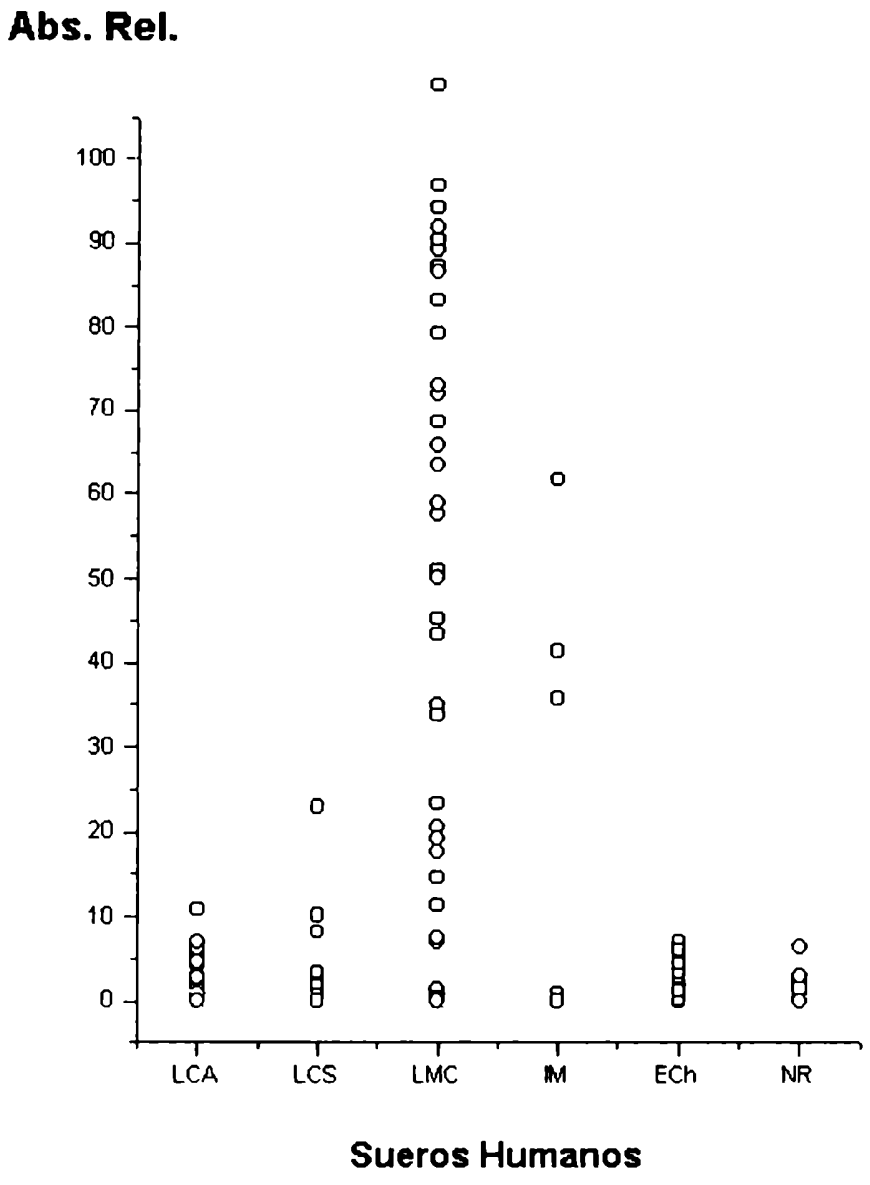


Fig. 25 Reactividad anti-U4 de los sueros de pacientes con LCA, LCS, LMC, IM y ECh. La reactividad anti-U4 se midió por ELISA empleando la proteína de fusión GST-U4 como antígeno. Los valores presentados para cada suero corresponden a una dilución 1:400 y se expresaron como la diferencia entre las DO obtenidas con la proteína de fusión y los obtenidas con la proteína "carrier" (GST). La reactividad de cada suero se determinó en 2 experiencias independientes y los valores se promediaron.
Abs.Rel. = absorbancia relativa, se define como d, según DO: $\bar{x}$ + d DS.

Tabla 4

Evaluación de niveles de anticuerpos anti-U4 en pacientes IM

Pacientes con infección mixta, IM (N=5)

Suero	Proc.	DO	d	
SR	B	0,94	35,8	++++
HA	B	0,06	0,6	-
LCH	B	1,08	41,4	++++
CB	B	0,07	1,0	-
FR	B	1,59	61,8	++++

X = 0,044
DS = 0,025
CUT OFF = 0,119

Proc: Procedencia (B: Bolivia)
DO: Densidad óptica
d: se define según, DO= x + d DS.
DS: Desviación stándard obtenida para el grupo de los sueros normales.

La Tabla 5 resume la tabla del Apéndice y la Fig. 25 expresando la reactividad de los distintos grupos con un sistema de cruces (reacción débil +; reacción muy intensa ++++).

En el grupo de LCA y LCS, uno de los 44 sueros analizados reacciona con U4 intensamente (++++), 11 sueros reaccionan débilmente (+ y ++) y 22 sueros no reaccionaron. En el grupo LMC, 35 de los 45 analizados reaccionaron intensamente con U4 (+++ y ++++), mientras que 3 reaccionaron débilmente (+ y ++) y 7 no reaccionaron. En el grupo IM, 3 de los 5 sueros analizados reaccionaron intensamente con U4 (++++) y los 2 restantes no reaccionaron.

Tabla 5.

Reactividad de diferentes sueros humanos contra U4 medida por ELISA

Enfermedad	N	-	+	++	+++	++++
Leishmaniasis cutánea andina (LCA)	23	15	7	1	0	0
Leishmaniasis cutánea selvática (LCS)	11	7	2	1	0	1
Leishmaniasis mucocutánea (LMC)	45	7	1	2	3	32
Infección mixta (IM)	5	2	0	0	0	3
Enfermedad de Chagas crónica (Ech)	45	37	8	0	0	0
Enfermedades no relacionadas	28	26	2	0	0	0

N: número total de sueros en cada grupo. (-): DO< x + 3DS; (+): x + 3DS≤ x + 9DS; (++): x + 9DS≤ DO < x + 15DS; (+++): x + 15DS≤ DO < x + 21DS; (++++): x + 21DS≤ DO.

4.3.5.2) Ensayo de Placa de Lisis (EPL)

Este ensayo permitió comparar la reactividad de U4 con respecto a la de Lbb1 y RA1 (Fig. 26). Además, se incluyeron los recombinantes JL7 (diagnóstico de Enfermedad crónica de Chagas), JL5 (marcador de cardiopatía chagásica), Tc C-P0 (proteína ribosomal P0 de *T. cruzi*) y extractos proteicos de *T. cruzi* y *L.(V.) braziliensis*. En este ensayo también se evaluó la reactividad de otras proteínas recombinantes de *Leishmania* spp, los resultados correspondientes a estas proteínas se discuten más adelante.

A diferencia del ELISA, sólo se analizaron 13 sueros LCA. Dos de estos sueros, 919 y 961, reaccionaron débilmente con U4 (Fig. 26B, 1 y 3). El suero 961 lo hizo también con Lbb1 (Fig. 26B, 3). Los restantes 11 sueros no reconocieron ni U4, ni Lbb1, ni otro recombinante (Fig. 26B, 2).

Es importante notar que los sueros 927, 937, 958, 965 y 1115 que reaccionaron NEGATIVAMENTE en EPL fueron positivos débiles (+) por ELISA (ver más arriba y Tabla 3).

También se analizaron 12 sueros LCS (el suero 635 se agotó y no se evaluó por ELISA). Cinco sueros (271, 343, 639, 903 y 956) fueron positivos débiles con U4 (Fig. 26C, 1, 2 y 3). Además, 343 y 956 reaccionaron con Lbb1 y RA1.

La comparación con los resultados de ELISA confirma la positividad de los sueros 903 (+) y 956 (++++) e identifica como positivos los sueros 980 (+) y 1129 (++) que son negativos por EPL. Tomando en conjunto estos resultados, resulta que de los 11 sueros ensayados en ELISA y EPL 7 son positivos. Sin embargo, 2 son positivos sólo por ELISA y 3 son positivos sólo por EPL. Si consideramos como positividad un sólo ensayo positivo (cualquiera de ellos) pasamos a tener un porcentaje de detección de 64%, superior al 36% por ELISA y 42% por EPL.

Los sueros LMC (N=45) se probaron diluidos 1:500. Cuarenta sueros reaccionaron intensamente con U4 y Lbb1 (89%) (Fig. 26D, 1, 2 y 3). Sin embargo, por ELISA sólo detectamos un 84% de positividad. Se repite el fenómeno observado en LCS. En efecto, los 7 sueros negativos por ELISA son el 512, 652, 979, 1130, 1178, AL y CO; de éstos sólo 512, 979, 1178 y AL son negativos por EPL. Si bien 652 y 1130 presentan leve positividad por EPL, el suero CO presenta una reacción más intensa (++).

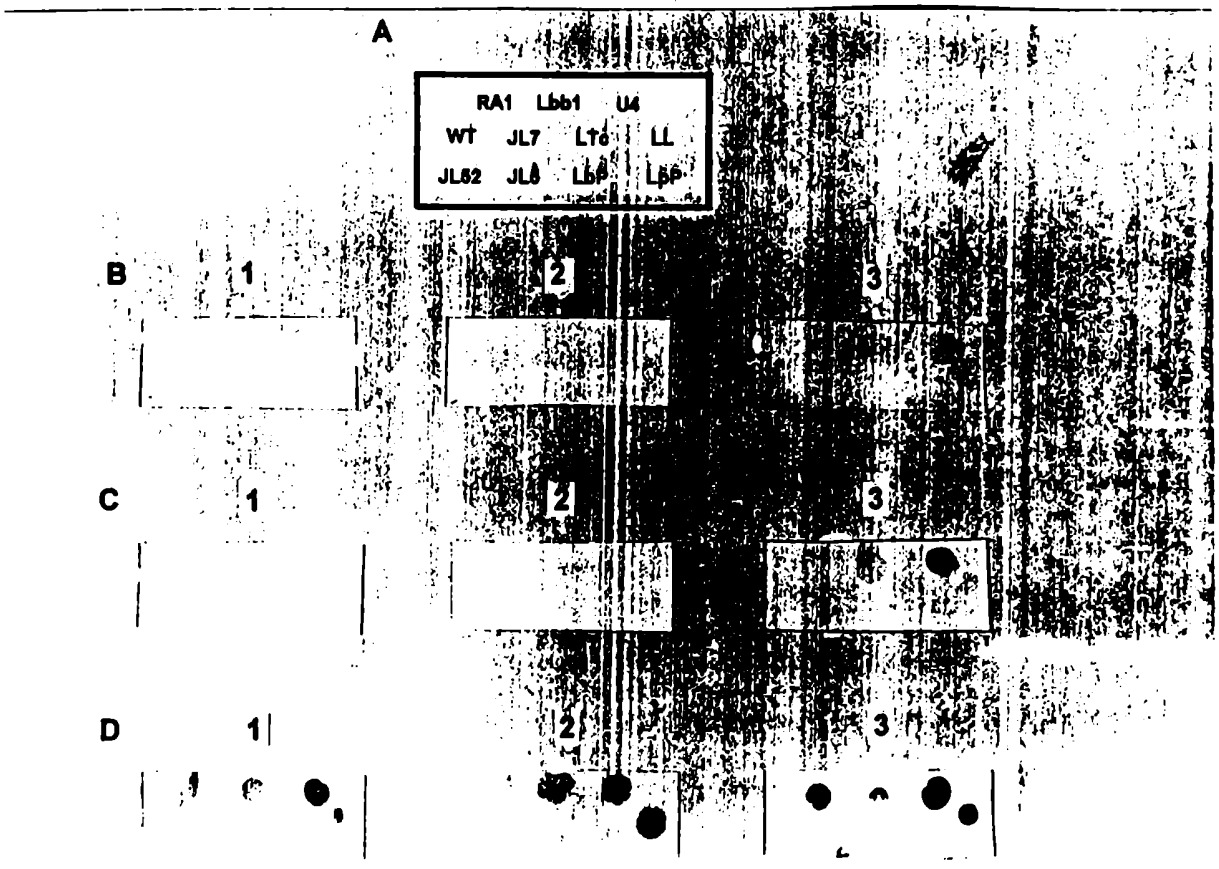
Es notable también que un suero (L2) negativo en EPL reacciona fuertemente (++++) por ELISA. De los 40 sueros positivos, 29 reaccionaron con RA1 (64%).

En el grupo IM analizamos 6 casos, 5 sueros reaccionaron intensamente con U4 y Lbb1 (Fig. 26E; 1, 3, 4, 5 y 6); 4 sueros también reaccionaron con RA1 (Fig. 26E; 1, 3, 4 y 6) y sólo 2 sueros reaccionaron con JL5 y JL7 (Fig. 26E; 2 y 3). En este grupo de pacientes los resultados de ELISA y EPL coinciden salvo en el caso del suero CB que es negativo por ELISA y dudoso para JL7 por EPL (Fig. 26E, 4).

Ningún suero chagásico reaccionó con los recombinantes U4 y Lbb1 (Fig. 26F; 1, 2 y 3). Sólo el 38% reaccionó con RA1, 66% reaccionó con JL5 y 94% reaccionó con JL7.

Ninguno de los sueros de pacientes con enfermedades no relacionadas o individuos normales, ninguno reaccionó con los recombinantes probados.

En la Tabla 6 se resumen los datos obtenidos por este ensayo para los diferentes grupos de sueros.


A
RA1 Lbb1 U4
WT JL7 LTα LL
JL82 JLδ Lbβ LβP
B
1
2
3
C
1
2
3
D
1
2
3

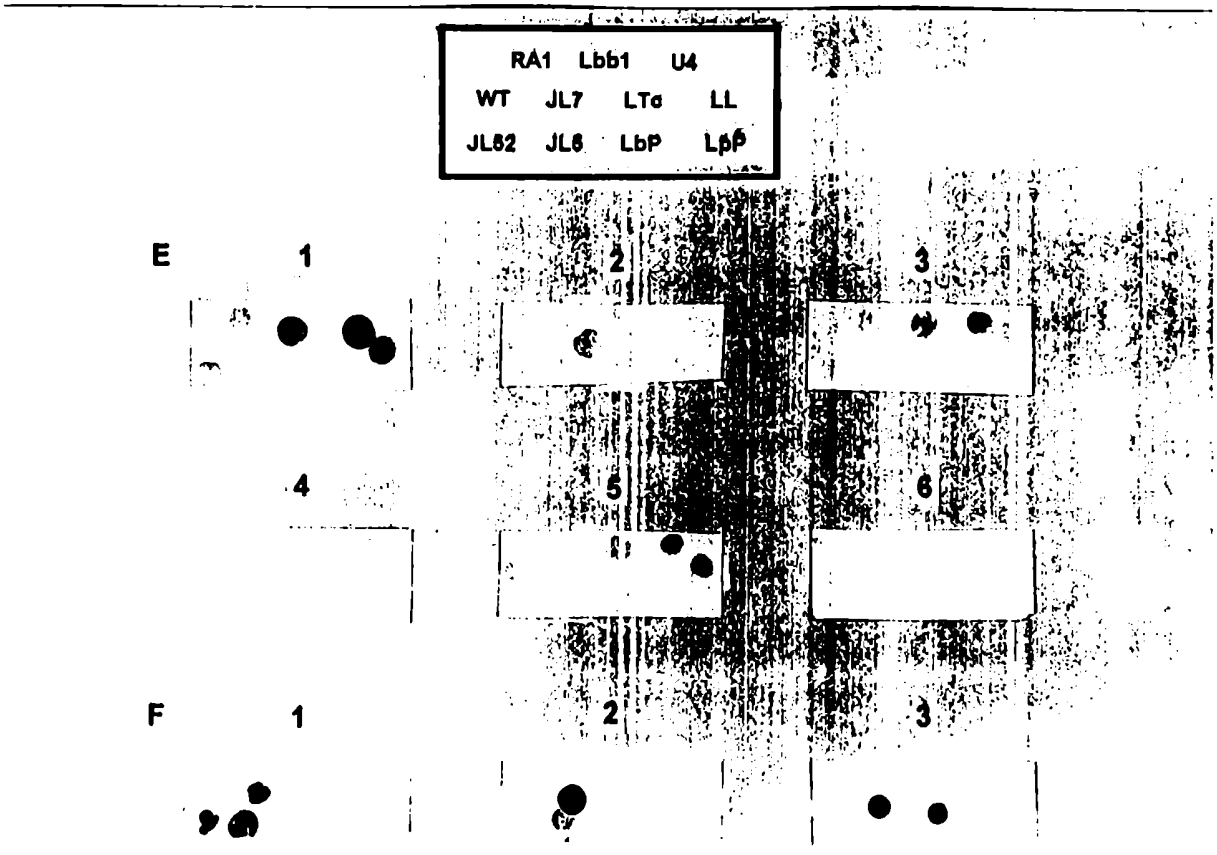


Fig. 26. Reactividad de los sueros LCA, LCS, LMC, IM y ECh por EPL.
A) Esquema de la ubicación de los fagos recombinantes
B) Reactividad de los sueros LCA: 919 (1), 927 (2) y 961 (3) a dilución 1:100.
C) Reactividad de los sueros LCS: 639 (1), 941 (2) y 956 (3) a dilución 1:100.
D) Reactividad de los sueros LMC: 143 (1), 931 (2) y 145 (3) a dilución 1:500.
E) Reactividad de los sueros IM: SR (1), HA (2), LCH (3), CB (4), FR (5), LSH (6) a dilución 1:500.
F) Reactividad de los sueros ECh: MS (1), MQ (2) y NE (3) a dilución 1:500.

Tabla 6.

Prevalencia de sueros humanos que reconocen los antígenos recombinantes U4, Lbb1, RA1, JL5 y JL7 por EPL.

	U4		Lbb1		RA1		JL5		JL7	
Grupos de sueros	+	%	+	%	+	%	+	%	+	%
LCA (N=13)	2	15	1	8	0	0	0	0	0	0
LCS (N=12)	5	42	2	17	2	17	0	0	0	0
LMC (N=45)	42	93	41	91	29	64	0	0	0	0
IM (N=6)	5	83	5	83	3	50	3	67	4	67
ECh (N=50)	0	0	0	0	19	38	33	66	47	94
Otras enferm. (N=48)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Ind. sanos (N=40)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

N = Número total de sueros analizados, + = Número de sueros positivos, % = Porcentaje de sueros positivos

A partir de los resultados obtenidos por EPL (Tabla 6), se determinó el valor diagnóstico de los recombinantes empleados para LMC, ECh e IM (Tabla 7).

Para correlacionar la presencia de anticuerpos anti-U4, anti-Lbb1 y anti-RA1 con Leishmaniasis mucocutánea y doble infectados como un único grupo. De la misma manera, la correlación entre Enfermedad de Chagas crónica y la existencia de anticuerpos anti-JL5, JL7 y RA1 se determinó considerando a los pacientes con Enfermedad de Chagas y doble infectados en conjunto.

El análisis estadístico de los datos reveló que los recombinantes U4 y Lbb1 presentan una alta sensibilidad (92 y 90%, respectivamente) y especificidad (100% para ambos) para el diagnóstico de LMC. Efectivamente, el índice Kappa calculados para estos antígenos fueron muy altos: 0,95 (U4) y 0,92 (Lbb1).

Por el contrario, RA1 derivado de la HSP70 de *T. cruzi* fue reconocido sólo por el 64% ed los sueros LMC, 38% de los sueros ECh y 50% de los sueros IM, resultando en índices Kappa de 0,55 para LMC y 0,32 para ECh.

Como era de esperar (Luquetti 1990; Moncayo y Luquetti, 1990 y Levin et al, 1991) el antígeno recombinante JL7 de *T. cruzi* presentó muy alta sensibilidad (91%) y especificidad (100%) para el diagnóstico de la Enfermedad de Chagas, dando un índice Kappa de 0,93. La reactividad anti-JL5, a pesar de ser menos sensible (64%) resultó altamente específica (100%) para esta enfermedad (índice Kappa=0,70).

Tabla 7.

Valor diagnóstico (índice Kappa) de los antígenos recombinantes U4, Lbb1, RA1, JL5 y JL7 para Leishmaniasis mucocutánea y Enfermedad de Chagas crónica.

	LMC			ECh		
	U4	Lbb1	RA1	JL5	JL7	RA1
Total positivos (C)	47	46	51	36	51	51
Total negativos (D)	142	143	138	153	143	138
Verdaderos positivos (a)	47	46	32	36	51	22
Verdaderos negativos (b)	138	138	119	133	138	104
Sensibilidad	0,92	0,90	0,63	0,64	0,91	0,39
Especificidad	1,00	1,00	0,86	1,00	1,00	0,78
Concord. Observada (Po)	0,98	0,97	0,80	0,89	0,97	0,66
Indice Kappa (K)	0,95	0,92	0,55	0,70	0,93	0,32

La sensibilidad, especificidad, concordancia e índice kappa se calcularon según se describe en Materiales y Métodos. Los índices Kappa se consideraron excelentes entre 0,8 y 1,0; buenos entre 0,61 y 0,8; débiles entre 0,41 y 0,6 y malos si son menores que 0,4.

4.3.5.3) Western blot

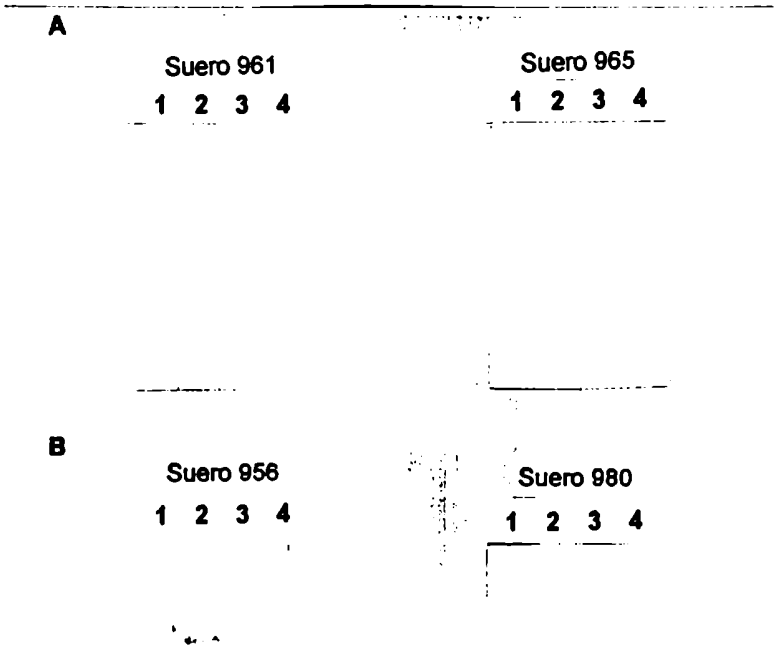
El análisis por Western blot (Fig. 27) se usó básicamente para completar la información sobre la reactividad de los sueros IM. Los sueros de pacientes con LCA (Fig. 27A, sueros 961 y 965) y LCS (Fig. 27B, suero 980) reaccionaron muy débilmente con U4 y Lbb1 pero no con JL7. El suero 956 (Fig. 27B) reaccionó intensamente con U4 y Lbb1.

Todos los sueros de pacientes con LMC reaccionaron intensamente con los recombinantes U4 y Lbb1 (Fig. 27C, sueros 143 y 931), confirmando la presencia de altos niveles de anticuerpos anti-HSP70. Llama la atención la débil reacción cruzada con JL7 de algunos sueros LMC (Fig. 27C, suero 143).

De los cinco sueros IM, 3 (SR, LSH y LCH) reaccionaron con U4/Lbb1 (Fig. 27D), mientras que de los dos restantes, reaccionaron intensamente (HA) y débilmente (CB) con JL7 (Fig. 27D).

Los sueros chagásicos reaccionaron con JL7 y no lo hicieron con U4 y Lbb1 (Fig. 27E, suero 48), salvo aquéllos que por ELISA mostraron una ligera reacción positiva (Fig. 27E, sueros MS y 79).

Ningún suero normal (Fig. 27F, sueros NA y NJ) y de enfermedades no relacionadas reaccionaron con U4, Lbb1 y JL7.


A
Suero 961
1 2 3 4
Suero 965
1 2 3 4
B
Suero 956
1 2 3 4
Suero 980
1 2 3 4
C
Suero 143
1 2 3 4
Suero 931
1 2 3 4

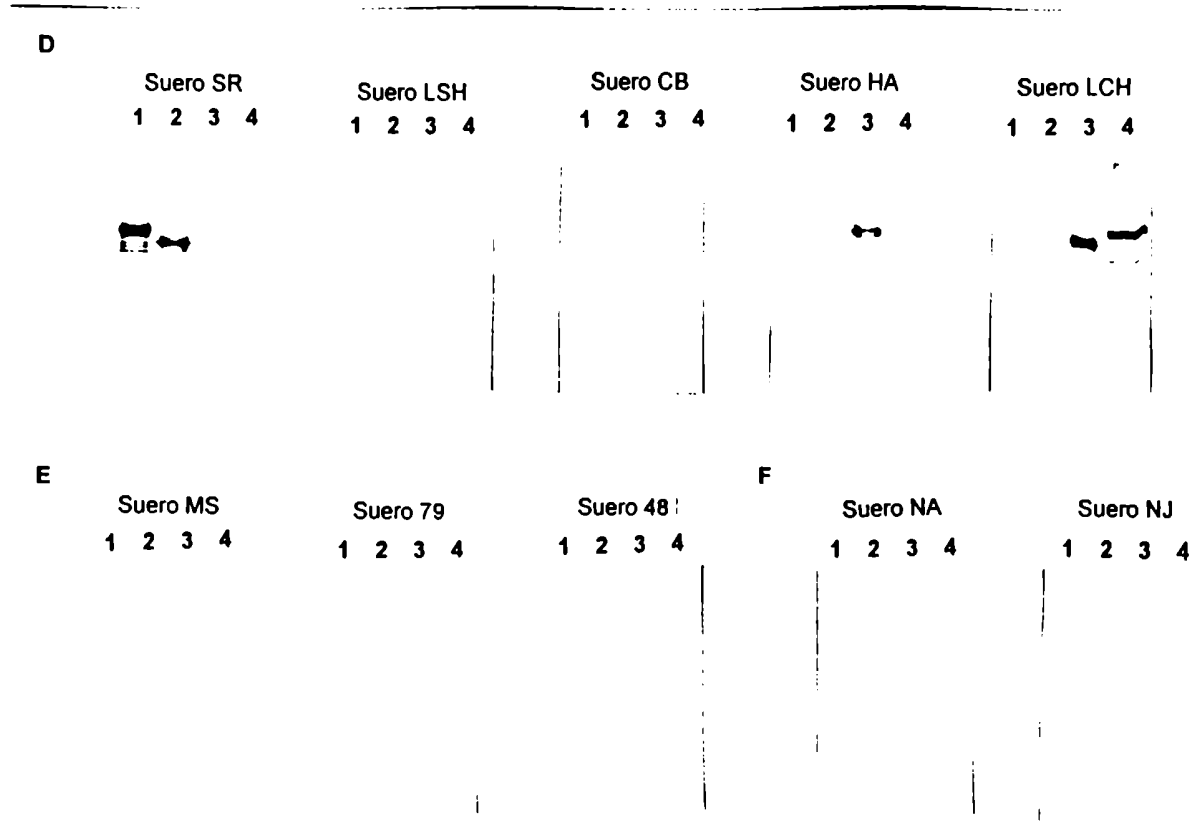


Fig. 27 Reactividad de los sueros LCA, LCS, LMC, IM, ECh y normales con las proteínas recombinantes U4, Lbb1 y JL7 por Western blot.
Las proteínas recombinantes la proteína GST (calle 1), JL7 (calle 2), Lbb1 (calle 3) y U4 (calle 4) fueron corridas en un gel 10% SDS-PAGE y electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa. Las tiras conteniendo los recombinantes fueron incubadas con los sueros a una dilución (1:500) y reveladas.
A) Reactividad de los sueros LCA: 961 y 965
C) Reactividad de los sueros LMC: 143 y 931
D) Reactividad de los sueros IM: LSH, CB y LCH
E) Reactividad de los sueros ECh: 48.
F) Reactividad de los sueros normales.
Las proteínas recombinantes U4 (calle 1), Lbb1 (calle 2), JL7 (calle 3) y la proteína GST (calle 4):
B) Reactividad de los sueros LCS: 956 y 980
D) Reactividad de los sueros IM: SR y HA
E) Reactividad de los sueros ECh: MS y 79

Para completar la reactividad de los sueros IM, se realizó un ensayo de ELISA usando como antígeno la proteína recombinante JL7. En este ensayo se usaron todos los sueros IM, algunos sueros chagásicos y unos pocos sueros LMC (Tabla 8).

Observamos que de los 5 sueros IM, sólo un suero (HA) reacciona con el recombinante JL7 con una densidad óptica de 0,25 (línea de corte: 0,095). De los dos sueros con LMC analizados, uno (143) reacciona con JL7 con una DO de 0,10; mientras que el otro suero (931) no reacciona con JL7. Todos los sueros chagásicos analizados (MS, 48 y 79) reaccionan fuertemente con JL7, con valores de DO entre 0,55-0,79.

Tabla 8.

Reactividad de diferentes sueros humanos contra JL7 determinada por ELISA.

Suero	Grupo	DO	d	
SR	IM	0,05	-1,5	-
HA	IM	0,25	18,5	+++
LCH	IM	0,06	-0,5	-
CB	IM	0,08	1,5	-
LSH	IM	0,04	-2,5	-
143	LMC	0,10	3,5	+
931	LMC	0,00	-6,5	-
MS	ECh	0,75	68,5	++++
48	ECh	0,55	48,5	++++
79	ECh	0,79	72,5	++++

X = 0,065
SD = 0,010
CUT OFF = 0,095

Grupo: IM, infección mixta *L.(V.) braziliensis-T. cruzi*; LMC, leishmaniasis mucocutánea; ECh, enfermedad de Chagas crónica. **DO**: Densidad óptica; **x**: DO media obtenida para el grupo de sueros normales (N=5). **DS**: Desviación Standard obtenida para el grupo de sueros normales (N=5). **Cut off**: Línea de corte definida como x + 3DS; **d** se define según: DO= x + dDS. **(-)**: DO< x + 3DS; **(+)**: x + 3DS≤ x + 9DS; **(++)**: x + 9DS≤ DO < x + 15DS; **(+++)**: x + 15DS≤ DO < x + 21DS; **(++++)**: x + 21DS≤ DO.

Estos resultados correlacionan con los resultados de Western blot donde hallamos una ligera reacción cruzada de algunos sueros chagásicos con U4 y de algunos sueros LMC con JL7 (Fig. 27).

4.3.5.4) Análisis por PCR

Para completar la caracterización de los sueros IM se realizaron amplificaciones por PCR de minicírculos de los 2 parásitos sobre ADN extraído de alícuotas de suero (Fig. 28).

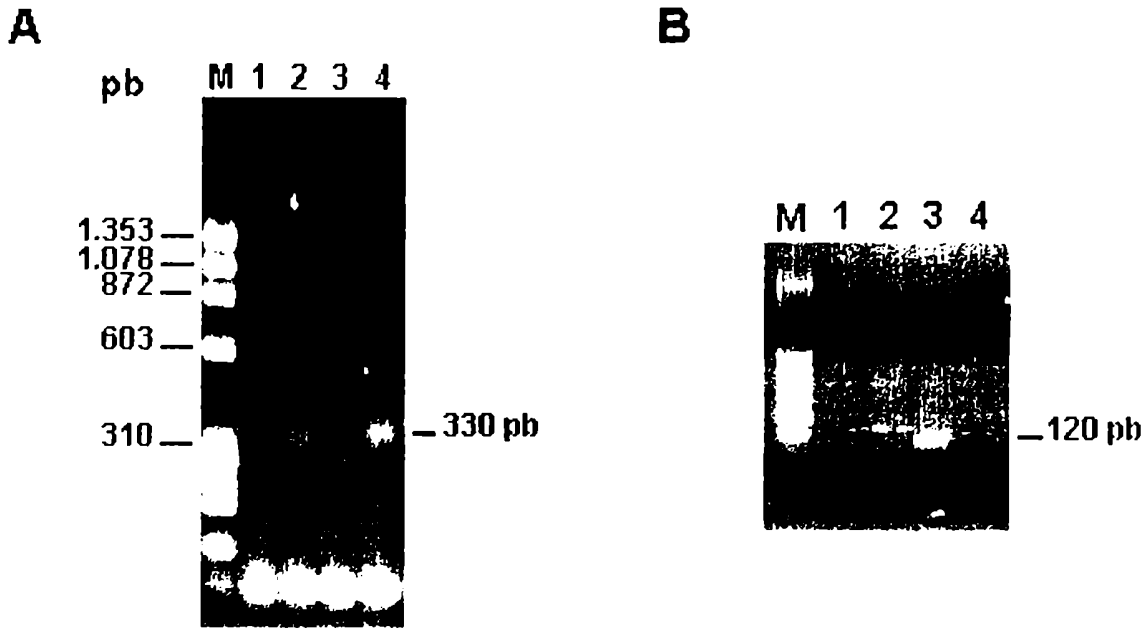


Fig. 28 PCR de sueros de pacientes IM.
A) PCR de los sueros IM con primers de *T. cruzi*.
B) PCR de los sueros IM con primers de *L.(V.) braziliensis*.
Sueros IM: HA (calle 1), CB (calle 2), SR (calle 3) y LCH (calle 4).

En la Tabla 9 se comparan los ensayos usados (ELISA, EPL y Western blot) para evaluar las respuesta humoral en pacientes con Leishmaniasis y la Enfermedad de Chagas contra los antígenos U4 y JL7 y se incluye el resultado de las amplificaciones. Lo más notorio es la amplificación de ADN de *T. cruzi* en sueros con nulo o bajo nivel de anticuerpos contra el reactivo diagnóstico específico, en este caso JL7 (Fig. 28 A y B y Tabla 9).

Los resultados de PCR confirman la caracterización clínica de estos pacientes en los que se encuentran síntomas de ambas infecciones.

Tabla 9.

Pacientes IM:

Comparación de los 3 ensayos usados para evaluar la respuesta humoral contra U4 y JL7 con la reacción PCR sobre sueros

	ELISA		EPL		Western blot		PCR	
	U4	JL7	U4	JL7	U4	JL7	L.b.b	T.c
SR	++++	-	++++	-	++++	-	+	+
HA	-	+++	-	++	-	++		-
LCH	++++		++	+/-	++++	-		+
CB	-		+	-	-	+	-	+
LSH	NR	-	NR		++	-	NR	NR
FR	++++	NR	++		NR	NR	NR	NR

L.b.b: *L.(V.) braziliensis* ; T.c: *T. cruzi*

4.4) Proteínas ribosomales de tipo P2 de *L.(V.) peruviana* y *L. (V.) braziliensis*

Trabajos previos de nuestro laboratorio han identificado y caracterizado el sistema de proteínas ribosomales P de *T. cruzi* (Levin y col., 1993). Más aún, Levitus y col., 1991 informaron la falta de reactividad de sueros de pacientes con Leishmaniasis visceral contra el epítope inmunodominante de las proteínas ribosomales de tipo P2, sugiriendo que la respuesta humoral desarrollada por pacientes con Leishmaniasis visceral era diferente a la descripta para infecciones con *T. cruzi*. Sin embargo, evidencias surgidas del estudio de infecciones animales (Soto y col., 1993a, 1993b, 1995a y 1995b) indicaban que las proteínas ribosomales P de *Leishmania* sp. podrían ser antigénicas en la infección humana, por lo que se decidió clonar las proteínas ribosomales P de *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis*. Su aislamiento se intentó por rastreo inmunológico y con sondas radioactivas sobre bibliotecas de expresión en λgt11 de *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis*.

4.4.1) Clonado de las proteínas ribosomales P2α y P2β de *L. (V.) peruviana* y de la proteína P2β de *L. (V.) braziliensis*

Los primeros ensayos para aislar fagos recombinantes conteniendo ADNc de las proteínas ribosomales P de *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis* mediante rastreo inmunológico con una mezcla de sueros de pacientes con LCA, LCS y LMC fueron negativos. Por lo que decidimos realizar el rastreo de ambas bibliotecas de expresión con sondas radioactivas correspondientes a las proteínas ribosomales de tipo P2α y P2β de *L.(L.) infantum*.

4.4.1.1) Proteína ribosomal P2α de *L.(V.) peruviana*

Se rastrearon 100,000 ufp de la biblioteca de expresión de *L.(V.) peruviana* con las sondas mencionadas. Luego de sucesivos rastreos se aisló un fago recombinante con cada sonda. Ambos insertos fueron subclonados en el vector M13mp18 para su secuenciación. El recombinante P2α de *L.(V.) peruviana* (LbpP2α) contiene un inserto de 900 pb, de los que se secuenció 715 pb (Fig. 29).

Dicho recombinante presenta un marco de lectura abierto de 327 pb que codifican 108 aminoácidos, faltándole sólo los 3 primeros aminoácidos N-terminales para la secuencia codificante completa (Fig. 29). La región 3' no codificante comprende 573 pb incluyendo la cola de poly-A. No se completó la secuencia de la región 3' no codificante.

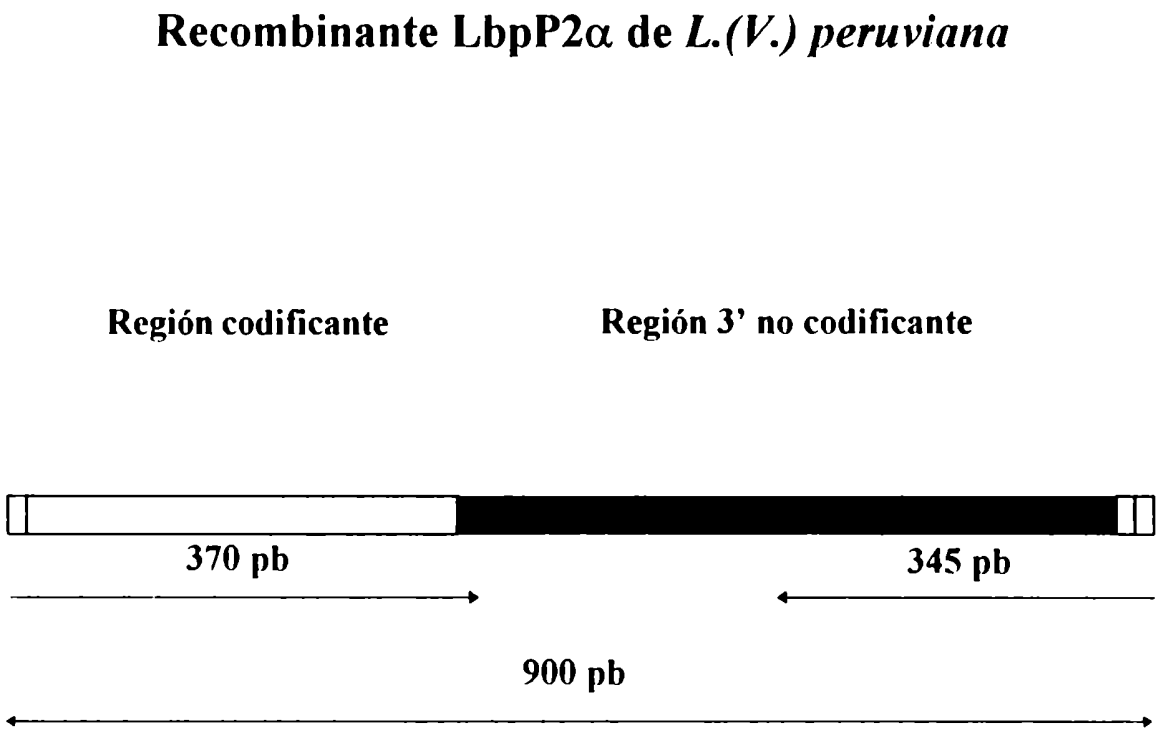


Fig 29 Estrategia de secuenciación del recombinante LbpP2α de *L.(V.) peruviana*

Las áreas claras corresponden a la secuencia del adaptor usado en el clonado. El área punteada clara corresponde a la región codificante. El área negra corresponde a la región 3' no codificante. El área gris corresponde a la cola de poly-A. Las flechas indican la región secuenciada y la flecha de dos cabezas indican el tamaño de las regiones codificante y 3' no codificante, respectivamente.

En la Fig. 30 se muestra la secuencia obtenida y en la Fig. 31 la comparación de aminoácidos de las proteínas P2α de *L.(V.) peruviana* (LbpP2α), de *L.(L.) infantum* (LiP'), de *T. cruzi* (TcP2α) y la P2 humana (Hs). El recombinante LbpP2α presenta la más alta homología con la proteína P2α de *L.(L.) infantum*, 95% (89% de identidad y 6% de cambios conservativos); con la de *T. cruzi*, 87% (74% de identidad y 13% de cambios conservativos) y con la humana, 65% (44% de identidad y 21% de cambios conservativos). Del análisis de la secuencia del recombinante LbpP2α se deduce además que el inserto entra en fase con la β-galactosidasa de λgt11, debiendo por lo tanto expresar una proteína de fusión β-galactosidasa-LbpP2α. Esto permite el subclonado directo del ADNc LbpP2α en el vector de expresión pGEX1λT.

GAATTCGAGGATCCGGGTACCATGG CG AAG TAC CTC GCC GCG TAC GCT CTG GCC TCC CTG

K Y L A A Y A L A S L

AGC AAG GCG TCC CCG TCG CAG GCG GAT GTG GAG GCG ATC TGC AGG GCC GTC CAC

S K A S P S Q A D V E A I C R A V H

ATC GAT GTC GAG AAG GAC ACC CTC TCC TTT GTG ATG GAG AGC GTT GCT GGA CGC

I D V E K D T L S F V M E S V A G R

GAC ATG GCC GCG CTG ATG GCG GAG GGT GCC GCG AAG ATG AGC GCG ATG CCG GCG

D M A A L M A E G A A K M S A M P A

GCC GGC TCT GGT GCC GCT GCT GGC GTC ACT GCT TCT GCT GCG GGT GCT GCA GCC

A G S G A A A G V T A S A A G A A A

CCG GTG GCC GCC GCG GCG AAG AAG GAG GAG CCC GAG GAG GAG GCG GAC GAT GAC

P V A A A A K K E E P E E E A D D D

ATG GGC TTC GGT CTC TTC GAC TAA GCAGCGCACCTTTAGC..(#).CCGTTGCAATCACGCTG

M G F G L F D *

TGTGCAGATGTGTGTAGAATACGACGAGCCTTGCGCAGCAGAGAACTCAGAAAGTGTACGACACATGCACAC

AGAGGAGAATGCATGGATGAGAGAACGAGGTGTCGCTGTCTTCATCCCACTCTGCCCATTCTCCTCCGCGTC

TGCCTGCGTCCTTTTGATTTTTCTTTTACTTTGTCTTTGGCCACTGTTTCCGTCAATGACAGCAGCACACGC

GCGCGACACGCACCACATCCGTCCCCTCCACTCGCGCGTGTGTGTGTGTGCCGCTGTGCACTCGCCTCACCT

CGAAAAAAAAAAAAAA CCATGGTACCCGGATCCTCGAATTC

Fig. 30 Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del recombinante LbpP2α de *L.(V.) peruviana*
La secuencia del adaptador usado en el clonado está subrayado.
región no secuenciada.
* codón de terminación.

```
Lbp       K Y L A A Y A L A S L S K - A S P S Q A D V E A I
Li  M S T . . . . . . . . . . . . . - . . . . . . . . . .
Tc  . . M . . . . . . . . . . . N . - P T . G A . . . . . .
Hs      M R . V . S . L . . A . G G N S . . . A K . I K K .

Lbp C K A V H I D V E K D T L S F V M E S V A G R D M A A L
Li  . . . . . . . . D Q A . . A . . . . . . T . . . V . T .
Tc  . . . C G . E . . S . A . . . . . . . I . . . S V . T .
Hs  L D S . G . E A D D . R . N K . I S E L N . K N I E D V

Lbp M A E G A A K M S A M P A A G S G A A A G V T A S - - -
Li  I . . . . . . . . . . . . . . S . . . . . . . . . - - -
Tc  V . . . . . . . . . . V A V S A A P - . . . D - . A A P A
Hs  I . Q . I G . L A S V . . G . A V . V S A A P G . - - -

Lbp - - A A G A A A P V A A A A - - K K E E P - - - E E E A
Li  - - . . . D . . . A . . . . . - - . . D . . - - - . . . .
Tc  A A . G . . . . . A . . D . - - . . . . - - - - - - . . E
Hs  - - . . P . . G S A P . . . E E . . D . K K E E S . . S

Lbp D D D M G F G L F D
Li
Tc
Hs
```

Fig. 31 Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas ribosomales P2α de *L.(V.) peruviana* (Lbp), *L.(L.) infantum* (Li), *T. cruzi* (Tc) y humana (Hs). Los puntos indican aminoácidos idénticos. Los guiones se introdujeron para permitir un mejor alineamiento de las secuencias.

4.4.1.2) Proteína ribosomal P2β de *L.(V.) peruviana*

Con el ADNc del gen de la proteína ribosomal P2β de *L.(L.) infantum* se aisló el ADNc de la proteína ribosomal P2β de *L.(V.) peruviana*. El esquema de secuenciación se detalla en la Fig. 32.

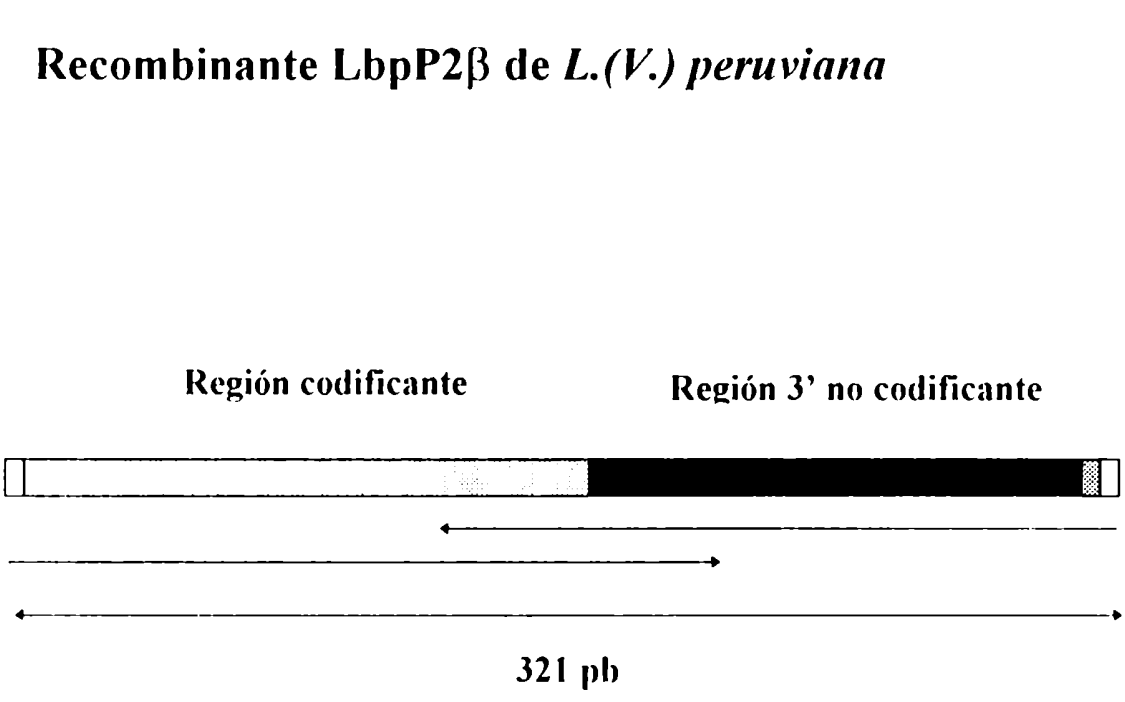


Fig. 32 Estrategia de secuenciación del recombinante LbpP2β de *L.(V.) peruviana*

Las áreas claras corresponden a la secuencia del adaptor usado en el clonado. El área punteada clara corresponde a la región codificante. El área negra corresponde a la región 3' no codificante. El área gris corresponde a la cola de poly-A. Las flechas indican la región secuenciada y la flecha de dos cabezas indican el tamaño de las regiones codificante y 3' no codificante respectivamente

En la Fig. 33 se muestra la secuencia nucleotídica y de aminoácidos del recombinante LbpP2β. Este recombinante consta de un ADNc de 341 pb, presentando un marco de lectura abierto de 144 pb que codifican los 47 últimos aminoácidos C-terminales de la proteína ribosomal de tipo P2β de *L.(V.) peruviana*. Las restantes 197 pb corresponden a la región 3' no codificante.

```
GAATTCGAGGATCCGGGTACCATGG C TCA AAG CTG GTG GGG TCT GGC TCT
                            S   K   L   V   G   S   G   S

GCC GCT CCG GCT GCC GCT GCC TCC ACT GCC GGC ACC GGC GTC GCC
 A   A   P   A   A   A   A   S   T   A   G   T   G   V   A

GCG GTG GCC GAT GCG AAG AAG GAG GCG TCG GAG GAG GAG GCC GAC
 A   V   A   D   A   K   K   E   A   S   E   E   E   A   D

GAT GAC ATG GGC TTC GGC CTG TTC GAC TAA GCGTTACACTGGCTAGGCCG
 D   D   M   G   F   G   L   F   D   *

TCGCACGCTTCTGCCGGGGAGCTGTCAGGTGTCTGTTCTTGTTGTAGCCGTCTGTCGTAT

CCTTGTTTCTTCGGTATGGAGGATTTTTCATTTCAAAAAAAAAAAA CCATGGTACCCGG

ATCCTCGAATTC
```

Fig. 33 Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del recombinante LbpP2β de *L.(V.) peruviana*. La secuencia del adaptador usado en el clonado está subrayado. * codón de terminación.

Al analizar la secuencia de nucleótidos de este recombinante observamos que no entra en fase con la β-galactosidasa del vector λgt11. Por lo tanto, no se subclonó en pGEX1λT.

En la Fig. 34 se muestra la comparación de aminoácidos de esta proteína P2β con *L.(L.) infantum* (LiP), *T. cruzi* (TcP2β), *T. brucei* (TbP2β) y humana (Hs). La comparación con la de *L.(L.) infantum* muestra una homología de 90% (81% de identidad y 9% de cambios conservativos), con la de *T. cruzi* muestra un 86% (78% de identidad y 8% de cambios conservativos), con la de *T. brucei* muestra un 78% (66% de identidad y 12% de cambios conservativos) y con la humana un 73% (59% de identidad y 14% de cambios conservativos).

```
Li   M Q Y L A A Y A L V A L S G - K T P S K A D V Q A V L K

Tc   . K . . . . . . . . G . . . - G . . . . S A . E . . . .
Tb   . K . . . . . . . I S . . . - . . . . . . . E . . . .
Hs   . R . V . S . L . A . . G . N S S . . A K . I K K I . D

Li   A A G V A V D A S R V D A V F Q E V E G K S F D A L V A
Tc     . . . P . . P . . . . . L . A . F A . . D E . T V C T
Tb   . . . . P . . S . . . E E L L S . . . . . D . . . . C .
Hs   S V . I E A . D D . L N K . I S . L N . . N I E D V I .

Lbp        S K L V G S G - - - S - A A P - A A A A S T - A G
Li   E G R T . . . . . - - - - . - . . . - . G . V . . - . .
Tc   . . K . . . . - G . V T R - - - - - . - N . . - - . - . S
Tb   . . K A . . . - G . V T A G G . . . S G . . . A H A . A
Hs   Q . I G . . A S V P A G G A V . V S A . P G S A A P . A

Lbp  T - G V A A V - - - - - A D A K K E A S - E E E A D D D
Li   A - . A G . . - - - - - - . E . . . . E P E . . . . . .
Tc   A P T A . . A A S S G A . A P - - A . A A . . . E . . .
Tb   A S A P . . A - - - - A . . . - - - - - - - . . . D . . .
Hs   G S A P . . A E E K K - D E - . . . E - - S . . S . . .

Lbp  M G F G L F D
L.i  . . . . . .
T.c  . . . . . .
T.b  . . . . . .
H.s  .   . . . . .
```

Fig. 34 Comparación de las secuencias aminoacídicas de las proteínas ribosomales P2β de *L.(V.) peruviana* (Lbp), *L.(L.) infantum* (Li), *T. cruzi* (Tc), *T. brucei* (Tb) y humana (Hs). Los puntos indican aminoácidos idénticos. Los guiones se introdujeron para permitir un mejor alineamiento de las secuencias.

4.4.1.3) Proteína ribosomal P2β de *L.(V.) braziliensis*: Una proteína ribosomal que rompe un dogma

Al rastrear la biblioteca de expresión de *L.(V.) braziliensis* con la sonda P2α de *L.(L.) infantum* se obtuvo un fago recombinante (LbbP2β). El esquema de secuenciación se presenta en la Fig. 35.

Recombinante LbbP2β de *L.(V.) braziliensis*

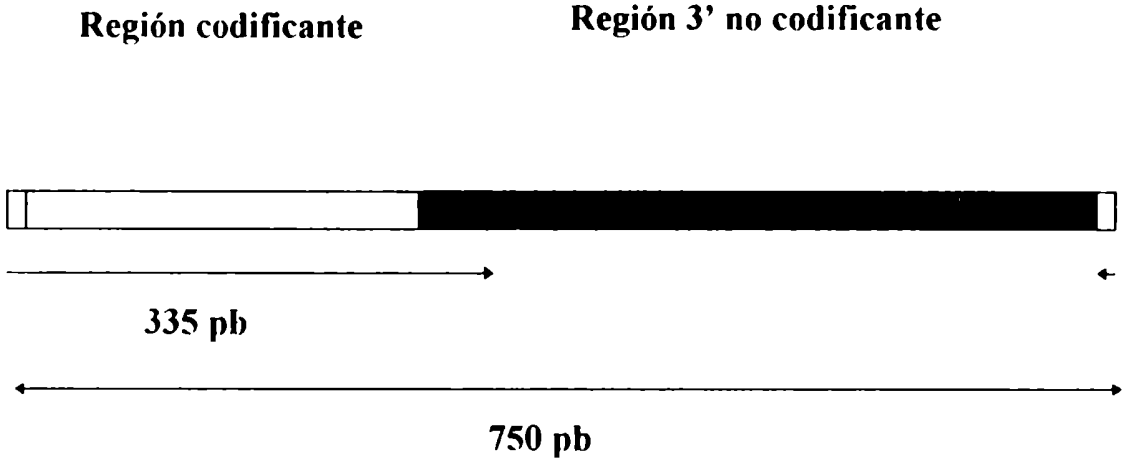


Fig. 35 Estrategia de secuenciación del recombinante LbbP2β de *L.(V.) braziliensis*

Las áreas claras corresponden a la secuencia del adaptor usado en el clonado. El área punteada clara corresponde a la región codificante. El área negra corresponde a la región 3' no codificante. El área gris corresponde a la cola de poly-A. Las flechas indican la región secuenciada y la flecha de dos cabezas indican el tamaño de las regiones codificante y 3' no codificante respectivamente.

En la Fig. 36 observamos su secuencia nucleotídica y de aminoácidos del clon LbbP2β. El recombinante tiene un inserto de 750 pb, con un marco de lectura abierto de 264 pb que codifica los 87 aminoácidos C-terminales. Los restantes 486 pb. corresponden a la región 3' no codificante, incluyendo la cola de poly-A. De la secuencia nucleotídica se deduce que este recombinante entra en fase con la β-galactosidasa. Por lo tanto, se subclonó en el vector de expresión pGEX1λT.

```
GAATTCGAGGATCCGGGTACCATGG TG CCC ACC TCG GCC GAG AAC ATC GCC
                                P   T   S   A   E   N   I   A

GCG GCA GTG AAG GCT GCC GGC GTG AGT GTA CGC CCC ACC ATG CCC
 A   A   V   K   A   A   G   V   S   V   R   P   T   M   P

ATC ATC TTT GCC CGC TTC CTG GAG AAG AAG TCT GTG GAG GCG CTG
 I   I   F   A   R   F   L   E   K   K   S   V   E   A   L

ATG GCA GCG GCT GCC ACG CAA GCC CCG ACG GCC ACG TCT GCC GCG
 M   A   A   A   A   T   Q   A   P   T   A   T   S   A   A

GCG GCG CCA GCT GCC GGG GAA GCG AGC GGC AAG GCG GAG GAG AAG
 A   A   P   A   A   G   E   A   S   G   K   A   E   E   K

AAG AAG GAG GAG CCC GAG GAG GAG GGC GAT GAC GAC ATG GGC TTC
 K   K   E   E   P   E   E   E   G   D   D   D   M   G   F

GGT CTG TTC GAC TAA AGCGTCCCGCACAGAGGCTCACACACGCAGGCGCATCGTT
 G   L   F   D   *

GTCT...(#). . . . . .  CCATGGTACCCGGATCCTCGAATTC
```

Fig. 36 Secuencia nucleotídica y de aminoácidos del recombinante LbbP2β de *L.(V.) braziliensis*
La secuencia del adaptador usado en el clonado está subrayado.
región no secuenciada.
* codón de terminación.

Cuando se comparan las secuencias de aminoácidos del recombinante LbbP2β con LbpP2β se observa sólo 72% de homología (52% de identidad y 20% de cambios conservativos). Con la de *L.(L.) infantum* la homología es de 69% (49% de identidad y 20% de cambios conservativos). Con la *T. cruzi* la homología es de 53% (31% de identidad y 22% de cambios conservativos). Con la de *T. brucei* la homología es de 58% (38% de identidad y 20% de cambios conservativos). Con la P2 humana la homología es de 64% (35% de identidad y 29% de cambios conservativos) (Fig. 37).

```
Lbb                     P T - S A E N I A A A - - V - K A - A - G V S V R
Li   M Q Y L A A Y A L V A L . G - - - - - - K T P S . . D V Q A . - L K
Tc   M K Y L A A Y A L V G . . G - - - - - - G T P S . S A V E A . - L K
Tb   M K Y L A A Y A L I S . . G - - - - - - - . T P S . . D V E A . - L K
Hs   M R Y V A S Y L L A A . G G - . - - - - S S P S A K D I K K I - L D

Lbb  P T M - P I I - F A R F - - L - - E - - K - K S V - - - - - E - - A
Li   A - A G V A V D A S . V D A V F Q . V E - G . S F D A L V A . G R T
Lbp                                                                  S
Tc   A - A G V P V D P S . V D A . F A . F A - G . D E D A L V A . G R T
Tb   A - A G V P V D S S . V E E . L S . V E - G . D F D T V C T . G K S
Hs   S - V G I E A D D D . L N K V I S . L N - G . N I E D V I A Q G I G

Lbb  - . M - A A A - A T Q A - P T A - - - T S A A A A P A A G E A - - S
Lbp  K . V G S G - - - S - . A . - . A A A S T - . G T - G V A - . V - -
Li   K . V G S G - - - S - . A . - . G A V S T - . G . - G . . - . V - -
Tc   K . V - G G V T R - - - - - . - N A A - - T - . S . . T . A - . A A .
Tb   K . V - G G V T A G G . A . S G A A A A H . . . . S . P A - . A - -
Hs   K . A S V P . G G A V . V S A . P G S A A P . . G S . P A - . A E E

Lbb  G K A E E - - - K K K E E P - - E E E G D D D M G F G L F D
Lbp  - - - - - - A D A - . . . - A S - . . . A . . . . . . . . .
Li   - - - - - - A E A - . . . . P - E . . . A . . . . . . . . .
Tc   S G . - - A A P - - - A A A - A . . . E . . . . . . . . . .
Tb   - - . - - A D A - - - - - - - - - . . . D . . . . . . . . .
Hs   K . - - - D E - - . . . . . - - - S . . S . . . . . . . . .
```

Fig. 37 Comparación de las secuencias de aminoácidos de las proteínas ribosomales P2β de *L.(V.) braziliensis* (Lbb) con las de *L.(V.) peruviana* (Lbp), *L.(L.) infantum* (Li), *T. cruzi* (Tc), *T. brucei* (Tb) y la humana (Hs). Los puntos indican aminoácidos idénticos. Los guiones se introdujeron para permitir un mejor alineamiento de las secuencias.

Este recombinante posee el dominio C-terminal típico de las proteínas ribosomales P de *Leishmania* sp., pero con cambios importantes y llamativos. La comparación de la Fig. 37 revela que es una proteína ribosomal ácida atípica.

Las características distintivas son:

a) Mientras las proteínas ribosomales ácidas de *Leishmania* sp contienen a 11 aminoácidos del extremo C-terminal una Ala (A), en el recombinante LbbP2β se encuentra un residuo de Gly (G), hecho inusual si se tiene en cuenta la conservación de esta posición entre *T. cruzi* y *T. brucei* y entre especies tan distantes evolutivamente como levadura, humano y rata.
b) Presenta motivos que no se encuentran en ninguna de las proteínas ribosomales P descriptas hasta la fecha.

4.4.2) Antigenicidad de las proteínas ribosomales P2α de *L.(V.) peruviana* y P2β de *L. (V.) braziliensis*

El análisis de la respuesta humoral de los sueros de pacientes con las distintas formas clínicas de Leishmaniasis determinada por EPL (ver 5.7.2), además de incluir los recombinantes correspondientes a las hsp70 tanto de *T. cruzi* (RA1), *L.(V.) peruviana* (U4) y *L.(V.) braziliensis* (Lbb1), también incluían los recombinantes LbpP2α y LbbP2β. Los resultados del ensayo demostraron que 4 de los 45 sueros (9%) LMC analizados reaccionan claramente con los recombinantes LbpP2α y LbbP2β (otros 10 sueros presentan reacciones dudosas que fueron inicialmente interpretadas como negativas; este resultado se encuentra actualmente en proceso de reconsideración). En la Figs. 38 y 39 se muestran las reacciones típicas de los sueros mencionados con los diferentes recombinantes P por EPL.

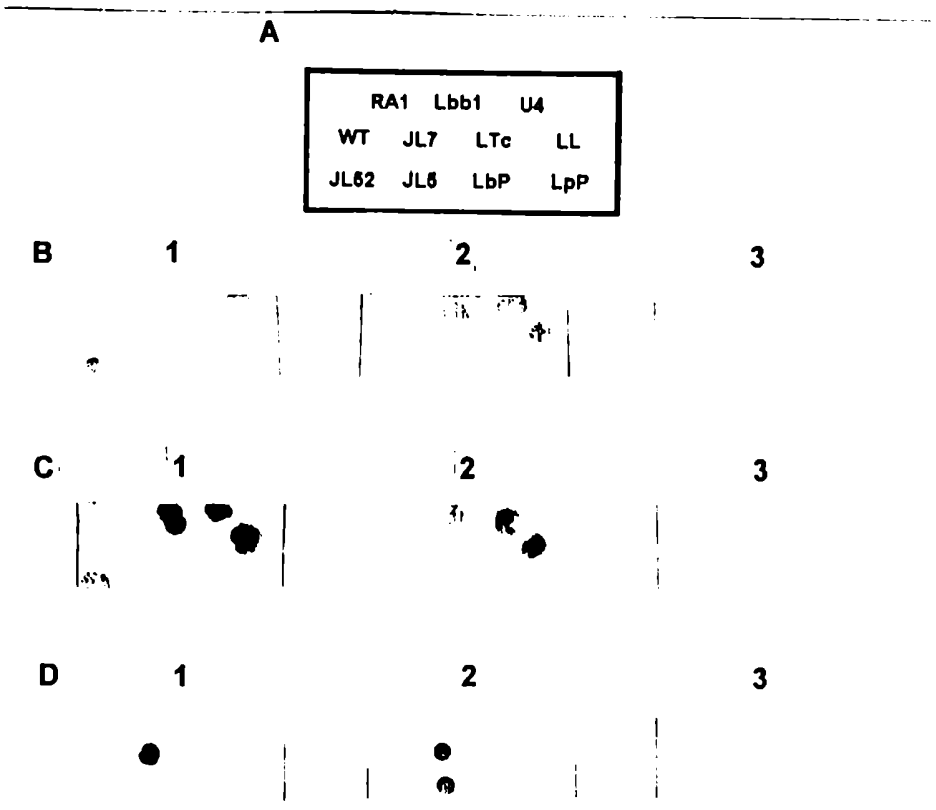


Fig. 38 Reactividad de los sueros LMC y ECh con los recombinantes LbpP2α, LbbP2β, JL5, Tc C-P0, JL7, RA 1, U4 y Lbb1 por EPL.

A) Diagrama de la ubicación de los fagos recombinantes.
B) Reactividad de los sueros LMC: 147, 931 y QI
C) Reactividad de los sueros LMC: 165, 625 y RD.
D) Reactividad de los sueros ECh: P6, VC y ZA.

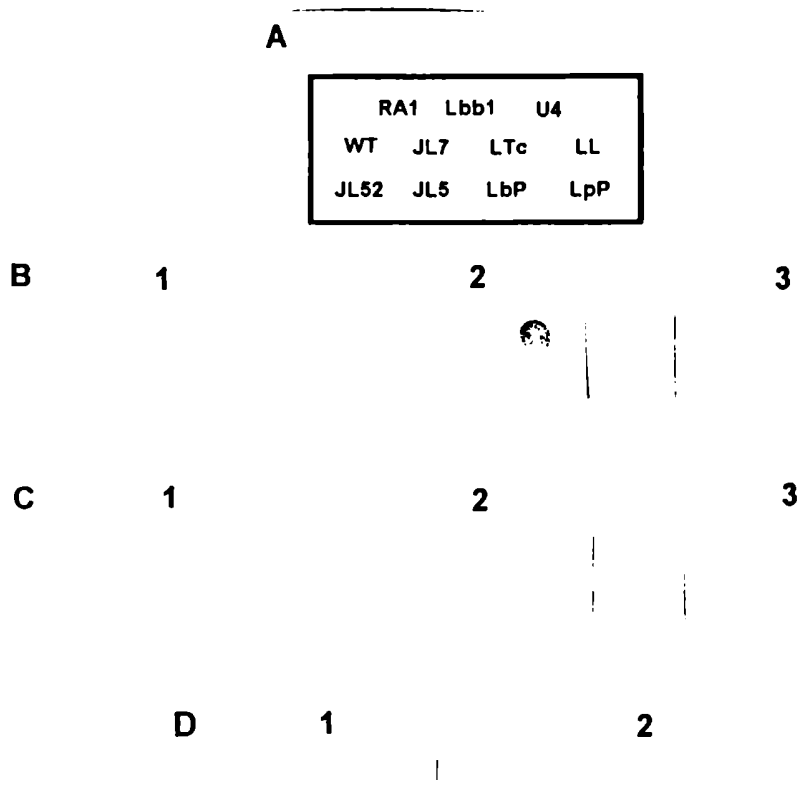


Fig. 39 Reactividad de los sueros LMC, IM, con Lepra, Malaria, TBC, LES normal por EPL.

A) Diagrama de la ubicación de los fagos recombinantes.
B) suero LMC, 147 (1), suero IM, FR (2) y suero LMC, RD (3).
C) sueros de enfermedades no relacionadas: suero de paciente con Lepra, LE 56 (1), Malaria, MA 12 (2) y Tuberculosis, TBC 172 (3).
D) Reactividad de un suero normal 32 (1) y con LES (2).

Los sueros de LMC también reconocen la proteína P0 de *T. cruzi* como se demuestra en EPL usando antígeno la proteína Tc C-P0, hecho que identifica otro antígeno compartido, la proteína P0 de *Leishmania* spp. (ver Fig. Tabla 10 y Apéndice).

Tabla 10.

Prevalencia de sueros humanos que reconocen los antígenos recombinantes LbpP2α, LbbP2β, JL5 y JL52.

	LpP		LbP		JL5		Tc C-P0	
	+	%	+	%	+	%	+	%
LCA (N=13)	0	0	0	0	0	0	1	7,7
LCS (N=12)	0	0	0	0	0	0	0	0
LMC (N=45)	3	6,7	2	4,5	0	0	15	33
IM (N=6)	1	17	0	0	2	33	2	33

LpP: LbpP2α
LbP: LbbP2β

Como ya indicamos, el análisis de la secuencia nucleotídica nos permitió observar que de los 3 recombinantes de las proteínas ribosomales de tipo P2 de *Leishmania* sp. sólo 2, LbpP2α y LbbP2β, podían ser subclonados directamente en pGEX1λT.
La Fig. 40 muestra los plásmidos recombinantes obtenidos luego del subclonado.

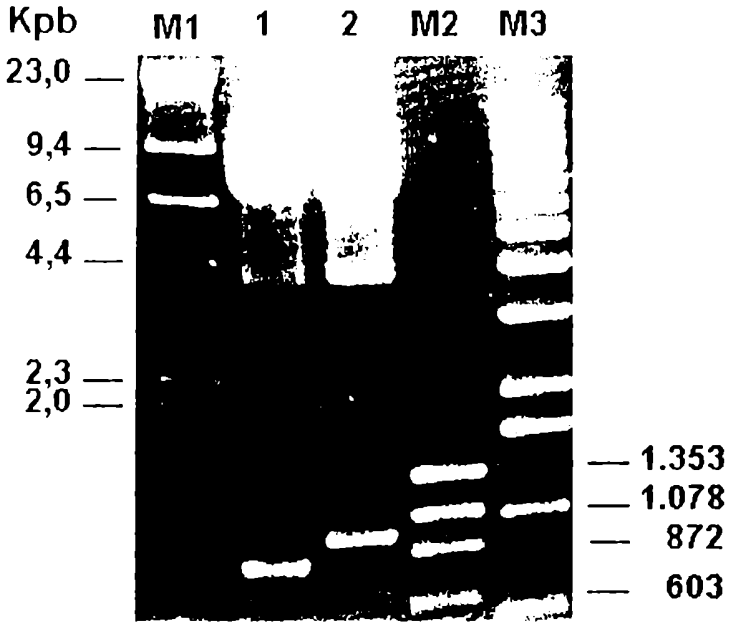


Fig. 40. Subclonado de los ADNc de LbpP2α y LbbP2β en pGEX1λT.

Se prepararon plásmidos a partir de los subclones recombinantes. Para verificar la presencia del inserto se digirió con Eco RI y los fragmentos se resolvieron por electroforesis en gel de agarosa (1%).
M1: λ/Hind III; M2: ϕx-174/Hae III; M3: 1 Kb ladder; calle 1: pLbpP2α/Eco RI; calle 2: pLbbP2β/Eco RI

Una vez subclonados ambos ADNc, se confirmó la expresión de ambas proteínas. Las proteínas purificadas por cromatografía de afinidad con glutatión-agarosa fueron analizadas por Western blot con un suero de un paciente con LMC (147) que tenía altos títulos de anticuerpos contra las 2 proteínas ribosomales de tipo P2 de *Leishmania* sp (resultados no mostrados).
Con el objeto de confirmar los resultados observados en EPL, se realizó un ELISA usando las proteínas recombinantes LbpP2α y TcP2β como antígeno.

Se analizaron 3 sueros de pacientes con LMC que reaccionaban con las proteínas ribosomales de tipo P2 de *Leishmania* spp (Fig. 41).

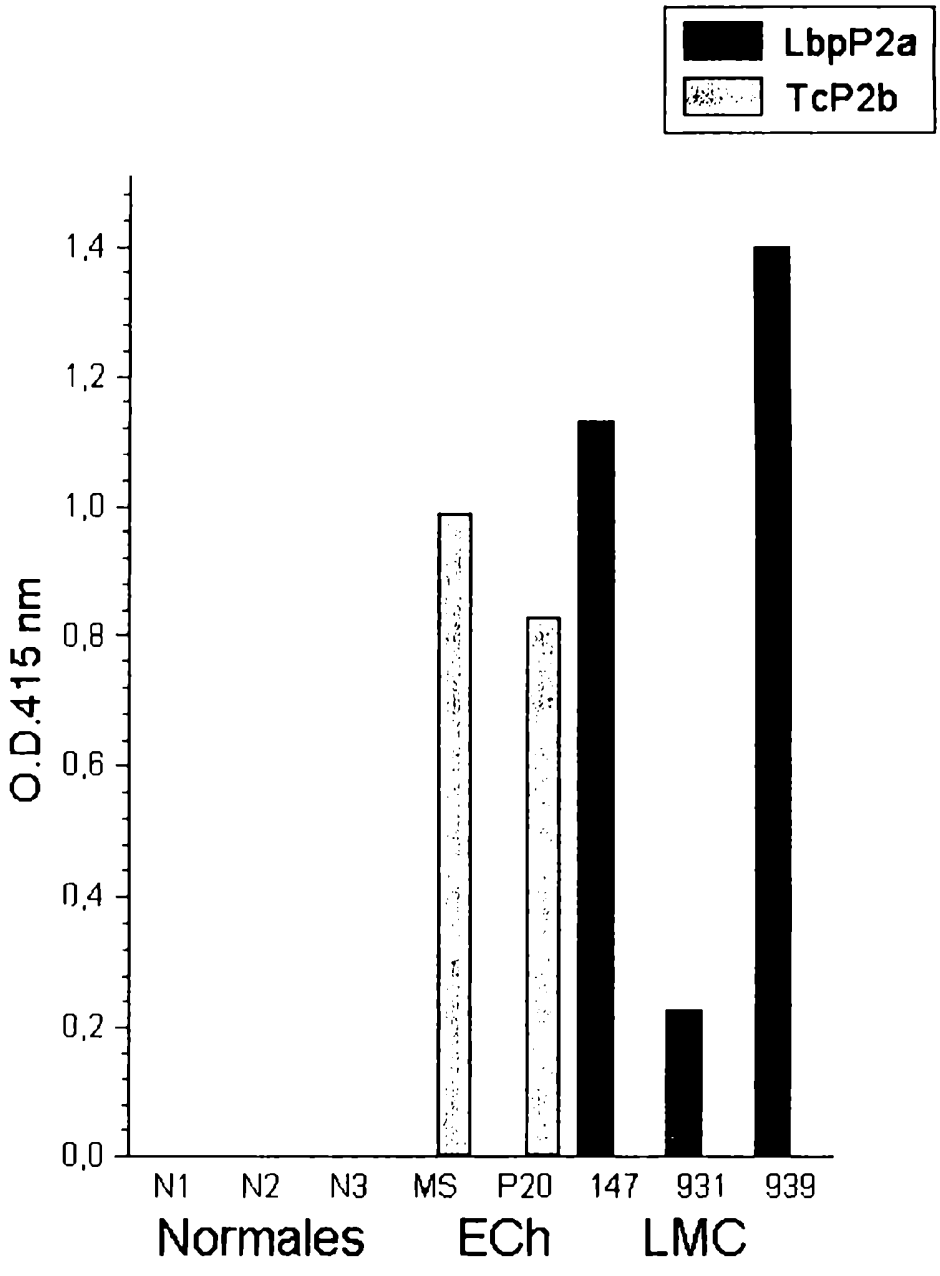


Fig. 41 Reactividad de sueros LMC y ECh con las proteínas recombinantes LbpP2α y TcP2β por ELISA.

Se cubrieron placas de ELISA con las proteínas recombinantes LbpP2α y TcP2β y se evaluaron 3 sueros normales (N1, N2 y N3), dos sueros ECh (MS y P20) y tres sueros LMC (147, 931 y 939).

Finalmente, se seleccionó el suero de un paciente con LMC (147) que presentaba altos títulos de anticuerpos contra las proteínas ribosomales de tipo P2 de *Leishmania* sp. (LbpP2α y LbbP2β) para realizar experiencias de competición con péptidos sintéticos y proteínas recombinantes de las proteínas ribosomales de tipo P2 de *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis*. Los resultados de la experiencia de competición se muestran en la Fig. 34 y 35, donde observamos que para ambas proteínas ribosomales de tipo P2 de *Leishmania* sp. (recombinantes LbpP2α y LbbP2β), la reacción sólo se inhibe incubando con la proteína recombinante entera. Sin embargo, esto no ocurre cuando se compite con péptidos sintéticos correspondiente a los 13 últimos aminoácidos C-terminales de las proteínas ribosomales de tipo P2 de *T. cruzi* (R-13) y de *Leishmania* sp. (L-13), indicando que el epítope inmunodominante en Leishmaniasis no se localiza en el extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P2.

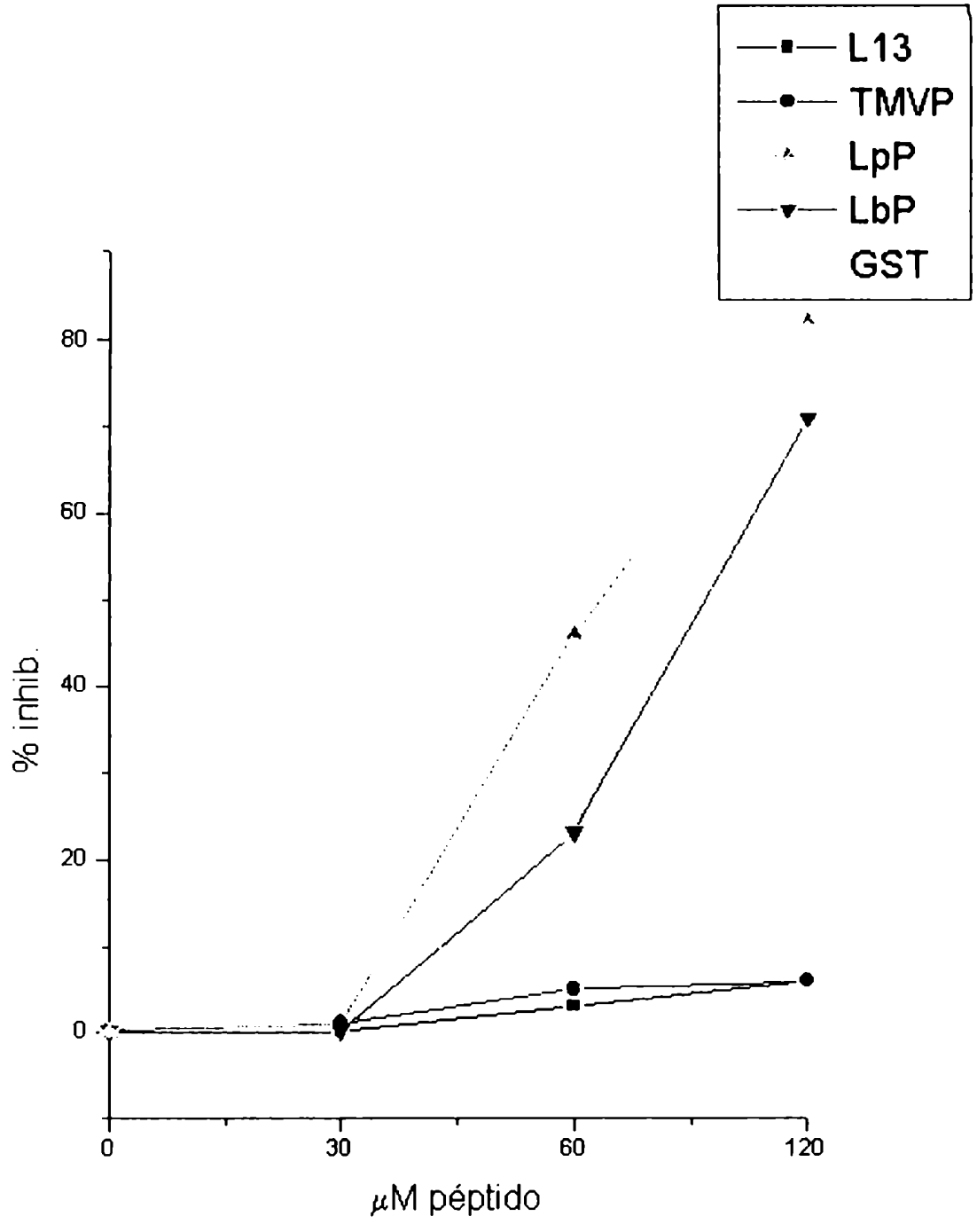


Fig. 34 Competición de la reactividad anti-LbpP2α con el suero LMC, con las proteínas de fusión LbpP2α, LbbP2β, LiP2a, GST y los péptidos TMVP y L13 por ELISA.

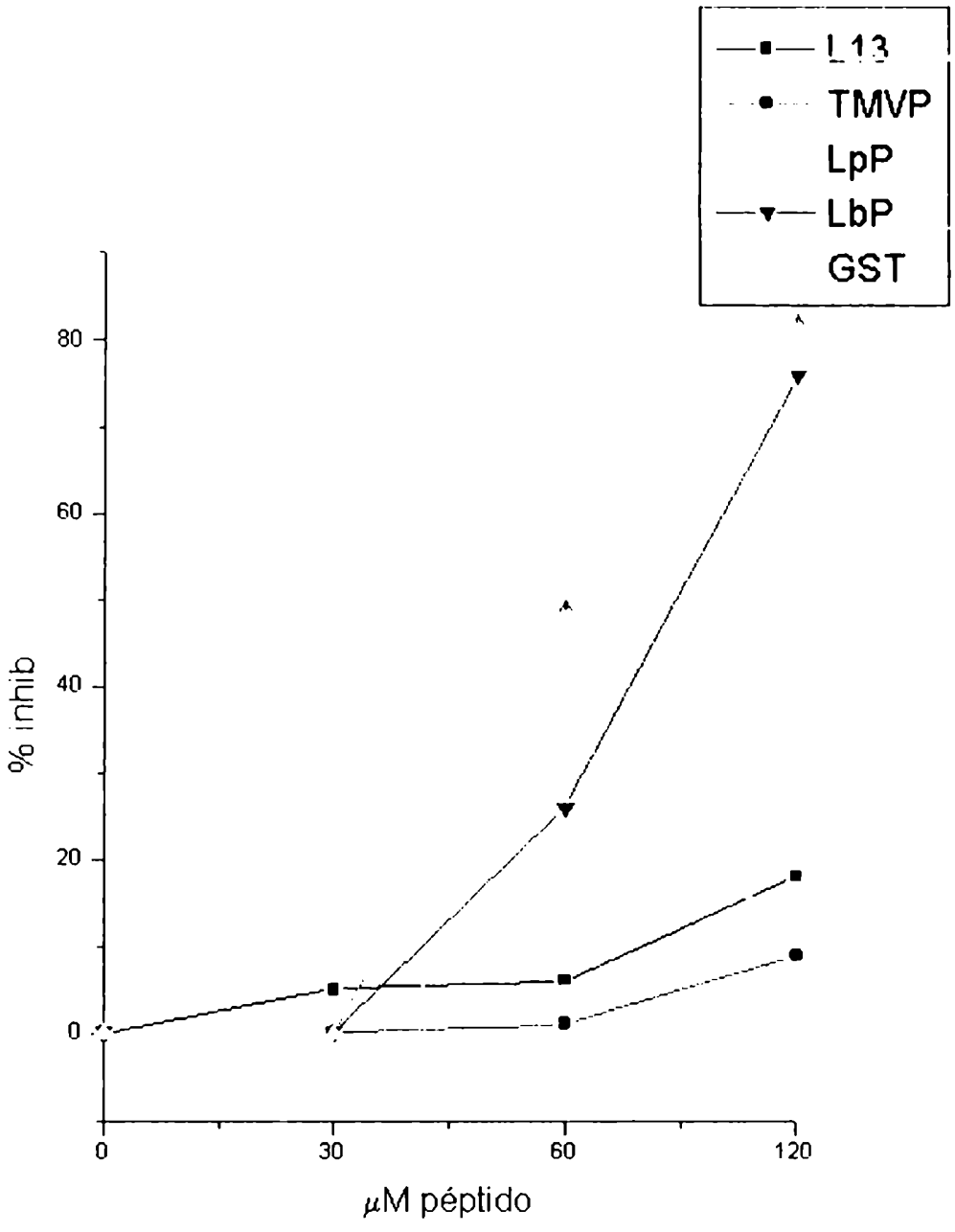


Fig. 35 Competición de la reactividad anti-LbpP2β con el suero LMC, con las proteínas de fusión LbpP2α, LbbP2β, LiP2a, GST y los péptidos TMVP y L13 por ELISA.

DISCUSIÓN

5.1) La respuesta humoral

Una primera evaluación de la repuesta humoral en pacientes infectados por *Leishmania* sp. (Figs.1-4) demuestra que las Leishmaniasis más frecuentes en territorio peruano puede clasificarse en dos grupos: El primer grupo (I) está formado por las Leishmaniasis que presentan una respuesta humoral débil contra el parásito: LCA y LCS. Estos enfermos se caracterizan por haber tenido un contacto relativamente reciente con el parásito. El segundo grupo (II) incluye sólo los pacientes con LMC, pacientes todos ellos con un largo y en muchos casos documentado contacto con el parásito. En ellos la respuesta humoral es muy intensa y abarca la mayoría de los antígenos parasitarios (Fig. 1C).

El análisis de Western blot de ambos grupos revela que lo que los diferencia es la intensidad de reconocimiento de las proteínas parasitarias, ya que en ambos casos el espectro de proteínas que se reconoce es similar. Varía la intensidad. Así, la mayor intensidad de la respuesta humoral se asocia con los síntomas más severos de la enfermedad, esto es, con las formas metastásicas mucocutáneas (LMC). Datos de otros autores coinciden con esta observación. En 1980, Anthony y col., basándose en un estudio sobre la presencia de anticuerpos antiparásito en pacientes con Leishmaniasis cutánea y Leishmaniasis mucocutánea, proponen que la intensidad de la respuesta humoral está relacionada con la severidad de los síntomas clínicos. Si bien existe un consenso generalizado sobre una respuesta humoral más intensa en LMC, existen discrepancias en los niveles de anticuerpos anti-Leishmania medidos. Mientras Carvalho y col. (1995) observan en experiencias de ELISA absorbancias del orden de 0,1 con sueros LMC diluidos 1:100, nosotros determinamos por Western blot una intensa reacción antiparásito con diluciones 1:20.000 (Figs. 3 y 4). Esta intensidad de respuesta que se detectó en 2 sueros LMC (143 y 145), no ha sido descripta previamente.

En LMC junto con la respuesta humoral se registra una fuerte respuesta inmune mediada por células (Walton y col., 1972; Ridley y col., 1980; Castes y col., 1984).

5.2) Parásito y respuesta humoral

Uno de los temas más arduamente discutidos en los últimos años es el rol del agente infeccioso en: a) la inducción y modulación de la respuesta inmunológica contra la infección, y b) su participación en la génesis de las lesiones tisulares.

Mientras que una serie de investigadores presentan evidencias que demuestran que la respuesta está dirigida directamente contra el agente infeccioso presente en el sitio de la lesión (Walton y col., 1972; Anthony y col., 1980; Ridley y col., 1980; Mauel y Behin, 1987; Grimaldi Jr. y Tesh, 1993; Convit y col., 1993; Carvalho y col., 1995; Milon y col., 1995), otro grupo de investigadores insiste en la naturaleza autoinmune de las lesiones y los cuadros clínicos característicos de las diversas infecciones (Galvao Castro y col., 1984; Argov y col., 1989; Lamb y col., 1989).

En el marco de esta controversia es importante mencionar que el presente trabajo se realizó con muestras de suero de pacientes leishmánicos con lesiones activas en las que se detectó parásito (ver Materiales y Métodos). Esta observación en las lesiones de LCS y LMC es clásica (Grimaldi y McMahon-Pratt, 1991). También el parásito se detecta por PCR sobre ADN obtenido de biopsias de lesiones humanas (López y col., 1993). De modo que, en los casos que estudiamos, los niveles de anticuerpos contra el parásito representan el reconocimiento del agente infeccioso por el sistema inmunitario (agente presente en la lesión activa). Así, en pacientes del grupo I (LCA Y LCS) el parásito se encuentra en un entorno distinto al que se plantea para LMC (grupo II). El entorno en la primera infección se caracteriza por tener temperaturas más bajas y un determinado tipo de macrófagos, diferentes a los de la lesión metastásica. Así, las diferencias en la intensidad de respuesta inmune pueden deberse a un procesamiento antigénico diferente en uno y otro caso.

La hipótesis autoinmune parece menos probable, por lo menos desde el punto de vista humoral. En efecto, Levy-Yeyati (tesis doctoral, 1992) demostró que anticuerpos aislados de pacientes con LMC no reconocen proteínas propias (mamíferas).

5.2.1) Reactividad anti-HSP70

Las experiencias de los Western blot de extracto total de parásitos demuestran que si bien todo el espectro de proteínas parasitarias son reconocidas por el sistema inmune del hospedador, existe un blanco predominante: la proteína HSP70 (Figs. 1-4). Este rasgo acompaña la reactividad antiparásito. Consecuentemente, son los pacientes del grupo I los que reconocen menos intensamente la HSP70 (Fig. 1 A).

La presencia de una reacción cruzada anti-HSP70 entre pacientes del grupo I (LCA y LCS) y del grupo II (LMC) confirma que la respuesta humoral en ambas formas clínicas de Leishmaniasis no depende de la diferente antigenicidad de las proteínas de las dos especies de parásitos (Fig. 1B), sino más bien de las diferencias en la forma en que se reconoce y responde al parásito. Esta respuesta anti-HSP70 es típica de la infección con *Leishmania* sp. y sienta las bases para intentar una serología específica de Leishmaniasis. En efecto, si bien pudimos detectar reacción cruzada con U4 en sueros de pacientes con Malaria y Lepra lepromatosa, estas reacciones se dieron en pocos sueros y fueron débiles (Apéndice).

Los pacientes chagásicos crónicos desarrollan una fuerte respuesta humoral contra antígenos de *T. cruzi*, pero a diferencia de lo observado para Leishmaniasis (LCA, LCS y LMC) la proteína de 70 kDa no es el mayor blanco antigénico de la respuesta contra el parásito (Fig. 1A).

La inmunodominancia de HSP70 en Leishmaniasis podría estar relacionada con: a) la particular forma en que los epítopes son procesados y presentados por las células presentadoras de antígenos, y/o b) el hecho de encontrarse las células parasitarias en estado de choque térmico (inducción de HSP70).

En ECh la situación es distinta. *T. cruzi* también se encuentra en el hospedador humano en condiciones de choque térmico. Sin embargo, HSP70 no es inmunodominante.

Claramente, estos parásitos (*Leishmania* sp. y *T. cruzi*) involucran diferentes componentes del sistema inmunológico en la respuesta contra cada uno de ellos. Justamente, la diferencia en la manera en que el parásito es encarado por el organismo, provee las bases para diferenciarlos serológicamente.

5.3) Leishmaniasis-Enfermedad de Chagas: Diferenciación serológica

Como se describe en Resultados, los pacientes leishmánicos se caracterizan por presentar una mayor o menor reacción inmunológica contra la HSP70 parasitaria, mientras que un típico paciente chagásico reconoce JL7, una proteína flagelar (Cotrim y col., 1995) (Fig. 17 A, B, C y E). Esto se observa en el ensayo EPL, Fig. 17, Tablas 6 y 7, y Apéndice.

Tomando en conjunto ELISA y EPL con el recombinante U4 como reactivo diagnóstico de las distintas formas clínica de Leishmaniasis, observamos que para el grupo LCA, se obtiene un mejor diagnóstico por ELISA que por EPL. Mientras que para LCS y LMC, un mejor y más seguro diagnóstico de la enfermedad se logra mediante el uso conjunto del ELISA y EPL. Las causas de este tipo de reacción con los diferentes ensayos no es conocida aún, pero cambios en la sensibilidad de una reacción sobre diferentes soportes han sido frecuentemente observados (Moncayo y Luquetti, 1990).

En los ensayos por EPL y Western blot (Figs. 17 y 18, respectivamente) observamos una mayor reactividad de los sueros de pacientes con LCA, LCS y LMC con el recombinante U4 que con Lbb1. Esto es llamativo porque presentan secuencias semejantes (Fig. 11). Aún cuando U4 es más corto que Lbb1, es reconocido por un mayor número de sueros leishmánicos. Tal vez su menor tamaño permite a U4 plegarse en forma distinta a Lbb1 exponiendo en U4 regiones que se ocultan al reconocimiento en Lbb1.

Otra explicación de la diferencia entre U4 y Lbb1 podría basarse en una mayor producción de U4 que de Lbb1 en la célula bacteriana (EPL): esta teoría no se corresponde con la observación de que ambas placas de lisis (EPL de U4 y Lbb1) reaccionan por lo general con la misma intensidad con sueros que presentan niveles elevados de anticuerpos anti-HSP70 (Fig. 17D). Estos resultados también reflejan una fina diferencia estructural entre U4 y Lbb1.

El estudio de esta reactividad anti-HSP70 con los recombinantes U4/Lbb1 nos llevó a constatar que los pacientes con Leishmaniasis reconocen la HSP70 de *Leishmania* sp. y de *T. cruzi*, mientras que la respuesta anti-HSP70 en chagásicos no permite el reconocimiento de la HSP70 de *Leishmania* sp.

Este hecho puede tener dos explicaciones:

a) un simple problema de especificidad de reconocimiento, a saber, la presentación antigénica que opera en Leishmaniasis lleva a reconocer epítopes comunes entre *Leishmania* sp. y *T. cruzi*. Por el contrario, la forma en que es presentada la HSP70 en la enfermedad de Chagas no induce una reacción cruzada contra la proteína de *Leishmania sp.*

b) Sólo un problema de nivel, de diferencias en los niveles o intensidades de la respuesta inmune. Los altos títulos de anticuerpos desarrollados en Leishmaniasis permiten la detección de una población de anticuerpos que presentan reacción cruzada con la HSP70 de *T. cruzi*. Por el contrario, el bajo nivel de respuesta anti-HSP70 en ECh impide la detección de alguna población de anticuerpos con reacción cruzada contra la HSP70 de *Leishmania* sp.

Ambas hipótesis podrían explicar el fenómeno observado por EPL.

Los sueros de pacientes con LMC presentando una elevada reactividad anti-HSP70 reconocen más intensamente U4 que RA1 (ver ensayo EPL, Fig. 17). A su vez, los sueros de pacientes chagásicos no reconocen U4 o sólo lo hacen débilmente. El reactivo diagnóstico específico es JL7 y es reconocido exclusivamente por los sueros chagásicos y prácticamente no reconocido por los sueros leishmánicos (LCA, LCS y la mayoría LMC), salvo por un bajo porcentaje de sueros LMC (Fig. 18 E y Tabla 7) (Mesri E, tesis doctoral, 1990; Kaplan D, tesis doctoral, 1995, Cotrim y col., 1995).

5.4) Proteínas ribosomales P2 de *Leishmania* sp.

Los antígenos ribosomales P de *Leishmania* sp. y *T. cruzi* también pueden contribuir al diagnóstico serológico de ambas infecciones. Quizás también aquí se pongan de manifiesto las diferentes formas en que se procesan los antígenos de cada parásito.

La ventaja de las proteínas ribosomales P como reactivos de diagnóstico radica en su tamaño pequeño y en el hecho que el epítope fundamental ha sido localizado en la región C-terminal para ECh y LES, circunscripto a los últimos 13 aminoácidos (Tabla 1; Mesri y col., 1992; Levitus y col., 1991). Sin embargo, los resultados serológicos obtenidos en este estudio demuestran que en la Leishmaniasis la región C-terminal (péptido L-13) no es antigénica. Una posible causa de este reconocimiento diferencial

puede deberse a la diferente forma en que se procesa el antígeno, pero además a la diferencia entre L-13 (EE**A**DDDMGFGLFD) Y R-13 (EE**E**DDDMGFGLFD). En efecto, la secuencia de *Leishmania* sp. se parece a la humana (Tabla 1) y podría ser reconocida como propia por el sistema inmune.

Tabla 11.

Secuencia aminoacídica del extremo C-terminal de las proteínas ribosomales P de *Leishmania* sp, *Trypanosoma* sp y humanas.

Especie	Secuencia C-terminal	Referencia
L.(V.) peruviana P2α	EE **A** DDDMGFGLFD	esta tesis
L.(V.) peruviana P2β	EE **A** DDDMGFGLFD	esta tesis
L.(V.) braziliensis P2β	EE **G** DDDMGFGLFD	esta tesis
L.(L.) infantum P2α	EE **A** DDDMGFGLFD	Soto y col., 1993
L.(L.) infantum P2β	EE **A** DDDMGFGLFD	Soto y col., 1993
T. cruzi P2α	EE **E** DDDMGFGLFD	Vázquez y col., 1992
T. cruzi P2β	EE **E** DDDMGFGLFD	Schijman y col., 1990
T. brucei P2β	EE **E** DDDMGFGLFD	S. Kunz y N. Muller, com. personal
Humana P2	EE **S** DDDMGFGLFD	Rich y Steitz, 1987

Qué ventaja adaptativa presenta este cambio aminoacídico? Por qué razón en *T. cruzi* se selecciona una secuencia totalmente ácida para el extremo C-terminal, mientras que una secuencia menos cargada se conserva en *Leishmania* sp.? Tendrá esto que ver con el ciclo de vida intracelular del parásito? O tendrá que ver con algún tipo de adaptación hospedador-parásito?

Estas preguntas pueden constituir la base de las tesis doctorales que sean continuación de la presente.

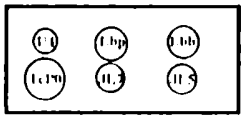
Sean cuales fueran las respuestas a estas interrogantes, lo cierto es que las proteínas ribosomales P son excelentes reactivos diagnósticos para diferenciar serológicamente ambas infecciones. Los sueros ECh, que reaccionan en su mayoría con las proteinas P de *T. cruzi*, no reaccionan o lo hacen suavemente con la proteínas ribosomales P de *Leishmania* sp., mientras que los sueros de pacientes con LMC, que reaccionan intensamente con las proteínas ribosomales P de *Leishmania* sp., no reaccionan con las proteínas ribosomales P de *T. cruzi*. Es más, el ensayo diagnóstico tal cual está planteado tiene una consecuencia de interés diagnóstico adicional. En efecto, permite detectar sueros lúpicos con anticuerpos anti-proteínas ribosomales P (ver Fig. 33), ya que éstos anticuerpos de LES reaccionan con las proteínas P de *Leishmania* y *T.cruzi*.
Si bien se han descripto antígenos P de *L.(L.) infantum* en la infección canina (Soto et al., 1995), cabe mencionar que estos antígenos no han sido descriptos previamente en infecciones humanas. En la infección canina la respuesta anti-P es inmunodominante (Soto y col., 1995).
Se debe tener en cuenta además, que los porcentajes de reactividad anti-P observados en LCA, LCS y LMC sólo han sido evaluados masivamente por EPL. El análisis por ELISA puede cambiar esta apreciación inicial.

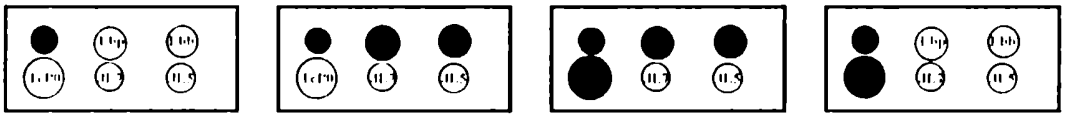
5.5) Formulación de un ensayo diferencial

El diagnóstico de la Enfermedad de Chagas (ECh) o la infección mixta (IM) en zona endémica se basa actualmente en la presencia de anticuerpos circulantes contra proteínas de extractos de parásitos. Este ensayo garantiza una alta sensibilidad, pero una baja especificidad. En la medida en que aumenten las posibilidades de tratamiento de estas infecciones se hace imperativo aumentar la especificidad del diagnóstico serológico. Los recombinantes permiten un acercamiento óptimo a la solución de este problema. Su empleo permite diferenciar las dos infecciones crónicas y la continuación de los trabajos que derivan de mi tesis permitirán mejorar aún más la calidad del ensayo.
Asi, los resultados obtenidos con U4 de *L.(V.) peruviana* (Kappa 0.95, para el diagnóstico serológico de LMC) y JL7 de *T. cruzi* (Kappa 0.93, para el diagnóstico serológico de ECh) y los obtenidos con los antígenos ribosomales P,

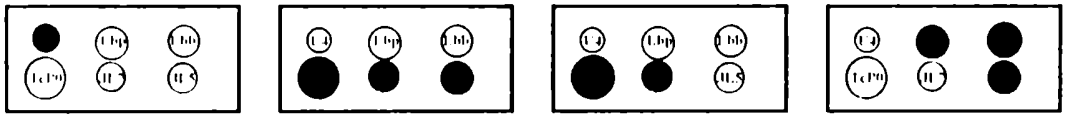
fundamentalmente, permiten la formulación de un ensayo serológico para diferenciar ambas infecciones. Dado el porcentaje de sueros positivos, la base de este ensayo son las proteínas recombinantes U4 y JL7. A ellas se agregan los otros recombinantes: LbpP2α, LbbP2β, y los de *T. cruzi*, JL5 y Tc C-P0.

5.5.1) Modelos de reacción por EPL para los sueros de pacientes leishmánicos, chagásicos y con la infección mixta con los recombinantes U4, LbpP2α, LbbP2β, JL7, JL5 y Tc C-P0



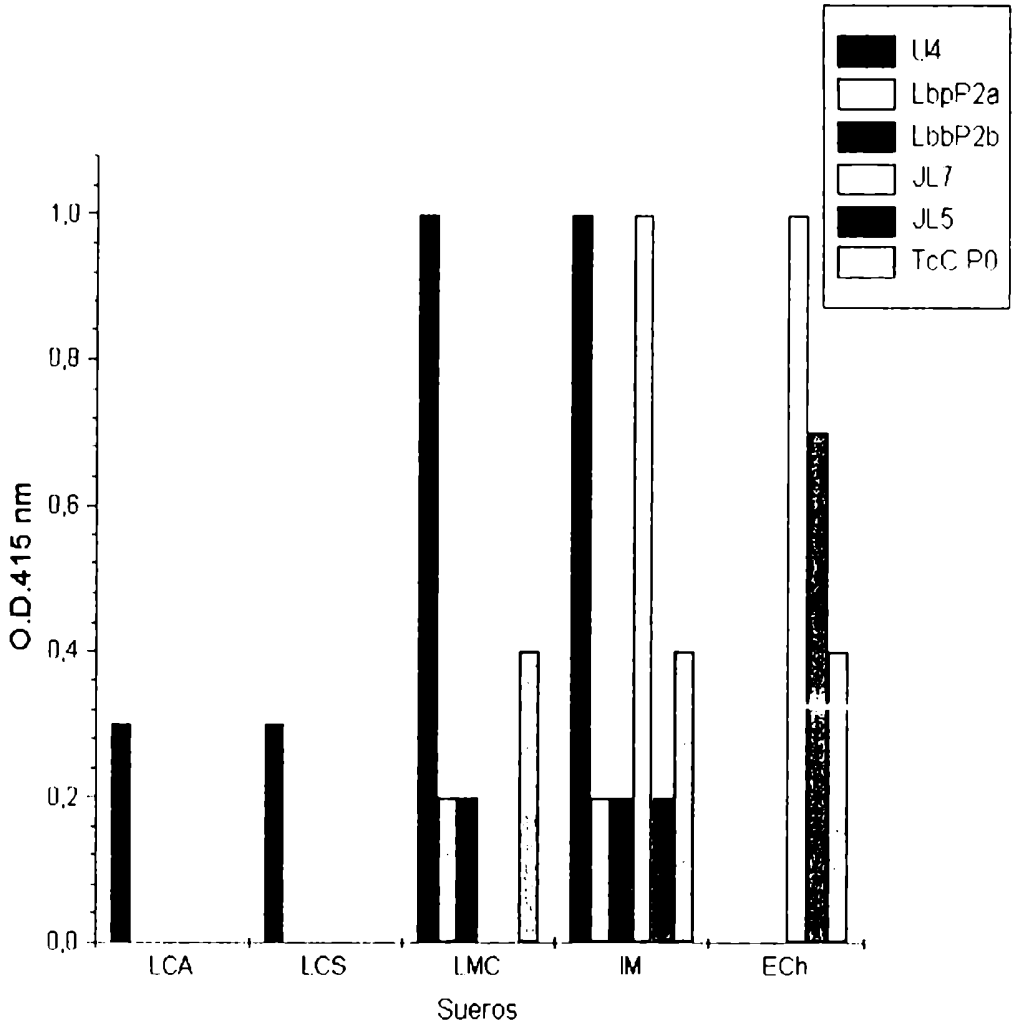


LCA/LCS LMC LMC LMC



LMC ECh ECh SLE

5.5.2) Modelo de reacción por ELISA para los sueros de pacientes leishmánicos, chagásicos y con la infección mixta



En resumen, los resultados de la presente tesis permiten la formulación de un reactivo diagnóstico único en su tipo, ya que es capaz de diagnosticar cualquiera de las dos infecciones en base a reacciones específicas para cada una, medidas o detectadas en el mismo ensayo (ELISA o EPL).

Esto resulta de máxima utilidad para zonas en donde conviven las dos endemias, como por ejemplo Perú, o más ampliamente en todo el continente americano. Actualmente, como se menciona más arriba, esta detección se hace con reactivos diagnósticos que tienen como base antigénica el extracto del parásito, por lo que la especificidad del diagnóstico es baja.

Es notable que en la realización de este ensayo diagnóstico intervenga la mayoría de antígenos de familias conservadas en la evolución como las HSP70 y las proteínas ribosomales P, que son además en enfermedades autoinmunes, autoantígenos. Sin embargo, hay que subrayar que si bien los autoanticuerpos de pacientes lúpicos reaccionan claramente con las proteínas parasitarias, el fenómeno inverso no se cumple, es decir anticuerpos generados contra las HSP70 o proteínas ribosomales P de parásitos no reaccionan en forma cruzada con sus contrapartes humanas (Levy-Yeyati, 1992 para la HSP70 y Levitus, 1991; Kaplan, 1995 para proteínas ribosomales P).

La sensibilidad de la detección de anticuerpos anti-U4 en pacientes del grupo I (LCA y LCS) merece un comentario adicional. Los resultados indican que si bien la respuesta anti-HSP70 en estos sueros es de baja intensidad, existen métodos que permiten detectarlos como el ELISA, para un cierto porcentaje de pacientes con LCA y el ELISA y EPL para LCS. De esta manera, es posible imaginar que si se desarrollan métodos que aumenten la sensibilidad de las determinaciones se podría mejorar la detección de los anticuerpos anti-U4, camino por el cual se podría llegar a un reactivo universal para las diferentes formas de Leishmaniasis del Nuevo Mundo.

5.6) La infección mixta (IM)

La situación más difícil para el diagnóstico es la doble infección (IM). Resultados preliminares de nuestro laboratorio hacían suponer (Levy-Yeyati, Tesis doctoral, 1992) que la caracterización del paciente con IM podía realizarse midiendo niveles de anticuerpos anti-HSP70 (anti-U4) y anti-JL7. Efectivamente, Levy-Yeyati había medido bajos niveles de anticuerpos contra JL7 en varios pacientes con IM, postulando en consecuencia que el ensayo serológico era suficiente para caracterizar un paciente con IM.

A diferencia de Levy-Yeyati, dispuse de más recursos para analizar los sueros IM. Todos ellos provienen de pacientes con síntomas clínicos de ambas infecciones. Sin embargo, sólo se pudo detectar anticuerpos anti-JL7 en un suero con IM (suero HA), siendo además el único en que no se detectaron anticuerpos anti-U4. Sin embargo, en toda la serie de pacientes los rasgos clínicos atestiguan la IM. Cuáles son los síntomas clínicos? Una cardiopatía chagásica crónica, implicando una probable infección durante la infancia. La infección con *Leishmania* sp. es posterior y probablemente debida a un cambio repentino en la vida del individuo que lo llevan a vivir y trabajar en regiones endémicas para Leishmaniasis. Así, la lesión metastásica se da sobre un trasfondo de la ECh. Es llamativo que los resultados de PCR puedan detectar *T. cruzi* en 3 casos en los cuales los títulos de anticuerpos anti-JL7 son bajos o nulos. Sin embargo, en dos de ellos los niveles de anticuerpos anti-U4 son elevados.

El hecho de amplificar ADN de *T. cruzi* en suero representa en realidad la existencia de *T. cruzi* circulante, como ocurre en los casos agudos (Russomando y col., 1992). Quizás, el fenómeno pueda interpretarse como que la infección por *Leishmania sp.* suprima el proceso de control inmunológico de *T. cruzi*, disminuyendo el título de anticuerpos contra éste y permitiendo su pasaje al torrente sanguíneo. Es llamativo además, que en 3 de los casos analizados los pacientes presenten un perfil típico de LMC, indicando que inmunológicamente sólo está reconociendo la *Leishmania* sp.

5.7) Los recombinantes LbpP2α, LbpP2β y LbbP2β

El recombinante LbpP2α representa prácticamente la proteína completa, faltándole sólo los 3 aminoácidos N-terminales, de acuerdo a la comparación con la P2α de *L.(L.) infantum*, con respecto a la cual presenta una elevada homología (89% de identidad y 6% cambios conservativos) (Fig. 22). Presenta además rasgos característicos de las proteínas ribosomales P de Tripanosomátidos. Una región rica en Ala y un extremo C-terminal rico en residuos ácidos. En el extremo C-terminal presenta un residuo de Ala, típico de las proteínas ribosomales P de *Leishmania* sp. (Tabla11).

El recombinante LbpP2β, contiene parte de la región rica en Ala y el extremo C-terminal típico de las proteínas ribosomales P de *Leishmania* sp. Al igual que LbpP2α, presenta en el extremo C-terminal un residuo de Ala.

El recombinante LbbP2β, es una proteína ribosomal P atípica. Presenta una mediana homología con sus homólogas de *L.(V.) peruviana* (52% identidad y 20% cambios conservativos) y *L.(L.) infantum* (49% identidad y 20% cambios conservativos). Su excepcionalidad se expresa en el extremo C-terminal donde en vez de Ala se ubica Gly (Tabla 11). Presenta una región rica en Ala y en la región más N-terminal del polipéptido clonado motivos "no P" como el péptido ENIAAA.

El descubrimiento de una nueva proteína ribosomal, LbbP2β, es otro resultado trascendente de mi trabajo. El cambio de Gly por Ala representa el cambio del codón GCG para LbpP2α (Ala) y GCC para LbpP2β (Ala) por el codón GGC que codifica un residuo de Gly en LbbP2β. Este cambio es una transversión. Es un cambio poco frecuente y si bien no representa un cambio fundamental en las propiedades de los aminoácidos ya que Gly y Ala presentan carga neutra, implica un importante desvío evolutivo entre *L.(V.) peruviana* y *L.(V.) braziliensis*. Esto podría ser un marcador de la clara diferencia evolutiva entre ambas. La caracterización de otras proteínas ribosomales P de bajo peso molecular de *L.(V.) braziliensis* permitirá obtener un panorama más detallado de las diferencias evolutivas entre estas especies.

Todas estas características de LbbP2β han dado pie a una hipótesis que se investiga actualmente en el laboratorio. Esta propone que LbbP2β no sería en realidad una verdadera proteína P de bajo peso molecular. Representaría el fragmento C-terminal de una proteína ribosomal P intermedia entre la proteína P0 de 38 kDa y la proteínas ribosomales P de bajo peso molecular (10-12 kDa.), la proteína ribosomal P de 19 kDa. Esta proteína de 19 kDa. ha sido descripta para *T. cruzi*, a nivel de Western blot, pero su clonado fracasa constantemente. Es atractivo pensar que esta proteína es en realidad la proteína de 19 kDa. de *L.(V.) braziliensis*. De ser así, el ADNc de LbbP2β serviría para aislar el gen correspondiente de *T. cruzi*.

El análisis de los genes HSP70 y las proteínas ribosomales P de *Leishmania* sp., muestran un patrón similar en la utilización de codones por ambos tipos de proteínas, salvo en el uso del codón stop.

CONCLUSIONES

Mientras en las HSP70, se usa preferentemente el codón stop, TAG; en las proteínas ribosomales P hay una tendencia a usar el codón stop, TAA (ver Apéndice).

Los resultados del análisis de composición de bases por posición correlacionan con lo informado por Langford y col., 1992 y Alonso y col., 1992, donde se destaca para *Leishmania* sp. una muy elevada tendencia al uso de bases G o C en la tercera posición de codón. Este alto contenido en bases GC en la región codificante podría ser una adaptación a las condiciones del medio ambiente, donde codones ricos en GC (codificando residuos de Alanina y Arginina) serían seleccionados como una adaptación al hospedador homeotermo (Alonso y col., 1992).

CONCLUSIONES

1. Al analizar la respuesta humoral contra extractos de Leishmania sp. determinamos que todas las formas de Leishmaniasis peruanas reconocen un amplio espectro de proteínas del parásito. Los sueros de pacientes con LMC presentan una intensidad de reacción elevada en comparación con pacientes con LCA y LCS. Se ha medido en pacientes con LMC reactividad anti-*Leishmania* a diluciones 1:20.000.

2. La proteína de choque térmico de 70 kDa (HSP70) de *Leishmania* sp. es inmunodominante en sueros de pacientes con LCA, LCS, LMC e IM.

3. La intensidad de la respuesta anti-HSP70 acompaña la intensidad de la respuesta anti-extracto total detectándose mayores niveles de anticuerpos anti-HSP70 en pacientes LMC que en los otros grupos.

4. Se determinó que la región C-terminal de esta molécula contiene los epítopes reconocidos por por los sueros de pacientes.

5. Se aisló y caracterizó por primera vez la región C-terminal de la HSP70 de *L.(V.) peruviana* (U4).

6. La molécula recombinante U4 demostró ser un excelente reactivo diagnóstico para las Leishmaniasis del Perú. En conjunto con el recombinante JL7, reactivo diagnóstico de la Enfermedad de Chagas constituyen la base de un ensayo diagnóstico diferencial para ambas infecciones.

7. Se demostró que otros antígenos de *Leishmania* sp. podrían contribuir a la caracterización serológica de sueros leishmánicos y se demostró que la proteína ribosomal P0 de *T. cruzi* es un antígeno reconocido por pacientes con Leishmaniasis y pacientes con la Enfermedad de Chagas.

8. Los nuevos recombinantes de *Leishmania* sp.: proteína ribosomal P2α de *L.(V.) peruviana* (LbpP2α), proteína ribosomal P2β de *L.(V.) peruviana* (LbpP2β) y

proteína ribosomal P2β de *L.(V.) braziliensis* (LbbP2β). Es la primera vez que se descubren estos antígenos para Leishmaniasis del Nuevo Mundo.

9. El recombinante LbbP2β representa la porción C-terminal de una proteína ribosomal P atípica. Reemplaza por una Gly la Ala típica de la región C-terminalde las proteínas ribosomales P de *Leishmania* sp.

10. El epítope fundamental de las proteínas P de *T. cruzi* en la Enfermedad de Chagas es el péptido que define su región C-terminal (R-13). En *Leishmania* sp. esta región no es antigénica. Esto representa un caso excepcional en lo que respecta a la antigenicidad de las proteínas ribosomales P, ya que en todos los casos descriptos hasta la fecha (ECh y LSE) el epítope se localizaba en la región C-terminal. Estas características apoyan la formulación de un reactivo diagnóstico diferencial basado en los recombinantes U4, JL7, LbpP2α y LbbP2β para el diagnóstico serológico de LMC y ECh.

BIBLIOGRAFÍA

Acosta A.M., Sadigursky M. and Santos Buch C.A. (1983). Anti-striated muscle antibody activity produced by *Trypanosoma cruzi*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 172:364-369.

Affranchino J.L., Ibañez C.F., Luquetti A.O., Peterson U. and Frasch A.C.C. (1989). Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during the acute phase of Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol. 34: 221-228.

Ajioka J.W., Skinner A.C. and Blackwell J.M. (1992). Production of a chromosome-specific library for *Leishmania major*. In: J. Cell. Biochem. Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology. January 13-26. Suppl. 16A:119.

Alexander J. and Russell D. (1992). The interaction of *Leishmania* species with macrophages. In: Adv. Parasitol. 31:175-254.

Alonso G., Guevara P. and Ramirez J.L. (1992). Trypanosomatidae codon usage and GC distribution. Mem. Inst. Osawaldo Cruz. 87:517-523.

Alvar J., Gutierrez-Solar B., Molina R., López-Vélez R., Garcia A., Martínez P., Laguna F., Cercenado E. and Galmes A. (1992). Prevalence of *Leishmania* infection among AIDS patients. Lancet 239:1427.

Alves M.J.M., Abuin G., Kuwajima V.Y. and Colli W. (1986). Partial inhibition of trypomastigotes entry into cultured mammalian cells by monoclonal antibodies against a surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 21:75-82.

Amorin A.G., Carrington M., Miles M.A., Mendoza A., Barker D.C and Cardoso M.L. (1991). Identification of the C-terminal domain of the 70 kDa. heat shock protein from *L.(V.) braziliensis* as a potential antigen for diagnosis of mucocutaneous leishmaniasis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro. 86:179.

Andrade S.G., Freitas L.A.R., Peyrol S., Pimentel A. and Sadigursky M. (1990). Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistance of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. Bull. World Health Organization. 63(4):721-726.

Andrade Z.A. (1991). Pathogenesis of Chagas' disease. Res. Immunol. 142:126-130.

Andrews N.W., Hong K.S., Robbins E.S., Nussenzweig V. (1987). Stage-especific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi.* Exp. Parasitol. 64: 474-84.

Andrews N.W., Abrams C.K., Slatin S.L., Griffiths G. (1990). A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. Cell 61: 1277-87.

Anthony R.L., Christensen H.A. and Johnson C.M. (1980). Micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the serodiagnosis of New World leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29:190-194.

Arana M., Evans D.A., Zolessi A., Llanos-Cuentas A. and Arévalo J. (1990). Biochemical characterisation of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) peruviana* by isoenzyme electrophoresis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 84:10148-10152.

Argov S., Jaffe C.L., Krupp M., Slor H. and Schoenfeld Y. (1989). Autoantibody production by patients infected with *Leishmania*. Clin. exp. Immunol. 76(2):190-197.

Aviv H. and Leder P. (1972). Purification of biologically active globin messenger RNA by chromatography on oligothymidylic acid-cellulose. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 69(6):1408-1412.

Badaro R., Reed S.G., Barral A., Orge G. and Jones T.C. (1986). Evaluation of the micro enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for antibodies in American visceral

leishmaniasis: antigen selection for detection of infection-specific responses. Am. J. Trop. Med. Hyg. 35:72-78.

Bahr V., Stierhof Y-D., Ilg T., Demar M., Quinten M and Overath P. (1993). Expression of lipophosphoglycan, high molecular weight phosphoglycan and glycoprotein 63 in promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. Mol. Biochem. Parasitol. 58:107-122.

Baldwin C., Godderis B. and Morrison W. (1988). T-cell clones in immunoparasitology. Parasitol. Today 4(2):40-45.

Barker D.C. and Butcher J. (1983). The use of DNA probes in the identification of leishmaniasis: discrimination between isolates of the *Leishmania mexicana* and *Leishmania braziliensis* complexes. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 77:285-297.

Barker D.C., Gibson L.J., Kennedy W.P.K., Nasser A.A.A. and Williams R.H. (1986). The potential of using recombinant DNA species-specific probes for the identification of tropical *Leishmania*. Parasitology 91:S139-174.

Barker D.C. (1989). Molecular approaches to DNA diagnosis. Parasitology 99 (Suppl):S125-146.

Barral-Netto M., Barral A., Brownell C.E., Skeiky Y.A.W., Ellinsworth L.R., Twardzik D.R. and Reed S.G. (1992). Transforming growth factor-β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. Science 257:545-548.

Beverley S.M. (1991). Gene amplification in *Leishmania*. Annu. Rev. Microbiol. 45:417-444.

Birnboim H.C. and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmids DNA. Nucl. Acid. Res. 7:1513-1523.

Blackwell J.M. (1985). Receptors and recognition mechanism of *Leishmania* species. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 79:606-612.

Blisnick T., Lema F., Mazie J.C. and Da Silva L.P. (1988). *Plasmodium falciparum*: Analysis of B cell epitopes of a polypeptide antigen expressed in *Escherichia coli*, using monoclonal antibodies. Exp. Parasitol. 67:247-256.

Bock J.H. and Langer P.J. (1993). Sequence and genomic organization of the hsp70 genes of *Leishmania amazonensis*. Mol. Biochem. Parasitol. 62:187-198.

Bogdan C., Rollinghoff M. and Solbach W. (1990). Evasion strategies of *Leishmania* parasites. Parasitol. Today 6(6):183-187.

Bohme M.W.J., Evans D.A., Miles M.A. and Holborow E.J. (1986). Ocurrence of autoantibodies to intermediate filament proteins in human visceral leishmaniasis and their induction by experimental polyclonal B-cell activation. Immunology 59:583.

Bordier C. (1987). The promastigote surface protease of *Leishmania*. Parasitol. Today 3:151-153.

Boschetti M.A., Piras M.N., Henríquez D. and Piras R. (1987). The interaction of a *Trypanosoma cruzi* protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. Mol. Biochem. Parasitol. 24:175-184.

Bouvier J., Etges R.J. and Bordier C. (1987). Identification of the promastigote surface protease in several species of *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. 24:73-79.

Bouvier J., Bordier C., Vogel H., Reichelt R. and Etges R. (1989). Characterization of the promastigote surface protease of *Leishmania* as a membrane-bound zinc endopeptidase. Mol. Biochem. Parasitol. 37:235-246.

Bouvier J., Schneider P., Etges R. and Bordier C. (1990). Peptide substrate specificity of the membrane-bound metalloprotease of *Leishmania*. Biochemistry 29:10113-10119.

Bradford M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

Braga J. (1987). Caracterización de Leishmanias de Loreto por patrones isoenzimáticos. Master Tesis, Universidad Peruana Cayetano Heredia, Lima, Perú.

Bradley D.J and Kirkley J. (1972). Variation in susceptibility of mouse strains to *Leishmania donovani* infection. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 66:527-528.

Brener Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol. 27: 347-383.

Brener Z. (1979) O parasito: relacoes hospedeiro-parasito. En *Trypanosoma cruzi* e Doenca de Chagas. Brener Z, Andrade Z.(Eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp:1-41.

Brener Z. y Krettli A. (1990). Immunology of Chagas' disease. In Modern parasite biology. Cellular, immunological and molecular aspects. D.J. Wyler. W.H. Freeman & Co. New York.

Budzco D.B., Pizzimentti M.C. and Kierzenbaum F. (1975). Effect of complement depletion in experimental Chagas' disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 28:434-440.

Burns Jr. J.M., Scott J.M., Carvalho E.M., Russo D.M., March C.J., Van Ness K.P. and Reed S.G. (1991). Characterization of a membrane antigen of *Leishmania amazonensis* that stimulates human immune responses. J. Immunol. 146:742-748.

Button L.L. and McMaster W.R. (1988). Molecular cloning of the major surface antigen del *Leishmania*. J. Exp. Med. 167:724-729.

Button L.L., Russell D.G., Klein H.L., Medina-Acosta E., Karess R.E. and Mc.Master W.R. (1989). Genes encoding the major surface glycoprotein in *Leishmania* are tandemly linked at a single chromosome locus and are constitutively transcribed. Mol. Biochem. Parasitol. 32:271-283.

Button L.L., Reiner N.E. and Mc.Master W.R. (1991). Modification of *Leishmania* gp63 genes by the polymerase chain reaction for expression of nonfussion protein at high levels in *E. coli*: applications to mapping protective T cell determinants. Mol. Biochem. Parasitol. 44:213-224.

Camargo M.E., Segura E.L., Kagan I.G., Pacheco Souza J.M., da Rocha Carvalheiro J., Yanovsky J.F. and Guimaraes M.C.S. (1986). Three years of collaboration on the standardization of Chagas' disease serodiagnosis in the Americas: An appraisal. PAHO Bulletin 20:233-244.

Carvalho E.M., Correia Filho D., Bacelar O., Almeida R.P., Lessa H. and Rocha H. (1995). Characterization of the immune response in subjects with self-healing cutaneous leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 53:273-277.

Castés M., Agnelli A. and Rondón A.J. (1984). Mechanisms associated with immunoregulation in human American cutaneous leishmaniasis. Clin. exp. Immunol.57:279-286.

Cazzulo J.J. (1991). Proteinasas of *Trypanosoma cruzi*: In: Coombs G.H. and North M.J. eds. Biochemical Protozoology. London: Taylor & Francis, pag:191-199.

Clayton C. (1988). The molecular biology of the Kinetoplastidae. In: Genetic Engineering. Academic Press. 7:1-56.

Colomer-Gould V., Galvao Quintao L., Keithly J. and Nogueira N. (1985). A common surface antigen on amastigotes and promastigotes of Leishmania species. J. Exp. Med. 162:902-916.

Comeau A.M., Miller S.L. and Wirth D.F. (1986). Chromosome location of four genes in *Leishmania*. Mol. Biochem. Parasitol. 21:161-169.

Convit J., Ulrich M., Fernández C.T., Tapia F.J., Cáceres-Dittmar G., Castés M. and Rondón A.J. (1993). The clinical and immunological spectrum of American cutaneous leishmaniasis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 87:444-448.

Cotrim P., Paranhos G., Mortara R., Wanderley J., Rassi A., Camargo M., Da Silveira F. (1990). Expression in *E. coli* of a dominant immunogen of *T. cruzi* recognized by human chagasic sera. J. Clin. Microbiol., 28: 519-524.

Cotrim P.C., Paranhos-Bacala G., Santos M.R., Mortensen C., Cano M.I., Jolivet M., Camargo M.E., Mortara R.A. and da Silveira F. (1995). Organization and expression of the gene encoding an immunodominant repetitive antigen associated to the cytoeskeleton of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol. 71:89-98.

Coulson R. and Smith D.F. (1990). Isolation of genes showing increased or unique expression in the infective promastigotes of *Leishmania major*. Mol. Biochem. Parasitol. 40:63-76.

Cox F.E.G. and Liew E.Y. (1992). T cell subsets and cytokines in parasitic infections. Parasitol. Today 8(11):371-374.

Craig E.A., Gambill B.D. and Nelson R.J. (1993). Heat shock proteins: Molecular chaperones of protein biogenesis. Microbiol. Rev. 57(2):402-414.

Crocker P.R., Davies E.V. and Blackwell J.M. (1987). Variable expression of the murine natural resistance gen *Lsh* in different macrophage populations infected in vitro with *Leishmania donovani*. Parasite Immunol. 9:705-719.

Chagas C. (1909). Nova tripanosomiase humana. Estudios sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*. N. Gen., N. sp., o agente etiologico da nova entidade morbida do homen. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 1:159-218.

Champsi J. and Mc.Mahon-Pratt D. (1988). Membrane glycoprotein M2 protects against *Leishmania amazonensis* infection. Infect. Immunity 56:3272-3279.

Chan J., Fujira T., Brennan P., McNeil M. and Turco S.J. (1989). Microbial glycolipids: possible virulence factors that scavenge oxygen radicals. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:2453-2457.

Chang K.P. and Chaudhuri G. (1990). Molecular determinants of *Leishmania* virulence. Annu. Rev. Microbiol. 44:499-529.

Chaudhuri G. and Chang K.P. (1988). Acid protease activity of a major surface membrane glycoprotein (gp63) from *Leishmania mexicana* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol. 27:43-52.

Chaudhuri G., Chaudhuri M., Pan A. and Chang K.P. (1989). Surface acid proteinase (gp63) of *Leishmania mexicana*. A metalloenzyme capable of protecting liposome-encapsulated proteins from phagolysosomal degradation by macrophages. J. Biol. Chem. 264:7483-7489.

Chiller T.M., Samudio M.A. and Zoulek G. (1990). IgG antibody reactivity with *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* antigens in sera of patients with Chagas' disease and leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43:650-656.

Christensen H.A., Fairchild G.B., Herrer A., Johnson C.M., Young D.G. and Vazquez A.M. (1983). The ecology of cutaneous leishmaniasis in the Republic of Panama. Journal of Medical Entomology 20:463-484.

Damlan R. (1964). Molecular mimicry: antigen sharing by parasite and host and its consequences. Am. Naturalist. 98:129-149.

Davies C.R., Cooper A.M., Peacock C., Lane R.P. and Blackwell J.M. (1990). Expression of LPG and Gp63 by different developmental stages of *Leishmania major* in the sandfly *Phlebotomus papatasi*. Parasitology 101:337-343.

De Andrade C.R., Kirchhoff L.V., Donelson J.E. and Otsu K. (1992). Recombinant *Leishmania* Hsp90 and Hsp70 are recognized by sera from Visceral Leishmaniasis patients but not Chagas' disease patients. J. Clin. Microbiol. 30:330-335.

De Arruda M.V., Colli W. and Zingales B. (1989). Terminal β-D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *T.cruzi* internalization into mammalian cells. Eur. J. Biochem. 182: 413-421.

De Bruijn M.H.L. and Barker D.C. (1992). Diagnosis of New World Leishmaniasis: specific detection of species of the *Leishmania braziliensis* complex by amplification of kinetoplast DNA. Acta Tropica 52:45-58.

De Titto E.H. (1982). Regulación de la respuesta inmune en la Enfermedad de Chagas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

De Titto E.H., Braun M., Lazzari J.O., Segura E.L. (1985). Cell-mediated reactivity against human and *Trypanosoma cruzi* antigens according to clinical status in Chagas' disease patients. Immunol. Lett. 9:249-254.

D'Imperio Lima M.R., Eisen H., Minoprio P., Joskowicz M. and Coutinho A. (1986). Persistance of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. J. Immunol. 137:353-356.

Dragon E.A., Stacey R., Sias A., Kato E.A. and Gabe J.D. (1987). The genome of *T. cruzi* contains a constitutively expressed tandemly arrayed multicopy gene homologous to a major heat shock protein. Mol. Cell. Biol. 7:1271-1275.

Dujardin J.C., Llanos A., Caceres A., Arana M., Dujardin J.P., Gomez J., Arroyo J., De Doncker S., Jacquet J., Hamers R., Guerra H., Le Ray D. and Arevalo J. (1993). Molecular karyotype variation in *L.(V.) peruviana*: indication of geographical populations in Perú distributed along a north-south cline. Annals of Tropical Medicine and Parasitology 87:335-347.

Dujardin J.C., Dujardin J.P., Tibayrenc M., Timperman G., De Doncker S., Jacquet J., Arevalo J., Llanos A., Guerra H., Bermudez H., Hamers R. y Le Ray D. (1995). Karyotype plasticity in Neotropical *Leishmania*: an index for measuring genomic distance among *L. (V.) peruviana* and *L. (V.) braziliensis* populations. Parasitology, 110, 21-30.

Dworniczak B. and Mirrault M.E. (1987). Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. Nucl. Acid. Res. 15:5181-5197.

Effron P.N., Torri A.F., Engman D.M., Donelson J.E. and Englund P.T. (1993). A mitochondrial heat shock protein fron *Crithidia fasciculata*. Mol. Biochem. Parasitol. 59:191-200.

Ellam Y., El-On J., Spira D.T. (1985). *Leishmania major*: excreted factor, calcium ions, and the survival of amstigotes. Exp. Parasitol. 59:161-168.

El Safi S.H. and Evans D.A. (1989). A comparison of the direct agglutination test and enzyme-linked immunosorbent assay in the serodiagnosis of leishmaniasis in the Sudan. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 83:334-337.

Ellis R.J. (1987). Proteins as molecular cheperones. Nature 328:378-379.

Ellis R.J. and Van der Vies S.M. (1991). Molecular chaperones. Annu. Rev. Biochem. 60:321-347.

Engman D.M., Kirchoff L.V. and Donelson J.E. (1989). Molecular cloning of the mtp70, a mitochondrial member of the hsp70 family. Mol. Cell. Biol. 9:5163-5168.

Etges R.J., Bouvier J., Hoffman R. and Bordier C. (1985). Evidence that the major surface proteins of three *Leishmania* species are structurally related. Mol. Biochem. Parasitol. 14:141-149.

Flaherty K.M., Flaherty-DeLuca C. and Mc.Kay D.B. (1990). Three dimensional structure of the ATPase fragment of the 70 Kda. heat shock cognate protein. Nature. 346:623-628.

Franke E.D., McGreevy P.B., Katz S.P. and Sacks D.L. (1985). Growth cycle dependent generation od complement resistant *Leishmania* promastigotes. J. Immunol. 134:2713-2718.

Frasch A.C.C (1989). Specific antibody response during the acute period of Chagas' disease. Parasitol. Today 5:355.

Galvao-Castro B., Ferreira J.A., Marzochi K.F., Marzochi M.C., Coutinho S.G. and Lambert P.H. (1984). Polyclonal B cell activation, immune complexes and autoimmunity in human American visceral leishmaniasis. Clin. Exp. Immunol. 56:58-66.

García E.S. and Azambuja P. 1991. Development and interactions of *Trypanosoma cruzi* within the insect vector. Parasitol. Today 7: 240-244.

Gazzinelli R.T., Galvao Castro L.M.C., Cardoso J.E., Romeu Cancado J., Krettli A.U., Brener Z. and Gazzinelli G. (1988). Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. J. Clin. Microbiol. 26:1795-1800.

Gazzinelli R.T. (1996). Molecular and cellular basis of interleukin 12 activity in prophylaxis and therapy against infectios diseases. Mol. Medicine Today, June, 258-267.

Genske J., Cairns B., Stack S. and Landfear S. (1991). Structure and regulation of Histone H2B mRNA from *Leishmania enriettii*. Mol. Cell. Biol. 11:240-249.

Georgopuolus C. (1992). The emergence of the chaperone machines. Trends Biochem. Sci. 17:295-299.

Gething M.J. and Sambrook J. (1992). Protein folding in the cell. Nature. 355:33-45.

Giannini M.S. (1974). Effects of promastigote growth phase, frequency of subculture, and host age in promastigote-initiated infections with *Leishmania donovani* in the golden hamster. J. Protozool. 21:521-527.

Giannini S.H., Schittini M., Keithly J.S., Warburton P.W., Cantor C.R. and Van der Ploeg L.H.T. (1986). Karyotype analysis of *Leishmania* species and its use in classification and clinical diagnosis. Science 232:762-765.

Giannini S.H., Curry S.S., Tesh R.B. and Van der Ploeg L.H.T. (1990). Size conserved chromosomes and stability of molecular karyotype in cloned stocks of *Leishmania major*. Mol. Biochem. Parasitol. 39:9-22.

Glass D.J., Polvere R.L. and Van der Ploeg L.H.T. (1986). Conserved sequences and transcription of the hsp70 gene family in *Trypanosoma brucei*. Mol. Cell. Biol. 6:4657-4666.

Greenblatt C.L. (1985). Vaccination for leishmaniasis, p:199-212. In: K.-P. Chang and R.S. Bray (ed.), Leishmaniasis. Elsevier, London.

Greenblatt C.L. (1988). Cutaneous leishmaniasis. The prospects for a killed vaccine. Parasitol. Today 4:53-54.

Grimaldi G., David J.R. and McMahon-Pratt D. (1987). Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serodeme analysis using monoclonal antibodies. Am. J. Trop. Med.Hyg. 36:270-287.

Grimaldi G. Jr. and Mc.Mahon-Pratt D. (1991). Leishmaniasis and its etiologic agents in the New World: an overview, p. 73-118. In T. Sun (ed.), Progress in Clinical Parasitology, vol. 2. Field & Wood Medical Publishers, Inc., New York.

Grimaldi Jr. G. and Tesh R.B. (1993). Leishmaniasis of the New World: Current concepts and implications for future research. Clin. Microbil. Rev. 6:230-250.

Grögl M. and Kuhn R. (1984). Identification of antigens of culture forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* recognized by sera from patients with chronic Chagas' disease. Parasitology 70:822-824.

Gubler U. and Hoffman B.J. (1983). A simple and very efficient method for generating cDNA libraries. Gene 25:263-269.

Gunders A.E. (1987). Vaccination: past and future role in control, p. 928-941. In W. Peters and R. Killick-Kendrick (ed.), The leishmaniasis in biology and medicine, vol. 2. Academic Press, Ltd., London.

Hammer C., Wirtz G., Renfer L., Greshan H. and Tack B. (1981). Large-scale isolation of functionally active components of human complement system. J. Biol. Chem. 256:3995-4002.

Handman E. and Mitchell G.F. (1985). Immunization with *Leishmania* receptor for macrophages protects mice against cutaneous leishmaniasis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:5910-5914.

Hanekamp T. and Langer P.J. (1991). Molecular karyotype and chromosomal localization of the genes encoding two major surface glycoprotein, gp63 and gp46/M2, hsp70 and β-tubulin in cloned strains of several *Leishmania* species. Mol. Biochem. Parasitol. 48:27-38.

Harel-Bellan A., Joskowicz M., Fradelizi D. and Eisen H. (1983). Modification of T cell proliferation and IL-2 production in mice infected with *T. cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA): 80:3466.

Harith A.E., Kolk A.H., Kager P.A., Leeuwenburg J., Faber F.J., Muigai R., Kiugu S and Laarman J.J. (1987). Evaluation of a newly developed direct agglutination test (DAT) for serodiagnosis and seroepidemiological studies of visceral leishmaniasis: comparison with IFAT and ELISA. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 81:603-606.

Herwaldt B.L y Berman J.D. (1992). Recommendations for treating leishmaniasis with sodium stibogluconate (Pentostam) and review of pertinent clinical studies. Am. J. Trop. Med. Hyg. 46:296-303.

Herrer A. (1951). Estudios sobre Leishmaniasis Tegumentaria en el Perú. VI. Relación entre la Leishmaniasis Tegumentaria y *Phlebotomus*. Revista de Medicina Experimental, 8, 119-137.

Herrer A. (1962). The incidence of uta (cutaneous leishmaniasis) among the child population of Peru. Scientific Reports of the Istituto Superiore di Sanitá, 2, 131-137.

Hoare C.A. (1972). The Trypanosomes of Mammals, Blakwell Scientific Publications.

Hoeppli R. (1969). Parasitic diseases in Africa and the western hemisphere. Early documentation and transmission by the slave trade. Acta Tropica suppl. 16:240-244.

Hoft D.F., Kin K.S., Otsu K., Mosser D.R., Yost W.J., Blumin J.H., Donelson J.E. and Kirchhoff L.V. (1989). *Trypanosoma cruzi* expresses diverse repetitive protein antigens. Infect. Immun. 57:1959-1967.

Homans S.W., Melhert A. and Turco S.J. (1992). Solution structure of the lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. Biochemistry 31:654-661.

Hommel M. (1978). The genus *Leishmania*: Biology of the parasites and clinical aspects. Bull. Inst. Pasteur 75:5-102.

Hontebeyrie-Joskowicz M., Said G., Milon G., Marchal G. and Eisen H. (1987). L3T4$^+$ T cells able to mediate parasite-specific delayed type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. Eur. J. Immunol. 17:1027-1033.

Howard M.K., Sayers G. and Miles M.A. (1987) *Leishmania donovani* metacyclic promastigotes transformation *in vitro*, lectin agglutination, complement resistance and infectivity. Exp. Parasitol. 64:147-157.

Hudson L. (1985). Autoimmune phenomena in chronic chagasic cardiopathy. Parasitol. Today 1:6-7.

Hunt C. and Morimoto R.I. (1985). Conserved features of eukaryotic hsp70 genes revealed by comparison with the nucleotide sequence of human hsp70. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 82:6455-6459.

Hyunt T.V., Young R.A. and Davis R.W. (1985). Constructing and screening of cDNA libraries in λgt10 and λgt11. In: D.M. Glover ed. DNA Cloning techniques: A practical approach. Oxford. IRL Press, pag:45-79.

Ibañez C.F., Affranchino J.L. and Frasch A.C.C. (1987). Antigenic determinants of *T. cruzi* defined by cloning of parasite DNA. Mol. Biochem. Parasitol. 25:175-184.

Ibañez C.F., Affranchino J.L., Macina R.A., Reyes M.B., Leguizamon S., Camargo M.E., Aslund L., Petterson U. and Frasch A.C.C. (1988). Multiple *Trypanosoma cruzi* antigens containing tandemly repeated aminoacid sequence motifs. Mol. Biochem. Parasitol. 30:27-38.

Ip H.S., Russell D.G. and Cross G.A.M. (1990). *L. mexicana mexicana* gp63 is a site-specific neutral endopeptidase. Mol. Biochem. Parasitol. 40:163-172.

Ish-Horowicz D. and Burke J.F. (1981). Rapid and efficient cosmid cloning. Nucl. Acid. Res. 9:2989.

Israelski D., Sadler R. and Araujo F.G. (1989). Antibody response and antigen recognition in human infection with *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. 39:445-455.

Jaffe C.L., Rachamin N. and Sarfstein R. (1990). Characterization of two proteins from *Leishmania donovani* and their use for vaccination against visceral leishmaniasis. J. Immunol. 144:699-706.

Jardim A., Alexander J., The N.S., Ou D. and Olafson R.W. (1990). Immunoprotective *Leishmania major* synthetic T cell epitopes. J. Exp. Med. 172:645-648.

Jardim A., Tolson D.L., Turco S.J., Pearson T.W. and Olafson R.W. (1991). The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan T-lymphocyte reactive component is a tightly associated protein complex. J. Immunol. 147:3538-3544.

Joiner K., Hieny S., Kirchhoff L.V. and Sher A. (1985). Gp72, the 72 kilodalton glycoprotein is the membrane acceptor site for C3 on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J. Exp. Med. 161:1196-1212.

Joiner K.A. (1986). Evassion of alternative complement pathway by *T. cruzi* results from inneficient binding of factor B. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 83:6593-6597.

Kaplan D. **(1995)**. Antígenos, epítopes y autoepítopes en la infección por *Trypanosoma cruzi*: Autoimmunidad en la Enfermedad de Chagas vs. Autoinmunidad Sistémica. Tesis doctoral. Universidad de Buenos Aires.

Kaye P.M. (1987). Antigen presentation and the response to parasitic infection. Parasitol. Today 3:293-299.

Kerner N., Liégeard P., Levin M., Hontebeyrie-Joskowicz M. (1991). *Trypanosoma cruzi*: Antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. Exp. Parasitol. 73:451-459.

Killick-Kendrick R. (1990). Phlebotomine vectors of the leishmaniases: a review. Med. Vet. Entomol. 4:1-24.

King D.L., Chang Y.D. and Turco S.J. (1987). Cell surface lipophosphoglycan of *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol. 24:47-53.

Kipnis T., Krettli A. and Da Silva D. (1985). Transformation of trypomastigote forms of *T. cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. Scand. J. Immunol. 22:217.

Kirchhoff L.V. (1987). Increased specificity of serodiagnosis of Chagas' disease by detection of antibody of the 72 and 90 kilodalton glycoproteins of *Trypanosoma cruzi*. J. Infect. Dis. 155, 561-564.

Koberle F. (1968). Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of america trypanosomiasis. Adv. Parasitol. 6:63-116.

Krettli A.U. and Brener Z. (1982). Resistance against *T. cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. J. Immunol. 128:2009-2012.

Krettli A.U., Cançado J.R. and Brener Z. (1982). Effect of specific chemotherapy on the levels of litic antibodies in Chagas' disease. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 76:334-340.

Kreutzer R.S., Senko M.E., Hendricks L.D. and Wright N. (1983). Identificatiion of *Leishmania* sp. by multiple isoenzyme analysis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:703-715.

Kweider M., Lemesre J., Darcy F., Kusnierz J.P., Capron A. and Santoro F. (1987) Infectivity of *Leishmania braziliensis* promastigotes is dependent on the increasing expression of a 65,000 dalton surface antigen. J. Immunol. 138:299-305.

Laemli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227:680-685.

Lafaille J.J., Linss J., Krieger M.A., Souto-Padrón T., De Souza W. and Goldenberg S. (1989). Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. Mol. Biochem. Parasitol. 35:127-136.

Landfear S.M., Miller S.I. and Wirth D.F. (1986). Translational mapping of *Leishmania enriettii* tubulin mRNAs. Mol. Biochem. Parasitol. 21:235-245.

Lainson R. y Shaw J.J. (1972). Leishmaniasis of the New World: Taxonomic problems. British Medical Bulletin, 28:44-48.

Lainson R. (1989). Demographic changes and their influence on the epidemiology of the American leishmaniases, p. 85-106. In M.W. Service (ed.). Demography and vector-borne diseases. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Lamb J.R., Bal V., Méndez-Samperio P., Mehlert A., So A., Rothbard J., Jindal S., Young R.A. and Young D.B. (1989). Stress proteins may provide a link between the immune response to infection and autoimmunity. Int. Immunol. 1:191-195.

Langer T. and Neupert W. (1991). Heat shock proteins hsp60 and hsp70: Their roles in folding, assembly and membrane translocation of proteins. In: Curr. Topics Microbiol. Immunol. 167:3-24.

Langford C.K., Ullman B. and Landfear S.M. (1992). *Leishmania*: Codon utilization of nuclear genes. Exp. Parasitol. 74:360-361.

Laranja F.S., Dias F., Nobreg G. and Miranda A. (1956). Chagas' disease: A clinical, epidemiologic and pathology study. Circulation 14:1035-1060.

Lee M.G.S., Atkinson B.L., Giannini S.H. and Van der Ploeg L.H.T. (1988). Structure and expression of the hsp-70 gene family of *Leishmania major*. Nucleic Acid Res. 16:9567-9585.

Leon W., Fouts D.L. and Manning J. (1978). Sequence arrangement of the 16S and 26S rRNA genes in the pathogenic haemoflagellate *Leishmania donovani*. Nucleic Acid Res. 5:491-503.

Levin M.J., Mesri E.A., Benarous R., Levitus G., Schijman A., Levy-Yeyati P., Chiale P., Ruiz A., Kahn A., Rosenbaum M.B., Torres H.N. and Segura E.L. (1989). Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41:530-539.

Levin M.J., da Silveira J.F., Frasch A.C.C., Camargo M.E., Lafon S., Degrave W.M. and Rangel-Aldao R. (1991). Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens and Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. FEMS Microbiol. Immunol. 89, 11-20.

Levin M.J., Vazquez M., Kaplan D. and Schljman A.G. (1993). The *Trypanosoma cruzi* ribosomal P protein family: Classification and antigenicity. Prasitol. Today. 9:381-384.

Levitus G., Hontebeyrie-Joskowicz M., van Regenmortel M.H. and Levin M.J. (1991). Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas' heart disease. Clin. exp. Immunol. 85:413-417.

Levitus G.L. (1991). Autoinmunidad humoral en la Enfermedad de Chagas crónica: Anticuerpos contra las proteínas ribosomales P. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Levy-Yeyati P., Bonnefoy S., Mirkin G., Kaplan D., Nigro F., Lafon S., Dedet J.P., Gonzalez-Cappa S.M., Hontebeyrie-Joskowicz M. and Levin M.J. (1991). The 70 KDa. heat shock protein is a major antigen in human *Trypanosoma cruzi-Leishmania braziliensis braziliensis* mixed infection. Immunol. Lett. 31:27-34.

Levy-Yeyati P. (1992). Antígenos del estadío tripomastigote sanguíneo de la cepa RA I de *Trypanosoma cruzi* y de la cepa boitron de *Leishmania braziliensis braziliensis*: Respuesta humoral anti-HSP70 en la Enfermedad de Chagas y Leishmaniasis. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Ley V., Robbins E.S., Nussenzweig V. and Andrews N.W. (1990) The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J. Exp. Med. 171:401-413.

Lichtenheld M.G., Olsen K.J., Lu P., Lowrey D.M., Hameed A., Hengartner H. and Podack E.R. (1988). Structure and function of human perforin. Nature 335:448-451.

Liew F.Y. (1990). Regulation of cell-mediated immunity in leishmaniasis. Curr. Topics Microbiol. Immunol. 55:53-64.

Liew F.Y. and O'Donnell C.A. (1993). Immunology of Leishmaniasis. In: Advances in Parasitol. 32:161-259

Lighthall G.K. and Giannini S.H. (1992). The chromosomes of *Leishmania*. Parasitol. Today 8(6):192-199.

Liljas A. (1982). Structural studies of ribosomes. Prog. Biophys. Mol. Biol. 40:161-228.

Lindquist S. (1986). The heat shock response. Annu. Rev. Biochem. 55:1151-1191.

Lindquist S. and Craig E.A. (1988). The heat shock proteins. Annu. Rev. Genet. 22:631-677.

Lohman K.L., Langer P.L.J. and Mc.Mahon-Pratt D. (1990). Molecular cloning and characterisation of the immunologically protective surface glycoprotein gp46/M2 of *Leishmania amazonensis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:8393-8397.

Lopez M., Montoya Y., Arana M., Cruzalegui F., Braga J., Llanos-Cuentas A., Romero G. and Arevalo J. (1988). The uses of non-radioactive DNA probes for the characterization of *Leishmania* isolates from Peru. Am. J. Trop. Med. Hyg. 38(2):308-314.

López M., Inga R., Cangalaya M., Echevarría J., Llanos-Cuentas A., Orrego C. and Arévalo J. (1993). Diagnosis of *Leishmania* using the polymerase chain reaction: A simplified procedure for field work. Am. J. Trop. Med. Hyg. 49:348-356.

López Bergami P. (1995). Immunopatología del daño cardiaco en la Enfermedad de Chagas. Estudio del rol de las proteínas ribosomales P. Seminario de Licenciatura. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Losavio A., Jones M.C., Sanz O.P., Mirkin G., González Cappa S.M., Muchnik S. and Sica R.E.P. (1989). A sequential study of the peripheral nervous system involvement in experimental Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg. 41: 539-547.

Lumbreras H. and Guerra H. (1985). Leishmaniasis in Perú. In: Chang K.P.& R.S. Bray (Eds.), Leishmaniasis, Elsevier, Amsterdam, pp. 297-311..

Llanos-Cuentas A. and Davies C. (1992). Epidemiological studies on Andean cutaneous leishmaniasis and their significance for designing a control strategy. In: Wijeyaratne P., Goodman T. & Espinal C. (Eds.) Leishmaniasis control strategies, p. 286-303, Mérida, IDRC.

Mc.Conville M.J., Bacic A., Mitchell G.F. and Handman E. (1987). Lipophosphoglycan of *Leishmania major* that vaccinates against cutaneous leishmaniasis contains an alkylglycerophosphoinositol lipid anchor. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84:8941-8952.

McConville M.J., Thomas-Oates J.E., Ferguson M.A.J. and Homans S.W. (1990). Structure of the lipophosphoglycan from *Leishmania major*. J. Biol. Chem. 265:19611-19621.

McConville M.J. and Blackwell J.M. (1991). Developmental changes in the glycosylated phosphatidilinositols of *Leishmania donovani*. J. Biol. Chem. 266:15170-15179.

Mc.Farlane J., Blaxter M.L., Bishop R.P., Miles M.A. and Kelly J. (1990). Identification and characterization of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70 kDa heat-shock protein family. Eur. J. Biochem. 190:377-384.

McNeely T.B., Rosen G., Londner M.V. and Turco S.J. (1989). Inhibitory effects on protein kinase C by lipophosphoglycan and glycosyl-phosphatidilinositol antigens of *Leishmania*. Bichem. J. 259:601-604.

Mallison D.J. and Coombs G.H. (1989) Biochemical characteristics of the metacyclic forms of *Leishmania major* and *Leishmania mexicana mexicana*. Parasitology. 98:7-15.

Manson-Bahr P.E.C. (1987). Diagnosis, p. 709-729. In W. Peters and R. Killick-Kendrick (ed.), The leishmaniasis in biology and medicine, vol. 2. Clinical aspects and control. Academic Press, Inc., New York.

Martins S.M., Hudson L., Krettli A., Cançado J.R. and Brener Z. (1985). Human and mouse serum recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *T. cruzi* infection. Clin. Exp. Immunol. 61:343-350.

Mauel R. and Behin R. (1987). Immunty: clinical and experimental. In: The Leishmaniasis Vol II. Academic Press Inc. London.

Mazza S. (1943). Comprobaciones de *Triatoma platensis*, *Euritriatoma oswaldoi*, *Pastrongylus seai* y *Psamulester coreodes* en la provincia de Santiago del Estero, todas ellas sobre la infestación por *T. cruzi*. Otros datos sobre infestación esquizotripanica natural silvestre de Triatoma infestans. Prensa Medica Arg. 30:1583-1595.

Medina-Acosta E., Karess R.E., Schwarz H. and Russell D.G. (1989). The promastigote surface protease (gp63) of *Leishmania* is expressed but differentially processed and localised in the amastigote stage. Mol. Biochem. Parasitol. 37:263-274.

Medina-Acosta E., Karess R.E. and Russell D.G. (1993). Structurally distinct genes for the surface protease of *Leishmania mexicana* are developmentally regulated. Mol. Biochem. Parasitol. 57:31-46.

Mendoça S.C.F., Russell D.G., Restom T.G. and Coutinho S.G. (1990). Human T cell proliferative response to *Leishmania braziliensis* lipophosphoglycan: fact or artefact? J. Immunol. Immunopharmacol. 10:188-189.

Mendoça S.C.F., Russell D.G. and Coutlnho S.G. (1991). Analysis of the human T cell responsiveness to purified antigens of *Leishmania*: lipophosphoglycan (LPG) and glycoprotein 63 (gp63). Clin. exp. Immunol. 83:472-478.

Mendoça-Previato L., Gorin P.A.J., Braga A.F., Scharfstein J. and Previato J.O. (1983). Chemical structure and antigenic aspects of complexes obtained from epimastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Biochemistry 22:4980-4987.

Mengistu G., Kiessling R. and Akuffo H. (1990). The value of a direct agglutination test in the diagnosis of cutaneous and visceral leishmaniasis in Ethiopia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84:359-362.

Mengistu G., Akuffo H., Fehniger T.E., Nagese Y. and Nilsen R. (1992). Comparison of parasitological and immunological methods in the diagnosis of leishmaniasis in Ethiopia. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 86:154-157.

Menzel S. and Bienzle U. (1978). Antibody response in patients with cutaneous leishmaniasis of the Old World. Tropenmedizin und Parasitologie 29:194-197.

Mesri E. A., Levitus G., Hontebeyrle-Joskowicz M., Dighiero G., Van Regenmortel M.H.V. & Levin M. J. (1990). Major Trypanosoma cruzi determinan in Chagas' heart disease shares homology with the systemic lupus erythematosus ribosomal P protein epitope. J. Clin. Microbiol. 28, 1219-1224.

Mesri E.A. (1990). Clonado y caracterización de antígenos de *Trypanosoma cruzi*. Diagnóstico serológico diferencial de distintas formas clínicas de la Enfermedad de Chagas. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Milon G., Del Giudice G. and Louis J.A. (1995). Immunobiology of experimental cutaneous leishmaniasis. Parasitol. Today 11:244-247.

Miller R.A., Reed S.G and Parsons M. (1990). *Leishmania* gp63 molecule implicated in cellular adhesion lacks an Arg-Gly-Asp sequence. Mol. Biochem. Parasitol. 39:267-274.

Minoprio P., Eisen H., Forni L., D'Imperio-Lima M.R., Joskowicz M. and Coutinho A. (1986). Polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. Quantitation of both T and B responses. Scand. J. Immunol. 24:661-668.

Minoprio P., Burlen O., Pereira P., Guilbert B., Hontebeyrie-Joskowicz M. and Coutinho A. (1988). Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. Scand. J. Immunol. 28:513.

Minoprio P., Bandeira A., Pereira P., Santos M.Y. and Coutinho A. (1989). Preferential expansion of Ly-1-B and $CD4^-$ $CD8^-$ T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. Int. Immunol. 1:116.

Minoprio P. (1991). Chagas'disease: CD5 B-cell dependent Th2 pathology? Res. Immunol. 142:137-140.

Moll H., Mitchell G.F., McConville M.J. and Handman E. (1989). Evidence for T-cell recognition in mice of a purified liphosphoglycan from *Leishmania major*. Infect. Immunol. 57:3349-3356.

Molyneux D.H. and Killick-Kendrick R. (1987) Morphology, ultraestructure and lifes cycles. In: The Leishmaniasis in biology and medicine. Edited by Peters W and Killick-Kendrick R. Academic Press, London. Vol. 1:121-176.

Moncayo A. and Luquetti A.O. (1990). Multicenter double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. Mem. Inst. Oswaldo Cruz

85:489-495.

Montoya Y.C. (1993). Molecular analysis of antigen genes in Peruvian Leishmaniasis. Doctoral Thesis. University of Cambridge.

Mortara R.A., Araguth M.F. and Yoshida N. (1988). Reactivity of stage-specific monoclonal antibody 1G7 with metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* strains: lytic property and 90.000 mol. wt. surface antigen polymorphism. Parasite Immunol. 10:369-378.

Nogeira N., Bianco C. and Cohn Z. (1975). Studies on selective lysis and purification of *T. cruzi*. J. Exp. Med. 142:224-232.

Nogeira N., Chaplan S., Tydings J.D., Unkeless J. and Cohn Z. (1981). *Trypanosoma cruzi*: Surface antigens of blood and culture forms. J. Exp. Med. 153:629-639.

Nogeira N., Unkeless J. and Cohn Z. (1982). Specific glycoprotein antigens on the surface of insect and mammalian stages of *Trypanosoma cruzi*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79:1259-1263.

Nogeira N. (1986). American trypanosomiasis: Antigens and host-parasite interactions. In: Parasite antigens toward new strategies for vaccines. TW Pearson Ed. Marcel Dekker Inc. New York. pag:91-110.

Norris K.A., Harth G. and So M. (1989). Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. Infect. Immun. 57:2372-2377.

North M.J., Mottram J.C. and Coombs G.H. (1990). Cysteine proteinases of parasitic protozoa. Parasitol. Today 6:270-275.

Orlandi P.A. and Turco S.J. (1987). Structure of the lipid moiety of the *Leishmania donovani* lipophosphoglycan. J. Biol. Chem. 262:10384-10391.

Ortega-Barria E. and Pereira M.E.A. (1991). A novel *T. cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineering bacteria and Trypanosomes into mammalian cells. Cell 67:411-421.

Ouaissi M.A., Cornette J., Afchain D., Capron A., Gras-Masse H. and Tartar A. (1986). *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. Science 234:603-607.

Ouaissi A. (1988). Role of the RGD sequence in parasite adhesion to host cells. Parasitol. Today 4(6):169-173.

Ouaissi M.A. and Capron A. (1989). Some aspects of protozoan parasite-host cell interactions with special reference to RGD-mediated recognition process. Microbial. Pathogenesis. 6:1-5.

Ouaissi A., Taibi A., Cornette J., Velge P., Marty B., Loyens M., Steva M., Rivzi F. and Capron A. (1990). Characterization of major surface and excretory-secretory immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of potential protective antigen. Parasitology 100:115-124.

Palma G. and Gutierrez Y. (1991). Laboratory diagnosis of *Leishmania*. Clin. Lab. Med. 11:909-922.

Paranhos G.S., Cotrim P.C., Mortara R.A., Rassi A., Corral R., Freilij H.L., Grinstein S., Wanderley J., Camargo M.E. and Franco Da Silveira J. (1990). *Trypanosoma cruzi*: cloning and expression of an antigen recognized by acute and chronic human chagasic sera. Exp. Parasitol. 71:284-293.

Perez J.E., Ogosuku E., Inga R., Lopez M., Monje J., Paz L., Nieto E., Arevalo J. and Guerra H. (1994). Natural *Leishmania* infection of *Lutzomyia* spp. in Peru. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 88:161-164.

Pérez J.E. (1995). Studies on *Lutzomyia* spp. vectors of Leishmaniasis in Peru. Doctoral Thesis, University of Liverpool.

Pessoa S.B. (1941). Segunda nota sobre a vacinacao preventiva na leishmaniose tegumentar americana con leptomonas mortas. Rev. Paul. Med. 19:1-9.

Petry K. and Eisen H. (1989). Chagas' disease: a model for the study of autoimmune disese. Parasitol. Today, 5: 111-121.

Petry K. and van Voorhis W.C. (1991). Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas'disease. Res. Immunol. 142:151-156.

Pimenta P.F.P., Saraiva E.M.B. and Sacks D.L. (1991). The comparative fine structure and surface glycoconjugate expression of three life stages of *Leishmania major*. Exp. Parasitol. 72:191-204.

Pimenta P.P., Turco S.J., McConville M.J., Lawyer P.G., Perkins P.V. and Sacks D.L. (1992). Stage-specific adhesion of the *Leishmania* promastigotes to the sandfly midgut. Science 256:1812-1815.

Plata F., Garcia-Pons F. and Wietzerbin J. (1987). Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant γ-IFN *in vivo* Ann. Inst. Pasteur Immunol. 138: 397-415.

Puentes S.M., Sacks D.L., Da Silva R.P. and Joiner K.A. (1988). Complement binding by two developmental stages of *Leishmania major* promastigotes varying in the expression of a surface lipophosphoglycan. J. Exp. Med. 167:887-902.

Puentes S.M., Da Silva R.P., Sacks D.L., Hammer C.H. and Joiner K.A. (1991). Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* is due to release of C5b-9. J. Immunol. 145:4311-4316.

Quijada L., Requena J.M., Soto M. and Alonso C. (1996). During canine viscero-cutaneous leishmaniasis the anti-hsp70 antibodies are specifically elicited by the parasite protein. Parasitology 112:277-284.

Ramamoorthy R., Donelson J.E., Paetz K., Maybodi M., Roberts S.C and Wilson M.E. (1992). Three distinct RNAs for the surface protease gp63 are differentially expressed during development of *Leishmania donovani chagasi* promastigotes to an infectious form. J. Biol. Chem. 2267:1888-1895.

Rangel E., De Souza N., Wermelinger E. and Barbosa A.F. (1984). Infecçao natural de *Lutzomyia intermedia* Lutz and Neiva, 1912, em área endémica de leishmaniose tegumentar no estado do Rio de Janeiro. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz, 79, 39.

Rangel-Aldao R., Comach G. and Mendoza A. (1987). *In vitro* translation of *T. cruzi* antigens recognised by human chagasic sera. J. Parasitol. 73:855-857.

Ranque J. and Qillici M. (1970). Recent advances in immunodiagnosis of leishmaniasis. J. Parasitol. 56 (II):277-278.

Reed S.G., Badaro R. and Cheri-Lloyd R.M. (1987). Identification of specific and cross-reactive antigens of *Leishmania donovani chagasi* recognized by human infection sera. J. Immunol. 126:1614-1618.

Reed S., Carvalho E.M., Sherbeert C.H., Pedral D.S., Russo D.M., Bacelar O., Pihl D.L., Scott J.M., Barral A., Grabstein K.K.H. and Johnson Jr. W.D. (1990). *In vitro* responses to *Leishmania* antigens by lymphocytes from patients with leishmaniasis or Chagas disease. J. Clin. Invest. 85:690-696.

Reed S.G., Shreffler W.G., Burns Jr. J.M., Scott J.M., Orge M.G., Ghalib H.W, Siddig M. and Badaro R. (1990). An improved serodiagnostic procedure for visceral leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 43:632-639.

Reed S.G. and Scott P. (1993). T cell and cytokine responses in leishmaniasis. In: Curr. Opinion Immunol. 5:524-531.

Reid K.B.M. (1986). Activation and control of the complement system. Essay Biochem. 2:69-75.

Requena J.M., López M.C., Jiménez-Ruiz A., Morales G. and Alonso C. (1989). Complete nucleotide sequence of the hsp70 gene of *T. cruzi*. Nucl. Acid. Res. 17:97.

Reyes M.B., Lorca M., Muñoz P. and Frasch A.C.C. (1990). Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2846-2850.

Rezende J.M. (1979). Clínica: Manifestaciones digestivas. En *Trypanosoma cruzi* e Doenças de Chagas. Brener Z. y Andrade Z. (Eds.) Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 312-361.

Ridley D.S., Marsden P.D., Cuba C.C. and Barreto A.C. (1980). A histological classification of mucocutaneous leishmaniasis in Brazil and its clinical evaluation. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 74:508-515.

Romagnani S. (1991). Human T_H1 and T_H2 subsets: doubt no more. Immunol. Today 12:256-257.

Romaña C. (1963). Enfermedad de Chagas. López Libreros Ed., Buenos Aires.

Romero G.G., Arana M., Lopez M., Montoya Y., Bohl R., Campos M., Arevalo J. and Llanos A. (1987). Characterization of *Leishmania* species from Peru. Trans. R. Soc.

Trop. Med. Hyg. 81:14-24.

Rosenbaum M.B. (1964) Chagasic myocardiopathy. Progr. Cardiovasc. Dis. 1:199-225.

Rucha R., Sampaio R., Guerra M., Magalhaes I., Cuba A., Barreto C. and Marsden P. (1983). Apparent glucantime failure in five patients with mucocutaneous leishmaniasis. Am. J. Trop. Med. Hyg. 83:131-134.

Ruiz A.M., Esteva M., Cabeza Meckert P., Laguens R.P. and Segura E.L. (1985). Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcelular fraction of *Trypanosoma cruzi.* Acta Trópica 42:299-309.

Ruiz A.M., Esteva M., Subías E., Moreno M., Campanini A.R., Velazquez E. and Segura E.L. (1990). Monoclonal antibodies against tha flagelar fraction of epimastogotes of *Trypanosoma cruzi.* Immunoprotection against metacyclic trypomastigotes obtained by immunization of mice with an affinity-purified antigen. Mol. Biochem. Parasitol. 39:117-126.

Russell D.G. and Alexander J. (1988). Effective immunization against cutaneous leishmaniasis with defined membrane antigens reconstituted into liposomes. J. Immunol. 140:1274-1279.

Russell D.G. and Talamas-Rohana P. (1989). *Leishmania* and the macrophage: A marriage of inconvenience. Immunol. Today 10:328-333.

Russo D.M., Burns Jr. J.M., Carvalho E.M., Armitage R.J., Grabstein K.H., Button L.L., Mc.Master W.R. and Reed S.G. (1991). Human T cell responses to gp63, a surface antigen of *Leishmania*. J. Immunol. 147:3575-3580.

Russo D.M., Turco S.J., Burns Jr. J.M. and Reed S.G. (1992). Stimulation of human T lymphocytes by *Leishmania* lipophosphoglycan-associated proteins .J Immunol 148:202-207.

Russomando G., Figueredo A., Almirón M., Sakamoto M. and Morita K. (1992). Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. J. Clin. Microbiol. 30:2864-2868.

Sacks D.L., Barral A. and Neva F. (1983). Am. J. Trop. Med. Hyg. 32:300-304.

Sacks D.L. (1989). Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. Exp. Parasitol. 69:10-12.

Sadigursky M., Acosta A.M. and Santos Buch C.A. (1982). Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *T. cruzi* clone. Am. J. Trop. Med. Hyg. 31:934-941.

Said G., Joskowicz M., Barreira A.A. and Eisen H. (1985). Neuropathy associated with experimental Chagas' disease. Ann. Neurol. 18:676-683.

Saiki R., Gelfand D., Stoffel S., Scharff S., Higuchi R., Horn G., Mullis K. and Ehrlich H. (1988). Primer directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science 239:487-491.

Salomón D., Gómez A. and Sosa S. (1992). Leishmaniasis en Argentina: Estudio multidisciplinario en Salta 1990/1992. XII Reunión Anual Sociedad Argentina de Protozoología. Buenos Aires.

Sambrook J., Fritsch E.F. and Maniatis T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Second Edition.

Sanger F., Nicklen S. and Coulsen A.R. (1977). DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:5463-5467.

Santos Buch C.A. and Texeira A.R.L. (1974). The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogeneic heart cells *in vitro*. J. Exp. Med. 140:38-53.

Scharfstein J., Martins Rodriguez M., Andrade Alves C., de Souza W., Previato J.O. and Mendoça-Previato L. (1983). *Trypanosoma cruzi*: Description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. J. Immunol. 131:972-976.

Scharfstein J., Schechter M., Senna M., Peralta J.M., Mendoça-Previato L. and Miles M.A. (1986). *Trypanosoma cruzi*: Characterization and isolation of a 57/51.000 m.w. surface glycoprotein (GP57/51) expressed by epimastigotes and bloodstream trypomastigotes. J. Immunol. 137:1336-1341.

Schenckman S., Jiang M.S., Harth G.W. and Nussenzweig V. (1991). A novel cell surface trans-sialidase of *T. cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. Cell 65:1117-1125.

Schlein Y., Schnur L.F. and Jacobson R.L. (1990). Release conjugate of indigenous *Leishmania major* enhance survival of a foreing *L. major* in *Phlebotomus papatasi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84:353-355.

Schmuñiz G. A. and Szarfman A. (1977). La Enfermedad de Chagas congénita. Medicina (Buenos Aires) 37: 47-53.

Schreffler W., Burns Jr. J., Badaro R., Ghalib H., Button L.L., Mc.Master R. and Reed S. (1993). Antibody responses of visceral leishmaniasis patients to gp63, a major surface glycoprotein of *Leishmania* species. J. Infect. Dis. 167:426-430.

Scott M.T. and Snary D. (1979). Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein. Nature 282:73-74.

Scott M.T., Neal R.A. and Woods N.C. (1985). Immunization of marmosets with *Trypanosoma cruzi* cell surface glycoprotein (GP90). Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 79:451-454.

Scott P. (1985). Parasite Immunol. 7:277-288.

Searle S., Campos A.J.R., Coulson R.M.R., Spithill T.W. and Smith D.F. (1989). A family of heat shock protein 70-related genes are expressed in the promastigotes of *Leishmania major*. Nucl. Acid Res. 17:5081-5095.

Searle S., McCrossan M.V. and Smith D.F. (1993a). Expression of a mitochondrial stress protein in the protozoan parasite *Leishmania major*. J. Cell. Sci. 104:1091-1100.

Searle S. and Smith D.F. (1993b). *Leishmania major*: Characterisation and expression of a citoplasmic stress-related protein. Exp. Parasitol. 77:43-52.

Segura E.L., Vasquez C.., Bronsina A, Campos J.M., Cerisola J.E. and Gonzalez-Cappa S.M. (1977). Antigens of the subcellular fractions of *T. cruzi* II. Flagellai and membrane fraction. J. Protozool. 24:540.

Segura E.L., Salomón O.D. and Sosa Estefani S. (1995). Control y estado actual de las endemias producidas por protozoarios en Argentina: leishmaniasis y paludismo. VII Congreso Argentino de Microbiología. Buenos Aires.

Shapira M. and Pinelli E. (1989). Heat shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis* is an abundant cytoplasmic protein with a tandemly repeated genomic arrangement. Eur. J. Biochem. 185:231-236.

Shapira M. and Pedraza G. (1990). Sequence analysis and transcriptional activation of heat shock protein 83 of *Leishmania mexicana amazonensis*. Mol. Biochem. Parasitol. 42:247-256.

Shinnick T.M. (1991). Heat shock proteins as antigens of bacterial and parasitic pathogens. In: Curr. Topics Microbiol. Immunol. 167:145-156.

Sica R.E., Filipini D., Panizza M., Fumo T., Baso S., Lazzari J. & Molina H.A. 1986. Involvement of the peripheral sensory nervous system in human chronic Chagas disease. Medicina (Buenos Aires) 46: 662-668.

Simpson L., Simpson A., Kidane M., Livingston L. and Spithill T.W. (1980). The kinetoplast DNA of the haemoflagellate protozoa. Am. J. Trop. Med. Hyg. 29(5)S:1053-1063.

Skeiky Y.A.W., Benson D.R., El Wasila M., Badaro R., Burns J.M. and Reed S.G. (1994). Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: Immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. Infect. Immunity 62:1643-1651.

Smejkal R.M., Wolff R. and Olenick J.G. (1988). *Leishmania braziliensis panamensis*: increased infectivity resulting from heat shock. Exp. Parasitol. 65:1-9.

Smith D.F., Searle S., Ready P.D., Gramiccia M. and Ben-Ismail R. (1989). A kinetoplast DNA probe diagnostic for *Leishmania major* sequence homologies between regions of *Leishmania* minicircles. Mol. Biochem. Parasitol. 37:213-224.

Smith D.B. and Johnson K.S. (1988). Single step expression of polypeptides expressed in *Escherichia coli* as fusions with glutathione S-transferase. Gene 67:31-40.

Snary D. and Hudson L. (1979). *Trypanosoma cruzi* cell surface proteins: identification of a major glycoprotein. FEBS Lett. 100:166-170.

Snary D., Ferguson M.A.J., Scott M.T. and Allen A.K. (1981). Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: use of monoclonal antibodies to identify and isolate an epimastigote specific glycoprotein. Mol. Biochem. Parasitol. 3:346-356.

Snary D. (1983). Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 77:126-129.

Soto M., Requena J.M. and Alonso C. (1993). Isolation, characterization and analysis of the expression of the *Leishmania* ribosomal P0 protein genes. Mol. Biochem. Parasitol. 61:265-274.

Soto M., Requena J.M., Garcia M., Gómez L.C., Navarrete I. and Alonso C. (1993). Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. J. Biol. Chem. 268:21835-21843.

Soto M., Requena J.M., Quijada L., Guzmán F., Patarroyo M.E. and Alonso C. (1995). Identification of the *Leishmania infantum* P0 ribosomal protein epitope in the canine visceral leishmaniasis. Immunol. Lett. 40:23-28.

Soto M., Requena J.M., Quijada L., Angel S.O., Gomez L.C., Guzmán F., Patarroyo M.E. and Alonso C. (1995). During viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. Clin. exp. Immunol. 100:246-252.

Southern E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol. 98:23-37.

Spithill T.W. and Samaras N. (1985). The molecular karyotype of *Leishmania major* and mapping of the α and β tubulin gene families to multiple unlinked chromosomal loci. Nucleic Acid Res. 13:4155-4169.

Stanley K.K. and Herz J. (1987). Topological mapping of complement component C9 by recombinant DNA techniques suggests a novel mechanism for its insertion into target membranes. EMBO J. 6:1951-1957.

Szarfman A., Terranova V.P., Renard S.L., Foidart J.M., Lima F.M., Scheinman J.I. and Martin G.R. (1982). Antibodies to laminin in Chagas' disease. J. Exp. Med.

155:1161-1171.

Tarleton R.L. (1990). Depletion of $CD8^+$ T cells increase susceptibility and reverses vaccine induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. 144:717-724.

Teixeira A.R.L. and Santos Buch C.A. (1974). The immunology of experimental Chagas' disease. I. Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. J. Immunol. 113:858-868.

Texeira A.R.L. and Santos Buch C.A. (1974). The immunolgy of experimental Chagas' disease. I. Preparacion of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. J. Immunol. 113:859-868.

Teixeira A.R.L., Teixeira M.L., Santos Buch C.A. (1975). The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those on chronic Chagas' disease in man. Am. J. Pathol. 80:163-180.

Towbin H., Staehlin T. and Gordon J. (1977). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrcellulose sheets: Procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76:4350-4354.

Trischmann T.M. (1983). Non-antibody mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. J. Immunol. 130:1953-1957.

Turco S.J. (1988). The lipophosphoglycan of *Leishmania*. Parasitol. Today 4:255-257.

Ulysses de Carvalho T.M. and De Souza W. (1989). Early events related with the behaviour of *Trypanosoma cruzi* within an endocytic vacuole in mouse peritoneal macrophages. Cell. Struct. Funct. 14:383-392.

Van Voorhis W.C. and Eisen H. (1989). F1-160: a surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. J. Exp. Med. 169:641-652.

Velez L.R. (1913). [*Leishmania peruviana*, agent of uta]. Bulletin de la Societé de Pathologié Exotiqué, 6, 545.

Villalba E. and Ramlrez J.L. (1982). Ribosomal DNA of *Leishmania braziliensis*: Number of ribosomal copies and gene isolation. J. Protozool. 29:438-441.

Wallace G.R., Ball A.E., Mc.Farlane J., El Safi S.H., Miles M.A. and Kelly J. (1992). Mapping of a visceral leishmaniasis-specific inmunodominant B-cell epitope of *Leishmania donovani* hsp70. Infect. Immun. 60:2688-2693.

Walton B.C. (1970). The indirect fluorescent antibody test for evaluation of effectiveness of chemotherapy in American leishmaniasis. J. Parasitol. 56 (Sect. II):480.

Walton B.C., Brooks W.H and Arjona I. (1972). Serodiagnosis of American leishmaniasis by indirect fluorescent antibody test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 21:296-299.

Walton B.C., Shaw J.J. and Lainson R. (1977). Observations on the *in vitro* cultivation of *Leishmania braziliensis*. J. Parasitol. 63:1118-1119.

Wallbanks K.R., Ingram G.A. and Molyneux D.H. (1986). The agglutination of erythrocytes and *Leishmania* parasites by sandfly gut extracts: evidence for lectin activity. Trop. Med. Parasitol. 37:409-413.

Webb J.R., Button L.L and McMaster W.R. (1991). Heterogeneity of the genes encoding the major surface glycoprotein of *Leishmania donovani*. Mol. Biochem. Parasitol. 48:173-184.

Weigle K.A., Valderrama L., Arias A.L., Santrich C. and Saravia N.G. (1991). Leishmanin skin test standarization and evaluation of safety, dose, storage, longevity of

reaction and sensitization. Am. J. Trop. Med. Hyg. 44:260-271.

Weiss P. (1943). Epidemiología y clínica de las leishmaniosis tegumentarias en el Perú. Revista de Medicina Experimental 2:209-247.

Wesley R.D. and Simpson L. (1973). Studies on kinetoplast DNA. III Kinetic complexity of kinetoplast and nuclear DNA from *Leishmania tarentolae*. Biochim. Biophys. Acta 319:267-280.

World Health Organization (1975-94). Twelfth Programme report, UNDP/World Bank/WHO (TDR).

World Health Organization. (1982). Report of the Informal Meeting on the Chemotherapy of Visceral Leishmaniasis. TDR/CHEMLEISH/VI82.3 World Health Organization, Geneva.

World Health Organization Expert Committee. (1990) Control of the Leishmaniasis. Tech. Rep. Ser. 793. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization. (1991). Tropical diseases. Progress in research, 1989-1990, p:79-87. In TDR Tenth Programme Report . World Health Organization, Geneva.

Yang D.M., Fairweather N., Button L.L., Mc.Master L.L., Kahl L.P. and Lew F.Y. (1990). Oral *Salmonella typhimurium* (Aro A$^-$) vaccine expressing a major leishmanial surface protein (gp63) preferentially induces T helper 1 cells and protective immunity against leishmaniasis. J. Immunol. 145:2281-2285.

Yoshida N., Mortara R.A., Araguth M.F., González J. and Russo M. (1989). Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kDa surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun. 57:1663-1667.

Zijlstra E.E., Ali Siddig M., El-Hassen A.M., El-Toum J.A., Satti M., Ghalib H.W and Kager P.A. (1992). Kala-azar: a comparative study of parasitological methods and the direct agglutination test in diagnosis. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg. 86:505-507.

Zingales B., Martin N.F., Lederkremer L.M. and Colli W. (1982). Endogenous and surface labelling of glycoconjugates from three differentiation stages of *T. cruzi*. FEBS Lett. 142:338-342.

Zingales B. and Colli W. (1985). *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. Curr. Trop. Immunol. 117:129-152.

Zingales B., Gruber A., Ramalho C.B., Umezawa E.S. and Colli W. (1990). Use of two recombinant proteins of *Trypanosoma cruzi* in the serological diagnosis of Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 85:519-522.

APÉNDICE

Anexo 1

Reactividad de diferentes sueros humanos contra U4 determinada por ELISA.

1) Pacientes con Leishmaniasis Cutánea (N=34)

Cutáneos Andinos (Uta) (N=23)

Suero	Proc.	DO	d	
458	P	0,11	2,8	-
460	P	0,08	1,3	-
463	P	0,11	2,8	-
464	P	0,15	4,3	+
470	P	0,08	1,3	-
634	P	0,08	1,4	-
638	P	0,06	0,6	-
703	P	0,08	1,4	-
919	P	0,32	10,9	++
927	P	0,12	3,0	+
937	P	0,21	6,2	+
943	P	0,11	2,2	-
958	P	0,18	5,4	+
961	P	0,16	4,6	+
965	P	0,16	4,6	+
1073	P	0,06	0,6	-
1105	P	0,00	-1,8	-
1115	P	0,22	7,0	+
1119	P	0,10	2,2	-
1122	P	0,00	-1,8	-
1136	P	0,10	2,2	-
1144	P	0,06	0,6	-
595241	P	0,00	-1,8	-

X = 0,044
SD = 0,025
CUT OFF = 0,119

Cutáneos Selváticos (N=11)

Suero	Proc.	DO	d	
271	P	0,03	-0,6	-
343	P	0,10	2,2	-
639	P	0,00	-1,8	-
903	P	0,25	8,2	+
941	P	0,11	2,6	-
956	P	0,62	23,0	++++
980	P	0,13	3,4	+
1102	P	0,08	1,8	-
1125	P	0,06	0,6	-
1129	P	0,30	10,2	++
1154	P	0,00	-1,8	-

2) Pacientes con Leishmaniasis mucocutánea (N=45)

Suero	Proc.	DO	d	
2	P	0,85	23,4	++++
68	P	1,55	44,0	++++
140	P	2,54	73,1	++++
143	P	3,35	97,0	++++
144	P	1,59	45,2	++++
147	P	2,39	68,7	++++
148	P	2,89	83,4	++++
150	P	0,65	17,6	+++
156	P	1,12	33,7	++++
164	P	2,03	97,0	++++
165	P	3,18	92,0	++++
512	P	0,07	0,5	-
617	P	0,44	11,4	++
625	P	1,59	45,2	++++
652	P	0,10	1,4	-
805	P	0,94	20,6	+++
917	P	2,50	72,0	++++
929	P	1,79	51,1	++++
931	P	3,02	87,3	++++
939	P	2,29	65,8	++++
942	P	1,59	45,2	++++
979	P	0,00	-1,6	-
1090	P	1,67	47,6	++++
1093	P	0,55	14,6	++
1130	P	0,03	-0,7	-
1178	P	0,05	0,0	-
QE	P	0,29	7,0	+
PH	P	2,01	57,6	++++
ST	P	3,00	86,7	++++
TT	P	3,26	94,3	++++
AL	B	0,10	1,4	-
CA	B	2,95	85,2	++++
CM	B	1,76	50,3	++++
CO	B	0,06	0,3	-
CR	B	2,75	79,3	++++
L2	B	1,53	43,4	++++
NE	B	0,71	19,3	+++
PA	B	1,24	34,9	++++
PM	B	3,09	89,3	++++
QI	B	3,03	87,6	++++
RD	B	3,17	91,7	++++
RQ	B	1,84	52,6	++++
RU	B	1,21	34,0	++++
TA	B	1,30	36,7	++++
TR	B	2,21	63,4	++++

X = 0,053
SD = 0,034
CUT OFF = 0,155

3) Pacientes con infección mixta (N=5)

Suero	Proc.	DO	d	
SR	B	0,94	35,8	++++
HA	B	0,06	0,6	-
LCH	B	1,08	41,4	++++
CB	B	0,07	1,0	-
FR	B	1,59	61,8	++++

X = 0,044
SD = 0,025
CUT OFF = 0,119

4) Pacientes chagásicos crónicos (N=45)

Suero	Proc.	DO	d	
-4	A	0,27	5,5	+
-5	A	0,04	-1,2	-
-6	A	0,05	0,0	-
-9	A	0,33	7,0	+
-19	A	0,10	1,3	-
-24	A	0,03	-0,5	-
-28	A	0,12	1,8	-
-35	A	0,06	0,3	-
2	A	0,33	7,0	+
6	A	0,05	0,0	-
9	A	0,28	5,8	+
12	A	0,07	0,5	-
13	A	0,00	-1,3	-
14	A	0,02	-0,8	-
15	A	0,03	-0,5	-
18	A	0,07	0,5	-
21	A	0,05	0,0	-
22	A	0,06	0,3	-
23	A	0,25	5,0	+
26	A	0,00	-1,3	-
27	A	0,05	0,0	-
28	A	0,19	3,5	+
31	A	0,04	-0,3	-
33	A	0,09	1,0	-
35	A	0,06	0,3	-
36	A	0,10	1,3	-
39	A	0,00	-1,3	-
40	A	0,23	4,5	+
41	A	0,12	1,8	-
42	A	0,05	0,0	-
47	A	0,02	-0,8	-
48	A	0,09	1,0	-
52	A	0,12	1,8	-
55	A	0,03	-0,5	-
56	A	0,02	-0,8	-
67	A	0,00	-1,3	-
75	A	0,07	0,5	-
76	A	0,00	-1,3	-
79	A	0,07	0,4	-
80	A	0,11	1,4	-
81	A	0,00	-1,3	-
82	A	0,06	0,3	-

X = 0,050
SD = 0,040
CUT OFF = 0,17

83	A	0,07	0,5	-
PG	A	0,07	0,5	-
MS	A	0,25	5,1	+

5) Pacientes con enfermedades no relacionadas (N=28)

Suero	Proc.	DO	d	
M1	P	0,08	2,5	-
M3	P	0,04	0,5	-
M5	P	0,02	-0,5	-
M11	P	0,06	1,5	-
M12	P	0,16	6,5	+
M13	P	0,05	1,0	-
M16	P	0,04	0,5	-
M17	P	0,00	-1,5	-
M18	P	0,06	1,5	-
M19	P	0,05	1,0	-
L42	P	0,00	-1,5	-
L56	P	0,09	3,0	+
L58	P	0,00	-1,5	-
L60	P	0,01	-1,0	-
L78	P	0,02	-0,5	-
L88	P	0,00	-1,5	-
L91	P	0,00	-1,5	-
L99	P	0,02	-0,5	-
L107	P	0,06	1,5	-
L116	P	0,00	-1,5	-
TB158	P	0,03	0,0	-
TB172	P	0,00	-1,5	-
TB179	P	0,04	0,5	-
TB181	P	0,02	-0,5	-
TB207	P	0,02	-0,5	-
TXMA	P	0,00	-1,5	-
TXSA	P	0,00	-1,5	-
TX2049	P	0,00	-1,5	-

X = 0,030
SD = 0,020
CUT OFF = 0,09

Proc.: procedencia; **P**: Perú; **B**: Bolivia; A: Argentina; **M**: Malaria; **L**: Lepra; **TB**: Tuberculosis; **TX**: Toxoplasmosis. **DO**: Densidad óptica; **x**: DO media obtenida para el grupo de sueros normales (N=11). **DS**: Desviación Standard obtenida para el grupo de sueros normales (N=11). **Cut off**: Línea de corte definida como x + 3DS; **d** se define según: DO= x + dDS. **(-)**: DO< x + 3DS; **(+)**: x + 3DS≤ x + 9DS; **(++)**: x + 9DS≤ DO < x + 15DS; **(+++)**: x + 15DS≤ DO < x + 21DS; **(++++)**: x + 21DS≤ DO.

Anexo 2

Reactividad de diferentes sueros humanos contra los recombinantes U4, Lbb1, RA1, JL5, JL7, JL52, LbP y LpP por el Ensayo de Placa de Lisis (EPL).

1) Pacientes con Leishmaniasis Cutánea

Cutáneos andinos (Uta) (N=13)

Suero	U4	Lbb1	RA1	L.L	L.Tc	JL5	JL7	JL52	LbP	LpP
919	+	-		+	+			+		
927	-	-		-	-			-		
937	-	-		-	-			-		
943	-	-		-	-			-		
958	-	-		-	-			-		
961	+	+		+	-			-		
965	-	-		-	-			-		
1105	-	-		-	-			-		
1115	-	-		-	-			-		
1119	-	-		-	-			-		
1122	-	-		-	-			-		
1136	-	-		-	-			-		
5952	-	-		-	-			-		

Cutáneos selváticos (N=12)

Suero	U4	Lbb1	RA1	L.L	L.Tc.	JL5	JL7	JL52	LbP	LpP
271	+	-	-	-						
343	+	+	+	-						
635	-	-	-	-						
639	+	-	-	-						
903	+	-	-	-						
941	-	-	-	-						
956	++	++	+	+						
980	-	-	-	-						
1102	-	-	-	-						
1125	-	-	-	-						
1129	-	-	-	-						
1154	-	-	-	-						

2) Pacientes con Leishmaniasis mucocutánea (N=45):

Suero	U4	Lbb1	RA1	L.L	L.Tc.	JL5	JL7	JL52	LbP	LpP
2	++	+	+	+	-			-	-	-
68	++	++	+	+	-			-	-	-
140	++	++	+	+	-			+	-	-
143	+++	++	++	++	+			-	-	-
144	+	+	+	+	-			-	-	-
147	++	++	+	+	-			++	++	++
148	++	++	+	+	-			+	-	-
150	++	+	+	+	-			-	-	-
156	++	++	+	+	+			-	-	-
164	++	++	+	+	-			+	-	-
165	++	++	+	+	-			++	-	-
512	-	-	-	+	-			-	-	-
617	+	+	-	+	-			-	-	-
625	++	++	-	+	-			++	-	-
652	+	+	-	+	-			-	-	-
805	+	+	-	+	-			-	-	-
917	+++	++	-	+	-			+	-	-
929	++	++	+	+	-			+	-	-
931	++	++	+	++	+			-	-	-
939	+++	++	+	+	+			+	-	+
942	++	++	+	+	-			-	-	-
979	-	-	-	+	+			+	-	-
1090	++	+	+	+	-			-	-	-
1093	+	+	-	+	-			-	-	-
1130	+	+	+	+	-			-	-	
1178	-	-	-	-	-			-	-	-
PH	+++	++	+	+	+			-	-	-
ST	++	++	+	+	-			+	-	-
TT	++	++	+	+	-			+	-	-
AL	-	-	-	-	-			-	-	-
CA	++	++	+	+	-			-	-	-
CM	++	++	+	+	-			-	-	-
CO	++	++	+	+	-			-	-	-
CR	++	+	-	+	-			-	-	-
L2	-	-	-	+	-			-	-	-
NE	+	+	-	+	-			-	-	-
PA	++	++	++	+	-			-	-	-
PM	+++	++	++	++	+			-	-	-
QI	+	+	+	+	-			+	+	+
RD	++	++	+	+	-			++	-	-
RQ	+	+	-	+	-			-	-	-
RU	+	-	-	+	-			-	-	-
TA	+	+	-	+	-			-	-	-
TR	+	+	+	+	-			-	-	-

3) Pacientes con la infección mixta Espundia/Enfermedad de Chagas (N=6)

Suero	U4	Lbb1	RA1	L.L	L.Tc	JL5	JL7	JL52	LbP	LpP
SR	++++	+++	++	++		-	-	++		+
HA	-	-	-	-		+	++	+		-
LCH	++	++	+	+		+	+	-		-
CB	+	+	+	+		-	-	-		-
FR	++	++	-	+		-	-	-		-
LSH	++	+	+	+		-	-	-		-

Anexo 3

Datos clínicos de los pacientes con Leishmaniasis mucocutánea, cutánea andina y cutánea selvática provenientes de distintas regiones del Perú.

Cód.	Proced.	Lesión	Enferm.	Fecha	DTH	Observaciones
140	Cuzco	1	Mucosa	2/9/90	Positivo	1 cicatriz cutánea
143	Cuzco	2	Mucosa	21/9/90	Positivo	
144	Cuzco	2	Mucosa	21/9/90	Positivo	
145	Cuzco	2	Mucosa	21/9/90	Positivo	
147	Cuzco	1	Mucosa	21/9/90	Positivo	
148	Cuzco	1	Mucosa	21/9/90	Positivo	
167	Cuzco	1	Mucosa	18/2/92	Positivo	Lesiones paladar
805	M. de Dios	2	Mucosa	7/3/90	6x6	2 cicatrices
903	M. de Dios	1	Cut. Selv.	25/7/90	13x12	
917	M. de Dios	1	Mucosa	1/8/90	17x14	4 cicatrices
924	Huánuco		Mucosa	2/1/91	6x5	
931	M. de Dios	1	Mucosa	1/9/90	N.D	2 cicatrices
939	Ting. Maria	1	Mucosa	12/9/90	5x5	1 cicatriz
942	M. de Dios	1	Mucosa	19/9/90	Positivo	
956	M. de Dios	3	Cut. Selv.	26/9/90	Positivo	
979	M. de Dios	2	Cut. Selv.	17/10/90	N.D	

980	Cuzco	1	Cut. Selv.	17/10/90	9x9	
988	Cuzco	1	Mucosa	21/11/90	Negativo	
1090	Huánuco		Mucosa	19/6/91	15x12	
1093	M. de Dios	2	Mucosa	19/6/91	N.D	1 cicatriz
1121	Lima		Cut. And.	11/9/91	21x18	les. múltiiples

Anexo 4

1) Uso de codones de las hsp70 de *Leishmania* spp.

Codón	Aminoácido	Número	% de uso
TTT	F	1	20
TTC	F	4	80
AGT	S	-	-
AGC	S	13	38,24
TCT	S	-	-
TCC	S	13	38,24
TCA	S	-	-
TCG	S	8	23,52
TAT	Y	-	-
TAC	Y	11	100
TAA	Stop	-	-
TAG	Stop	2	100
TGA	Stop	-	-
TGT	C	-	-
TGC	C	3	100
TGG	W	2	100
CTT	L	-	-
CTC	L	-	-
CTA	L	-	-
CTG	L	21	91,30
TTA	L	-	-
TTG	L	2	8,70
CCT	P		-
CCC	P	4	26,67
CCA	P	1	6,67
CCG	P	10	66,66
CAT	H	2	33,33
CAC	H	4	66,67
CAA	Q	1	6,25
CAG	Q	15	93,75
CGT	R	-	-
CGC	R	11	73,34

CGA	R	2	13,33
CGG	R	-	-
AGA	R	-	-
AGG	R	2	13,33
ATT	I	-	-
ATC	I	16	100
ATA	I	-	-
ATG	M	21	100
ACT	T	-	-
ACC	T	8	42,10
ACA	T	2	10,53
ACG	T	9	47,37
AAT	N	-	-
AAC	N	27	100
AAA	K	-	-
AAG	K	28	100
GTT	V	-	-
GTC	V	7	41,18
GTA	V	-	-
GTG	V	10	58,82
GCT	A	-	-
GCC	A	8	22,86
GCA	A	-	-
GCG	A	27	77,14
GAT	D	2	7,69
GAC	D	24	92,31
GAA	E	1	2,5
GAG	E	39	97,5
GGT	G	8	18,18
GGC	G	34	77,27
GGA	G	2	4,55
GGG	G	-	-

2) Composición de bases por posición

Posición	% G	% A	% T	% C
Primera	**40,00**	31,11	11,36	17,53
Segunda	19,01	**38,52**	20,25	22,22
Tercera	**48,39**	2,22	3,21	**46,18**
Total	35,80	23,95	11,61	28,64

Anexo 5

1) Uso de codones de las proteínas ribosomales de tipo P2 de *Leishmania* spp.

Codón	Aminoácido	Número	% de uso
TTT	F	2	22,22
TTC	F	7	77,78
AGT	S	1	5,26
AGC	S	4	21,05
TCT	S	6	31,58
TCC	S	4	21,05
TCA	S	1	5,26
TCG	S	3	15,79
TAT	Y	-	-
TAC	Y	2	100
TAA	Stop	3	100
TAG	Stop	-	-
TGA	Stop	-	-
TGT	C	-	-
TGC	C	1	100
TGG	W	-	-
CTT	L	-	-
CTC	L	3	27,27
CTA	L	-	-
CTG	L	8	72,73
TTA	L	-	-
TTG	L	-	-
CCT	P	-	-
CCC	P	5	45,45
CCA	P	1	9,09
CCG	P	5	45,45
CAT	H	-	-
CAC	H	1	100
CAA	Q	1	50
CAG	Q	1	50
CGT	R	-	-
CGC	R	3	75
CGA	R	-	-
CGG	R	-	-
AGA	R	-	-
AGG	R	1	25
ATT	I	-	-
ATC	I	5	100
ATA	I	-	-
ATG	M	10	100
ACT	T	2	22,22
ACC	T	4	44,44
ACA	T	-	-

ACG	T	3	33,33
AAT	N	-	-
AAC	N	1	100
AAA	K	-	-
AAG	K	16	100
GTT	V	1	7,14
GTC	V	4	28,57
GTA	V	1	7,14
GTG	V	8	57,14
GCT	A	13	19,70
GCC	A	26	39,39
GCA	A	3	4,55
GCG	A	24	36,36
GAT	D	6	35,29
GAC	D	11	64,71
GAA	E	1	4,17
GAG	E	23	95,83
GGT	G	5	26,32
GGC	G	12	63,16
GGA	G	1	5,26
GGG	G	1	5,26

2) Composición de bases por posición

Posición	% G	% A	% T	% C
Primera	**57,38**	19,26	11,88	11,48
Segunda	11,89	27,05	20,08	**40,98**
Tercera	**42,21**	4,92	14,75	**38,11**
Total	37,16	17,08	15,57	30,19