

CARACTERIZACIÓN E INMUNOREACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA ACÍDICA RIBOSOMAL P2 β DE *L. (V.) braziliensis*

Carlos Padilla R¹, Ysabel Montoya P¹.

¹División de Biología Molecular. Centro Nacional de Salud Pública. Instituto Nacional de Salud. Lima, Perú.

RESUMEN

Introducción: El diagnóstico serológico de la leishmaniasis usando proteínas totales presenta reacciones cruzadas. La caracterización de nuevos antígenos de *Leishmania* mejorará el uso de herramientas serológicas en el diagnóstico de esta enfermedad. **Objetivo:** Caracterizar un nuevo antígeno de *Leishmania*. **Materiales y métodos:** Se seleccionó el bacteriófago T166-U19 de una biblioteca de cADN de *L. (V.) braziliensis* el cual es reactivo a mezclas de sueros de leishmaniasis cutánea y mucocutánea. El cADN del clon T166-U19 fue subclonado en el plásmido pGEX, luego secuenciado y la proteína recombinante fue expresada. La reactividad de esta proteína recombinante se evaluó por ELISA. **Resultados:** El cADN del clon T166-U19 presentó un marco de lectura abierto de 318 pb que traduce una proteína de 105 aminoácidos con 81,1%, 82,9% y 60,7% de identidad total con la proteína ácida ribosomal LiP de *L. (L.) infantum*, P2 de *L. (L.) donovani*, y P2 de *T. cruzi*, respectivamente. Además, la proteína recombinante presentó baja reactividad (50%) con sueros de pacientes con leishmaniasis, mientras que presentó reactividad cruzada con sueros de pacientes chagásicos. **Conclusiones:** Se caracterizó por primera vez la proteína ácida ribosomal P2 β de *L. (V.) braziliensis*, y presentando baja reactividad con sueros de pacientes con leishmaniasis.

Palabras clave: Proteínas ribosomales; Leishmania braziliensis; Leishmaniasis (Fuente: BIREME)

ABSTRACT

Introduction: The serologic diagnosis of leishmaniasis using total proteins shows cross reactions. The characterization of new *Leishmania* antigens will improve the use of serological tools for the diagnosis of this disease. **Objective:** To characterize a new antigen of *Leishmania*. **Materials and methods:** the T166-U19 bacteriophage was characterized from a cDNA *L. (V.) braziliensis* library which reacted against pooled sera from patients with cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. The T166-U19 cDNA clone was subcloned in a pGEX plasmid, sequenced, and the recombinant protein was expressed. The reactivity of this recombinant protein was assessed by ELISA. **Results:** The T166-U19 cDNA clone contained a 318-bp open reading frame (ORF) encoding 105 amino acid residues which has 81,1%, 82,9% and 60,7% identity with *L. (L.) infantum* LiP, *L. (L.) donovani* P2, and *T. cruzi* P2, respectively. Furthermore, the recombinant protein showed low reactivity (50%) with sera from patients with Leishmaniasis and it has cross-reactivity against sera from patients with Chagas disease. **Conclusion:** the P2 β acidic ribosomal protein of *L. (V.) braziliensis* has been characterized for the first time and it has shown low reactivity against sera from patient with leishmaniasis.

Key words: Ribosomal proteins; Leishmania braziliensis; Leishmaniasis (Source: BIREME)

INTRODUCCIÓN

Leishmaniasis es un conjunto de enfermedades transmitidas por picadura de mosquito y causada por protozoarios kinetoplastidos del género *Leishmania*. Estas enfermedades se caracterizan por presentar un amplio espectro de manifestaciones clínicas que abarca desde heridas cutáneas autocurables hasta compromiso visceral grave. Estas enfermedades son transmitidas por la picadura de mosquitos flebótomos¹.

La leishmaniasis es endémica en 88 países en 4 continentes, de los cuales 16 están en vías de desarrollo. Existe aproximadamente de 12 a 14 millones de personas infectadas en el mundo y 350 millones de personas que viven en esos países están en riesgo de contraer la enfermedad, de los cuales 2 millones se infectarán anualmente. Más de 90% de los casos de leishmaniasis cutánea ocurren en Irán, Afganistán, Nepal, Siria, Arabia Saudita, Brasil y Perú. Mientras que 90% de casos de leishmaniasis visceral ocurren en Bangladesh, Brasil, India y Sudán¹.

La leishmaniasis está ampliamente distribuida en el Perú; las únicas direcciones de salud que no reportaron casos de leishmaniasis en 1999 fueron Huancavelica, Moquegua y Tacna².

Un criterio fundamental para el diagnóstico de la leishmaniasis es la demostración de la presencia del parásito. Los parásitos pueden detectarse usando frotis directo, cultivo, histopatología, inoculación en animales y la prueba de PCR^{2,3}. Las pruebas serológicas apoyan el diagnóstico de la leishmaniasis, siendo las más importantes la leishmanina o test de Montenegro, el ELISA con antígeno total, y la inmunofluorescencia indirecta⁴⁻⁹. Sin embargo, el principal problema de las pruebas serológicas es su reacción cruzada.

Con el objetivo de mejorar la especificidad de las pruebas serológicas para el diagnóstico de la leishmaniasis, en los últimos años se ha seleccionado y caracterizado antígenos recombinantes a partir de bibliotecas de expresión de *Leishmania* usando para su selección sueros de pacientes con leishmaniasis⁹⁻¹³. Estos antígenos recombinantes han demostrado que pueden ser útiles para el diagnóstico de la leishmaniasis.

Correspondencia: Carlos P. Padilla Rojas. División de Biología Molecular Instituto Nacional de Salud.
Dirección: Cápac Yupanqui 1400 Jesús María, Lima, Perú
Teléfono: (511) 4719920 Anexo 129. Fax: (511) 4710179.
Correo electrónico: cpadilla@ins.gob.pe

Entre los principales antígenos clonados y caracterizados de *Leishmania* están las proteínas ácidas ribosomales P¹⁴, la leishmanolisina o gp63¹⁵, las histonas⁹, la familia de las proteínas de shock térmico^{9,16}, la cistein proteinasas¹⁷ y el antígeno K39¹⁸.

En tripanosomátidos se ha reportado el aislamiento de proteínas ácidas ribosomales P debido a que son antigénicas. En *L. (L.) infantum*, se ha descrito que las proteínas ácidas ribosomales P2 alfa y P2 beta (LiP' y LiP, respectivamente) son inmunogénicas en perros naturalmente infectados¹⁹. También se han descrito las secuencias parciales de las proteínas ácidas P2 alfa y P2 beta de *L. (V.) peruviana*, estas proteínas presentan reactividad frente a sueros de leishmaniosis²⁰.

Con el propósito de identificar nuevos antígenos para el diagnóstico de la leishmaniosis se seleccionó, identificó y caracterizó la proteína ácida ribosomal P2 β de *L. (V.) braziliensis*.

MATERIALES Y MÉTODOS

BACTERIOFAGOS Y SUEROS

El bacteriófago T166-U19 proviene de una biblioteca (22 clones) de fragmentos de cADN de *L. (V.) braziliensis* cepa LH166 en el vector λgt11, este bacteriófago fue seleccionado por su reactividad con una mezcla de sueros de leishmaniasis cutánea y mucocutánea mediante la técnica de infección de bacteriófagos sobre placas de *E. coli* cepa Y1090¹¹ (Datos no presentados). Estos bacteriófagos fueron replicados y conservados según procedimientos ya reportados⁹⁻¹³.

18 sueros de personas con leishmaniasis cutánea (5 sueros) o mucocutánea (13 sueros) fueron colectados en el Instituto Nacional de Salud y el Instituto de Medicina Tropical «Alexander Von Humboldt», Lima, Perú. En todos los casos, la infección por *Leishmania sp* fue determinada por signos clínicos, y confirmación de positividad a ELISA con proteínas totales.

8 sueros de personas con la enfermedad de Chagas provenientes de Arequipa fueron obtenidas de la seroteca del Instituto Nacional de Salud, Lima, Perú. Adicionalmente, 10 sueros de personas clínicamente sanas fueron usados como controles negativos.

AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS cADN POR PCR

Con el propósito de subclonar el fragmento de cADN del bacteriófago T166-U19, se amplificó este cADN por PCR según procedimiento ya reportados⁹⁻¹³ con ligeras modificaciones. Para ello, se utilizó 20 ng de ADN de bacteriófago, buffer de amplificación (50 mM KCl; 10 mM Tris.Cl pH 8,3; 0,1% gelatina), oligonucleótidos λgt11F (5'-GGTGGCGACGACTCCTGGAGCCCG-3') y λgt11R (5'-TTGACACCAGACCAAC TGCTAATG-3') a una concentración final de 0,2 μmoles/μL, 0,5 unidades por tubo de reacción de ADN polimerasa termoestable, mezcla de nucleótidos (dNTPs) a una concentración final de 0,2 mM, MgCl₂ a una concentración final de 1,5 mM y agua tridestilada. Además, a cada tubo de reacción se añadió aceite mineral. Cada ensayo de PCR fue realizado con sus respectivo control de amplificación positivo y control de la contaminación del sistema.

El programa de ciclos de temperatura usado fue: denaturación inicial de 95°C por 5 minutos, 30 ciclos de amplificación (una denaturación de 95°C por 30 segundos, una temperatura de hibridación de los primers de 58°C por 1,5 minutos, y una extensión de 72°C por 1,5 minutos) y una extensión final de 72°C por 10 minutos. Finalmente, las reacciones de amplificación fueron analizadas por electroforesis en geles de agarosa al 1%.

SUBCLONAMIENTO CADN EN pGEX

El fragmento amplificado del bacteriófago T166-U19 fue digerido con la endonucleasa EcoRI, para eliminar los extremos del producto de amplificación innecesarios. Para la reacción de ligación se usó un kit de ligación comercial (Stratagene Co., CA, USA) según recomendaciones de los fabricantes, esta reacción contenía buffer de ligación a una concentración final de 1X (50 mM Tris-HCl [pH 7.5], 7 mM MgCl₂, 1 mM TdT, 1 mM rATP), 50 ngr de vector pGEX1-λT/EcoRI/BAP, el fragmento purificado y la ADN ligasa. Luego, 5 mL de la reacción de ligación fueron usados para transformar *E. coli* JM109 mediante electroporación. La proteína que expresa el bacteriófago T166-U19 se le denominó U19 y es expresada como proteína de fusión con la proteína glutation-S-transferasa (GST). Esta proteína de fusión fue expresada usando 10 mM de IPTG (Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) y purificada usando glutation agarosa según procedimientos recomendados por los fabricantes (Pharmacia Biotech Inc.).

EVALUACIÓN DE LA REACTIVIDAD DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE U19-GST POR ELISA

La reactividad de la proteína recombinante U19 frente a sueros de pacientes con leishmaniasis y con la enfermedad de Chagas fue evaluada por ELISA según procedimientos ya reportados¹⁶ con modificaciones. La proteína recombinante U19 fusionada a GST y la proteína GST fueron fijadas a placas de poliestireno en la solución tampón carbonato. Luego de bloquear las zonas libres con BSA y lavados con PBS-T; las placas fueron incubadas con los sueros diluidos 1/200. Posteriormente, las placas fueron lavadas y se añadió una dilución 1/500 de conjugado anti-IgG marcado con peroxidasa. Finalmente, se añadió peróxido de hidrógeno y OPD, como sustrato y se midieron las absorbancias en un lector de ELISA a 450 nm. Todas las muestras fueron corridas por duplicado y con sus respectivos controles positivos y negativos por placa. Cada suero fue evaluado frente a la proteína de fusión U19-GST y a la proteína glutation S transferasa (GST), simultáneamente. Las absorbancias obtenidas de los pocillos con GST sólo fueron restadas de las absorbancias de los pocillos donde se colocó la proteína de fusión U19. La línea de corte fue calculada usando las absorbancias de los sueros normales en cada evaluación, la línea de corte es considerada como el promedio de las absorbancias de los sueros normales más 2 veces su desviación estándar.

SECUENCIAMIENTO AUTOMÁTICO Y ANÁLISIS DE SECUENCIAS

El cADN subclonado en pGEX fue secuenciado usando el kit AutoRead sequencing kit (Pharmacia Biotec Inc.) siguiendo las indicaciones de los fabricantes. Cinco μg de ADN plasmídico fueron denaturados con NaOH; y precipitados con acetato de sodio y etanol. Luego

el plásmido fue resuspendido en agua, se añadieron 10 pmoles de oligonucleótidos pGEX-5' (5'-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3') o pGEX-3' (5'-CCGGGAGCTG CATGTGTCAGAGG-3'), la solución de hibridación y se incubó a 37°C por 20 minutos. Para marcar los fragmentos de secuencia se añadió el reactivo Cys5-dATP labelling mix y 8 unidades de T7 DNA Polimerasa. Luego, se añadió solución de extensión y DMSO. Se repartió en mezclas de dNTP/ddNTPs y se incubó a 37°C por 5 minutos. Para el secuenciamiento, se utilizó un secuenciador automático (ALF *express*, Pharmacia Biotech Inc.) y geles denatranses de poliacrilamida al 6%. La condiciones de electroforesis usadas fueron 58°C, 12 horas de duración, 1500 V, 60 mA y 25 W.

Las secuencias obtenidas fueron procesadas con el programa SeqEd 1,0,3 DNA Strider para determinar la secuencia codante y para deducir la secuencia de aminoácidos. Luego fueron comparadas con las reportadas en las bases de datos internacionales de secuencias GENBANK (USA), EMBL (European Molecular Biology Laboratory Data Library) y DDBJ (DNA Data Base of Japan) usando programa BLASTn y BLASTp (Basic Local Alignment Search Tool, página web: www.ncbi.nlm.nih.gov) para comparar la secuencia de nucleótidos y aminoácidos respectivamente.

RESULTADOS

EXPRESIÓN DEL BACTERIÓFAGO T166-U19

El bacteriófago T166-U19 expresa una proteína de fusión con un peso molecular aproximado de ~135 KDa y es reconocida por una mezcla de sueros de leishmaniasis cutánea en el formato Western blot (Figura N° 1).

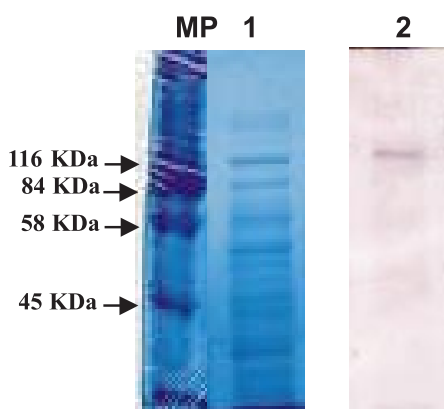


Figura N° 1. Electroforesis de las proteínas expresadas por el bacteriófagos T166-U19 (carril 1) y reactividad de la misma proteína frente a una mezcla de sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea (carril 2). MP: marcador de peso molecular, mezcla estándar de proteínas (Sigma Co. Saint Louis, MO, USA).

UN PRODUCTO DE APROXIMADAMENTE 620 pb SE OBTUVO DEL BACTERIÓFAGO T166-U19 USANDO PCR

El fragmento de cADN clonado en el bacteriófago T166-U19 se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa, obteniéndose un producto de amplificación de aproximadamente 620 pb. Luego de digerir este fragmento

con *EcoRI* se produjo una banda de aproximadamente 500 pb (Figura N° 2) el cual fue subclonado a pGEX. Los resultados indican que éste fragmento se subclonó correctamente por la expresión de una proteína de fusión con GST con el peso molecular ~39 KDa (Figura N° 3).

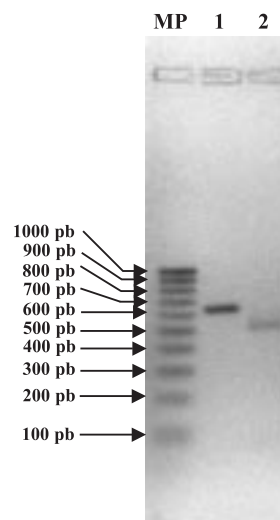


Figura N° 2. Producto de amplificación de ~620 pb obtenido por PCR a partir de ADN purificado del bacteriófago T166-U19 (carril 1). Este producto de amplificación fue digerido con la enzima *EcoRI* obteniéndose un fragmento de ~500 pb (carril 2). MP: marcador de peso molecular 100 pb ladder (Promega Co., Madison, WI, USA).

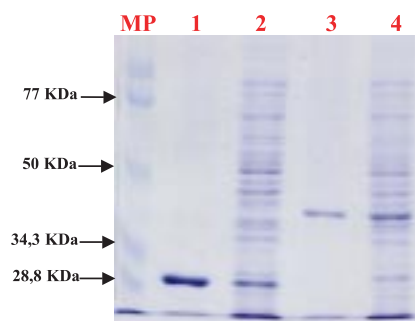


Figura N° 3. SDS-PAGE de proteínas expresadas por 1 y 2 control pGEX parental y pGEX-U19(3 y 4). MP: marcador de peso molecular de bajo rango preteñido (BioRad Inc, Hercules, CA, USA). 1 y 3 proteínas purificadas. 2 y 4 proteínas totales.

EL FRAGMENTO DE cADN CLONADO EN EL BACTERIÓFAGO T166-U19 ES HOMÓLOGO A LAS PROTEÍNAS ACÍDICAS RIBOSOMALES DE TRIPANOSOMÁTIDOS

Los resultados de secuenciamiento indican que el fragmento de cADN presenta un único marco de lectura abierto de 318 pb (Figura N° 4). El marco de lectura abierto traduce una secuencia de aminoácidos que al ser comparada con los bancos de secuencias internacionales (GENBANK, EMBL y DDBJ) usando el programa BLASTp es homóloga a la proteínas ácidas ribosomales P2 de tripanosomatidos. Siguiendo pautas de homología se determinó que esta secuencia corresponde a la proteína ácida ribosomal P2 tipo b de *L. (V.) braziliensis* a la cual se denominó Lbp2b.

```

aattcggagatccgggtaccatggaagaa ATG CAG TAC CTT GCC GCG TAC 26
                                     M Q Y L A A Y 7
GCC CTC GTG GCG CTC TCT GGC AAG ACG CCG TGC AAG GCC GAC GTT 71
A L V A L S G K T P C K A D V 22
CAG GCT GTC CTG AAG GCC GCC GGT GTT GCC ATT GAG TTG TCC CGC 116
Q A V L K A A G V A I E L S R 37
GTG GAT GCG CTC TTC CAG GAG CTG GAG GGC AAG AGC TTC GAT GAG 161
V D A L F Q E L E G K S F D E 51
CTG ATG ACT GAG GGT CGC TCG AAG CTG GTG GGG TCT GGC TCT GCC 206
L M T E G R S K L V G S G S A 67
GCT CCG GCT GCC GCC GCC TCC ACT GCC GGC GCC GTC GCC GCG 251
A P A A A A S T A G A A V A A 82
GCT GCC GAT GCG AAG AAG GAG GCG TCG GAG GAG GAG GCC GAC GAT 296
A A D A K K E A S E E E A D D 97
GAC ATG GGC TTT GGT CTG TTC GAC taa cggttacactggctaggccgctcg 346
D M G F G L F D * 105
cacgcttctgcctggagctgacaggtgcaggtgtctgtgtgtagccgtctgtagtatcc 405
ttggttcttcgggtatggaggatcttttcatttcaactcgcacatgggtaccggccatggta 456
cccggtccctcgaattc
    
```

Figura N° 4. Secuencia nucleotídica y aminoacídica (en negrita) del cADN clonado en T166-U19 correspondiente a la proteína ácida ribosomal P2 β de *L. (V.) braziliensis*. La secuencia del adaptador usado en el clonado está subrayado. La región codificante está en mayúscula y la no codificante en minúscula. El asterisco indica el codón de terminación. A la derecha se presenta el número de nucleótidos y de aminoácidos.

La proteína LbP2b presenta 92,5% de homología total con la proteína ácida ribosomal P2 de *L. (L.) infantum* LiP2-1, 92,4% con la proteína P2 de *L. (L.) donovani* LdP2, 74,1% con la proteína P2 de *T. brucei* TbP2, 72,9% con la proteína P2 de *T. cruzi* TcP2a, y 64,3% con la proteína P2 de *Homo sapiens* HsP2. Además, LbP2b presenta un alto contenido de alaninas (24,8%), leucinas (9,5%), glicinas (8,6%), ácido glutámico (8,6%), serinas (7,6%) y ácido aspártico (7,6%). La región central de LbP2b es particularmente rica en alaninas y glicinas, mientras que su punto isoelectrónico es ácido pI=4,38 (calculado por el programa Compute pI/MW tool). Además, LbP2b presenta un dominio COOH terminal característico de las proteínas ácidas ribosomales MGFLFD.

DISCUSIÓN

El valor de las bibliotecas de cADN para seleccionar antígenos útiles para el diagnóstico de las enfermedades parasitarias es ampliamente reconocido, los principales antígenos seleccionados comprenden proteínas de membrana, citosólicas y nucleares⁹⁻¹³.

El análisis de la reactividad humoral de bacteriófagos provenientes de una biblioteca de cADN de *L. (V.) braziliensis* ha permitido identificar al bacteriófago T166-U19, el cual es reactivo a sueros de pacientes con leishmaniasis cutánea y mucocutánea. Este bacteriófago contenía un fragmento de cADN homólogo a las proteínas ácidas ribosomales tipo P2b de tripanosomatidos.

Este es el primer reporte sobre el análisis de la proteína ácida ribosomal tipo P2β de *Leishmania (V.) braziliensis* (LbP2b). Esta secuencia ya ha sido registrada en la base de secuencias internacional GENE BANK, siendo su clave de acceso AF045020.

Existe poca información acerca de los dominios de las proteínas ácidas ribosomales de tripanosomatidos.

LBP2B PRESENTA UNA BAJA REACTIVIDAD A SUEROS DE LEISHMANIA EN ENSAYOS DE ELISA

Se analizaron 18 sueros de pacientes con leishmaniasis provenientes de Huanuco (sierra del Perú), todos ellos con diagnóstico clínico de leishmaniasis y positivos por ELISA con antígeno total de *Leishmania*. 50% de estos sueros reaccionaron a la proteína LbP2b. Además, se analizó la especificidad de la prueba frente a 8 sueros de pacientes con enfermedad de Chagas provenientes de Arequipa, de los cuales 2 sueros (25%) reaccionaron con la proteína LbP2b (Figura N° 5).

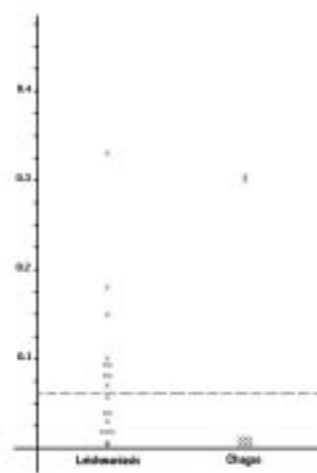


Figura N° 5. Reactividad de LbP2b en formato ELISA. La reactividad de la proteínas LbP2b fue analizada con 18 sueros de pacientes con leishmaniasis y 8 sueros de pacientes con la enfermedad del Chagas. La línea punteada representa la línea de corte (0,068). LbP2b reacciona con 9 sueros de leishmaniasis (50%), mientras que reacciona con 2 sueros de pacientes con Chagas (25%).

Esfuerzos por identificarlos sólo de una manera general indican que presentan el extremo C terminal característico, la región de bisagra rica en alaninas, y una estructura posiblemente globular en el extremo N terminal^{14,19-23}.

LbP2b presenta dominios característicos de proteínas ácidas ribosomales de eucariotes. Asimismo, presenta 2 dominios muy conservados con respecto a los eucariotes: el dominio C terminal EEADDDMGFLFD, y el dominio N terminal YLAAYALVALSG. Posiblemente estos dominios jueguen un rol estructural y funcional importante para LbP2b, cabe la posibilidad que el dominio C terminal le permita a esta proteína interactuar con factores de la traducción y que el dominio N terminal le permita interactuar con la proteína ácida ribosomal P0¹⁹.

Es interesante notar que estas proteínas conservadas presenten alta reactividad humoral en la leishmaniasis, este fenómeno es notado también en otras proteínas conservadas como las proteínas de estrés térmico y las histonas. Posiblemente, el hecho de que usualmente estas proteínas conservadas están formando complejos proteicos (como por ejemplo, el ribosoma) podría facilitar

la fagocitosis y el procesamiento de estos antígenos por células presentadoras de antígeno y posteriormente estas células promuevan la activación de una respuesta humoral, como es propuesto por Requena²¹.

Se ha propuesto que el epítipo inmunoreactivo de *T. cruzi* es diferente al de *Leishmania*²². Se ha demostrado usando ensayos de inhibición con péptidos sintéticos que los anticuerpos en la leishmaniasis están dirigidos a una región adyacente al extremo C terminal, mientras que los sueros chagásicos reaccionan contra el epítipo altamente conservado MGFGLFD²³. Perros naturalmente infectados con *L. (L.) infantum* tienen anticuerpos que reaccionan contra las proteínas ribosomales LiP2a y LiP2b. Usando péptidos sintéticos se mapeó el epítipo antigénico en una región adyacente al extremo carboxilo terminal. Inclusive los anticuerpos generados en una infección con *Leishmania* no reconocen proteínas P humanas ni de *T. cruzi*²².

Las proteínas ácidas ribosomales han demostrado ser antígenos de moderada reactividad en la leishmaniasis visceral y la leishmaniasis canina^{19,20,22}. La proteína recombinante LbP2b presenta también baja reactividad frente a sueros de leishmaniasis. Debido a la baja reactividad y la reacción cruzada, LbP2b no es recomendable su uso en el diagnóstico de la leishmaniasis, a menos que sea utilizada junto con otros antígenos recombinantes reportados y se elimine su epítipo C terminal, el cual es el principal epítipo reconocido por sueros chagásicos.

AGRADECIMIENTOS

A los técnicos de laboratorio Juana Choque y David García del Laboratorio de Biología Molecular de Instituto Nacional de Salud. Esta investigación fue parte de un proyecto que recibió apoyo financiero de un re-entry Grant otorgado por la UNDP/Banco Mundial/OMS Programa Especial para la investigación y el Manejo en Enfermedades Tropicales y además de la Unión Europea a través del Programa STD-3, contrato N° TS3*CT 92-0123.

REFERENCIAS

1. **World Health Organization.** The World Health Report 2001. Mental Health: new understanding, new hope. Geneva: WHO; 2001.
2. **Ministerio de Salud.** Leishmaniasis. Serie de documentos monográficos. Lima: MINSA/OGE/INS; 2000. Módulo Técnico N° 8.
3. **Lopez M, Inga R, Cueva N, Alvarez E, Arevalo J.** PCR: a tool for diagnosis of american tegumentary leishmaniasis in a health post of rural endemic areas. Arch Inst Pasteur Tunis 1993; 70(3-4): 499-504.
4. **Marty P, Lelievre A, Quaranta JF, Rahal A, Gari-Toussaint M, Le Fichoux Y.** Use of the leishmanin skin test and western blot analysis for epidemiological studies in visceral leishmaniasis areas: experience in a highly endemic focus in Alpes-Maritimes (France). Trans R Soc Trop Med Hyg 1994; 88(6): 658-9.
5. **Kar K.** Serodiagnosis of leishmaniasis. Crit Rev Microbiol 1995; 21(2):1 23-52.
6. **Thierry J, Borel E, Courrier P L, Courtois D, Mojon M.** Cutaneous South-American leishmaniasis. Parasitological and serological diagnosis by indirect immunofluorescence and enzyme linked immunoassay (ELISA). 94 cases. Med Trop (Mars) 1991; 51(1): 43-8.
7. **Guimaraes MC, Celeste BJ, Franco EL.** Evaluation of dot enzyme-linked immunosorbent assay for mucocutaneous leishmaniasis and comparison with microplate enzyme immunoassay. J Clin Microbiol 1986; 24(3): 364-7.
8. **Guimaraes MC, Celeste BJ, de Castilho EA, Mineo JR, Diniz JM.** Immunoenzymatic assay (ELISA) in mucocutaneous leishmaniasis, kala-azar, and Chagas' disease: an epimastigote *Trypanosoma cruzi* antigen able to distinguish between anti-*Trypanosoma* and anti-*Leishmania* antibodies. Am J Trop Med Hyg 1981; 30(5): 942-7.
9. **Montoya Y.** Molecular analysis of antigen genes in peruvian leishmaniasis. (Doctoral thesis). London: University of Cambridge; 1993.
10. **Osland A, Beyene D, Ashenafi S, Beetsma A.** Isolation and characterization of recombinant antigens from *Leishmania aethiopica* that react with human antibodies. Infect Immun 1992; 60(4): 1368-74.
11. **Blaxter ML, Miles MA, Kelly JM.** Specific serodiagnosis of visceral leishmaniasis using a *Leishmania donovani* antigen identified by expression cloning. Mol Biochem Parasitol 1988; 30(3): 259-70.
12. **Soto M, Requena JM, Gomez LC, Navarrete I, Alonso C.** Molecular characterization of a *Leishmania donovani* infantum antigen identified as histone H2A. Eur J Biochem 1992; 205(1): 211-6.
13. **MacFarlane J, Blaxter ML, Bishop RP, Miles MA, Kelly JM.** Identification and characterization of a *Leishmania donovani* antigen belonging to the 70-kDa heat-shock protein family. Eur J Biochem 1990; 190(2): 377-84.
14. **Soto M, Requena JM, Quijada L, Alonso C.** Specific serodiagnosis of human leishmaniasis with recombinant *Leishmania* P2 acidic ribosomal proteins. Clin Diag Lab Immunol 1996; 3 (4): 387-91.
15. **Button LL, McMaster WR.** Molecular cloning of the major surface antigen of *Leishmania*. J Exp Med 1988; 167(2): 724-9.
16. **Amorim AG, Carrington M, Miles MA, Barker DC, de Almeida ML.** Identification of the C-terminal region of 70 kDa heat shock protein from *Leishmania (Viannia) braziliensis* as a target for the humoral immune response. Cell Stress Chaperones 1996; 1(3): 177-87.
17. **Rafati S, Salmanian A, Hashemi K, Schaff C, Belli S, Fasel N.** Identification of *Leishmania major* cysteine proteinases as targets of the immune response in humans. Mol Biochem Parasitol 2001; 113 (2001) 35-43.
18. **Burns JM Jr, Shreffler WG, Benson DR, Ghalib HW, Badaro R, Reed SG.** Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral leishmaniasis. Proc Natl Acad Sci USA 1993; 90(2): 775-9.
19. **Soto M, Requena JM, García M, Gómez LC, Navarrete I, Alonso C.** Genomic organization and expression of two independent gene arrays coding for two antigenic acidic ribosomal proteins of *Leishmania*. J Biol Chem 1993; 268(29): 21835-43.
20. **Panebra A.** Respuesta humoral en leishmaniasis del Perú: proteínas HSP-70 y ribosomales P. (Tesis doctoral). Buenos Aires: Universidad de Buenos Aires. 1996.
21. **Requena JM, Alonso C, Soto M.** Evolutionarily conserved proteins as prominent immunogens during *Leishmania* infections. Parasitol Today 2000; 16 (6): 246-50.
22. **Soto M, Requena JM, Quijada L, Angel SO, Gomez LC, Guzmán F, et al.** During active viscerocutaneous leishmaniasis the anti-P2 humoral response is specifically triggered by the parasite P proteins. Clin Exp Immunol 1995; 100: 246-52.
23. **Skeiky YAW, Benson DR, Elwasila M, Badaro R, Burns JM, Reed SG.** Antigens shared by *Leishmania* species and *Trypanosoma cruzi*: immunological comparison of the acidic ribosomal P0 proteins. Infect Immun 1994; 62(5): 1643-51.