

Sesión de comunicaciones orales B1: Biología molecular e inmunología

Aula 13F, Facultad de Farmacia
Domingo 18 de Julio: 11.30-14.00

11.- Hacia una mejor comprensión de la leishmaniasis canina

J. Moreno, J. Nieto, E. Carrillo, M. Crusat, M. Elbali, I. Cruz, C. Chicharro, C. Cañavate, J. Alvar

WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, España

El control efectivo de la leishmaniasis visceral causada por *Leishmania infantum* requiere el control de la infección en el perro, que es el reservorio principal y juega un papel fundamental en la transmisión al ser humano. Hasta el momento las medidas de control contra la leishmaniasis canina son caras y sin éxito. Es por ello necesario una mejor comprensión de la infección por *L. infantum* en el perro para establecer estrategias de control con éxito que tengan impacto en la leishmaniasis humana. Nuestro laboratorio se ha dedicado en los últimos años al estudio de la infección por *L. infantum* en el modelo canino con el propósito de comprender la historia natural de la enfermedad, sus implicaciones epidemiológicas y ayudar al desarrollo de nuevas estrategias de control mediante el diagnóstico, el tratamiento y la profilaxis. Hemos desarrollado protocolos experimentales de infección *in vitro* e *in vivo* que nos han permitido estudiar aspectos inmunológicos, patogénicos e epidemiológicos de la leishmaniasis canina. Los ensayos de infección *in vitro* de macrófagos con promastigotes nos han permitido analizar la relación parásito hospedador a nivel celular: cambios en el fenotipo de la célula huésped, expresión de citoquinas, subpoblaciones celulares y factores implicados en la respuesta inmune, importancia de la virulencia y carga del parási-

to. La infección experimental *in vivo* de perros beagle con promastigotes de *L. infantum* ha permitido el estudio de la historia natural de la infección y de los eventos inmunológicos tempranos que tienen lugar durante el periodo de prepatencia. El seguimiento de la respuesta inmune del hospedador a lo largo del tiempo mostró diferencias claras entre animales infectados intradérmica e intravenosamente en el desarrollo de la enfermedad. También se analizaron los factores y mecanismos que determinan la protección o susceptibilidad de estos animales a la infección y a la progresión de la enfermedad. Por otro lado, estos ensayos han sido utilizados también para caracterizar diversas moléculas de *L. infantum*. Se analizó la inmunogenicidad de estas moléculas y también se evaluó su utilidad para diagnóstico, como inmunomoduladores en inmunoterapia y también como vacunas protectoras contra la infección. Dado que todos estos resultados han sido obtenidos en el modelo canino, pueden ser aplicados directamente al diseño de estrategias de control contra la leishmaniasis canina.

Financiado por MCyT (AGL-2000/0284) e ISCIII (MPY-1003 & MPY-1114).

12.- Estudio del patrón de expresión de citoquinas en la leishmaniasis canina

E. Carrillo, I. Cruz, J. Nieto, J. Moreno, J. Alvar

WHO Collaborating Centre for Leishmaniasis, Centro Nacional de Microbiología, Instituto de Salud Carlos III, Ctra. Majadahonda-Pozuelo km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, España

Para lograr una mejor comprensión de la respuesta inmune que se desencadena frente al parásito y del mecanismo responsable de la progresión/resistencia a la enfermedad, hemos realizado un estudio sobre el patrón de citoquinas expresadas por perros sintomáticos y asintomáticos mediante RT-PCR a tiempo real. Incubamos PBMC con diferentes estímulos 24 horas, como también realizamos una infección *in vitro* con promastigotes de *L. infantum*. Las citoquinas estudiadas fueron: IL-4, IL-18, IFN- γ , IL-10, IL-6, TNF- α , IL-1 β y TGF- β . Los datos procedentes del análisis del patrón de citoquinas de los diferentes animales fueron relacionados con los síntomas clínicos, parámetros hematológicos, la respuesta linfoproliferativa *in vitro* y cuantificación de leishmania por PCR a tiempo real. Todas las citoquinas ensayadas fueron detectadas en todos los animales en presencia o no de estímulo, y tras infección, a excepción de IL-4 que sólo fue detectada en determinadas condiciones y animales. Es en perros asintomáticos donde encontramos mayores niveles de expresión. La infección de PBMC propició en la mayoría de los animales, un incremento de la expresión de IL-6 y IL-1 β , y una disminución de IL-18. Dicha infección conllevó una mayor expresión de TGF- β en perros sintomáticos y menor en asintomáticos, sin cambios apreciables en los controles. También la infección, provocó el aumento de la expresión de las citoquinas IFN- γ

y IL-10 en perros asintomáticos y controles; en los asintomáticos, también tras la estimulación con LSA. No obstante, los perros sintomáticos no respondieron o presentaron una pequeña respuesta frente a los diferentes estímulos y la infección. La relación IFN- γ /IL-10 en los perros control permaneció sin cambios importantes, mientras que los asintomáticos mostraron un incremento en dicha relación tras la infección por promastigotes y la estimulación por SLA. Los resultados mostraron la concordancia existente entre las citoquinas expresadas, parámetros clínicos, hematológicos, la respuesta linfoproliferativa y la cuantificación parasitológica. La cuantificación de la expresión de citoquinas permite la evaluación y cuantificación del tipo de respuesta celular que se produce frente a determinados estímulos antigénicos, mitógenos o moléculas. Es por ello que nos permite ampliar el conocimiento actual de la respuesta producida frente al parásito, nos acerca a la comprensión de los mecanismos implicados en dicha respuesta y, por tanto, puede ser una herramienta muy útil aplicada en la evaluación de diferentes moléculas como candidatos a vacunas.

Trabajo financiado por el MCyT (AGL 2000-0284). E. Carrillo disfruta de una beca FPI del MCyT.

13.- Vacunación contra la leishmaniosis canina con la proteína recombinante quimera (PQ) y Kmp11 de *Leishmania infantum* I: protección clínica, inmunológica y parasitológica

J. Carcelén¹, I. Molano¹, V. Iniesta¹, I. Corraliza², M. Mangas¹, I. Monroy¹, L.C. Gómez-Nieto¹

¹Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Av. de la Universidad s/n, 10071 Cáceres, España

La leishmaniosis canina producida por *Leishmania infantum* supone un grave problema tanto en medicina humana como veterinaria. La importancia que tiene el perro como reservorio de la enfermedad, su elevada frecuencia de presentación, la dificultad en su diagnóstico precoz y la escasa eficacia de los tratamientos existentes, hace necesario el desarrollo de vacunas como herramienta útil en la implantación de programas de control de la leishmaniosis visceral zoonótica. El estudio comprende el análisis de la capacidad inmunoestimuladora y protectora de uno de estos candidatos vacunales cuya base fundamental es la proteína recombinante PQ de *L. infantum*, en el modelo experimental canino. Se utilizaron 7 perros Beagles, 3 testigos control y 4 vacunados que fueron inmunizados 3 veces y vía SC con dosis decrecientes de la vacuna constituida por las proteínas recombinantes PQ y Kmp11 de *L. infantum* utilizando la BCG como adyuvante, aplicadas con un intervalo de 21 días. Posteriormente los animales fueron sometidos al reto de la infección a través de la inoculación vía endovenosa de 5×10^5 formas promastigotes de fase estacionaria de *L. infantum* (M/CAN/ES/96/BCN 150, zimodema 1). El análisis de la capacidad inmunogénica y protectora se realizó mediante el control de los siguientes parámetros: clínico-exploratorios, biopatológicos (hematológicos y bioquímicos), parasitológicos (biopsias y cultivos) e inmunológicos de la respuesta de anticuerpos (IFI y ELISA) durante los periodos de vacunación e infección frente a proteínas totales

y recombinantes del parásito y prueba de DTH al final de la experiencia. Los resultados mostraron la inocuidad de estas sustancias y su capacidad inmunoestimuladora, ya que indujeron respuestas positivas de anticuerpos durante todo el periodo de inmunización. La utilización de proteínas de membrana como la Kmp11 en la vacuna sí produjo seropositividad con el uso de SLA-ELISA durante el periodo de vacunación. El test de intradermorreacción (DTH) mostró altos índices de positividad respecto a los animales testigo con grosores de piel de hasta 10 mm. El aislamiento de parásitos durante la infección estuvo presente en los perros testigo y sólo en uno de los vacunados. A partir del reto la cinética de anticuerpos de los perros vacunados se incrementó levemente para tener una tendencia hacia la seronegatividad hasta el final del estudio frente a los antígenos homólogos y SLA de *L. infantum*, siendo positiva la de los animales testigo frente a estos antígenos. Igualmente la técnica IFI confirmó los resultados obtenidos en los animales inmunizados, mostrando los controles significativos títulos de positividad. Igualmente se describe y se discute la eficacia de este producto vacunal como agente inmunogénico y protector frente a las parasitaciones caninas por *L. infantum*.

Trabajo financiado por el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Ref: BIO2002-04049-C02-02).

14.- Vacunación contra la leishmaniosis canina con la proteína recombinante quimera (PQ) y Kmp11 de *Leishmania infantum* II: estudio histopatológico

J. Carcelén¹, I. Molano¹, V. Iniesta¹, I. Corraliza², M. Mangas¹, E. Redondo³, I. Monroy¹, L.C. Gómez-Nieto¹

¹Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias. ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular. ³Unidad de Histología y Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura, Av. de la Universidad s/n, 10071 Cáceres, España

En estudios de protectividad contra la leishmaniosis canina (LC), el uso del máximo número de herramientas laboratoriales diagnósticas y de valor pronóstico tienen que ser aplicadas para conocer con exactitud el grado de protectividad de las vacunas utilizadas. El trabajo completa los resultados obtenidos con el uso de la Proteína Quimera (PQ) y Kmp11 de *L. infantum* en el modelo canino (I), mediante el análisis histopatológico de órganos y tejidos estrechamente relacionados con esta enfermedad como son hígado, riñón, sistema reticuloendotelial, etc., obtenidos entre grupos testigo y vacunados. En los animales no inmunizados se observaron lesiones propias de la enfermedad pero con diferencias entre ellos ya que uno de los animales testigo no vacunados presentó menor número e intensidad de lesiones que el resto. Las imágenes macroscópicas se correspondieron con procesos de tipo congestivo e hiperplásico de órganos linforreticulares como linfadenitis, esplenitis congestiva e hígado de estasis frente a imágenes macroscópicas aparentemente normales en los tres perros inmunizados. Microscópicamente 2 de los animales testigo no inmunizados, presentaron imágenes histológicas características tales como alteraciones vasculares a nivel hepático caracterizadas por estasis hepático con dilatación de los espacios de Disse y congestión de grandes vasos así como proceso

inflamatorio caracterizado por un infiltrado inflamatorio focal o difuso de tipo linfoplasmocelular localizado a nivel de los espacios portales y venas centrolobulillares. Los hepatocitos se mostraron con diferente grado de degeneración y necrosis propios de la LC activa. Uno de los animales testigo presentó menor intensidad de este tipo de alteraciones el cual se correspondió con una forma latente poco evolutiva de la enfermedad. En los animales vacunados las imágenes histológicas del hígado no mostraron alteraciones salvo en uno de ellos en donde el fenómeno de microgranulomas de tipo eosinofílico fue lo único detectable histológicamente. En riñón existieron igualmente notables diferencias entre grupos, ya que frente a imágenes de glomerulonefritis y nefritis intersticial con tubulonefrosis en determinados perros del grupo testigo, los animales vacunados sólo presentaron hiperemia glomerular y glomerulonefritis de cambios mínimos propios de estados funcionales renales fisiológicos. El estudio es completado con análisis histopatológicos de otros órganos que ponen en evidencia la protectividad de esta proteína bien sola o asociada al antígeno Kmp11 en el adyuvante BCG.

Trabajo financiado por el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Ref: BIO2002-04049-C02-02).

15.- La respuesta inmune específica durante el desarrollo de la infección por *Leishmania major* está estrechamente relacionada con los parámetros histopatológicos en ratones sensibles (BALB/c) y resistentes (C57BL/6) a la enfermedad

V. Iniesta¹, J. Carcelén¹, E. Redondo³, I. Molano¹, M. Mangas¹, I. Corraliza², I. Monroy¹, L.C. Gómez-Nieto¹

¹Unidad de Parasitología y Enfermedades Parasitarias, ²Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, ³Unidad de Histología y Anatomía Patológica, Facultad de Veterinaria, Universidad de Extremadura (UEX), Av. de la Universidad s/n, 10071 Cáceres, España

Con el fin de investigar las posibles relaciones existentes entre los hallazgos histológicos e inmunológicos durante el desarrollo de la infección por *L. major*, se han analizado diversos parámetros clave en el desarrollo de la enfermedad, tanto a nivel local como sistémico. Para ello se utilizaron los dos fenotipos murinos clásicos de susceptibilidad (BALB/c) y resistencia (C57BL/6), infectando a los animales con una dosis de 10^6 promastigotes en la almohadilla plantar. Durante el periodo de ensayo (60 días), varios ratones de cada cepa fueron periódicamente sacrificados con un intervalo de 7 días, a fin de obtener sangre y muestras histológicas de la extremidad infectada. El análisis de la respuesta humoral se llevó a cabo mediante la determinación en suero de las subclases IgG1 e IgG2a, usando la técnica ELISA y frente a tres antígenos diferentes del parásito: la Proteína Total Soluble (SLA) y las proteínas recombinantes KMP-11 y Multicomponente Quimera (PQ). También se cuantificó la concentración sérica de IL-4 mediante un kit de ELISA. Por último, las muestras de tejido fueron procesadas para su posterior análisis histopatológico. En BALB/c, las lesiones progresaron rápidamente, mostrando dos periodos claramente diferenciados: una fase de proliferación masiva, con intenso infiltrado celular e invasión parasitaria, y una fase lítica, a partir de día 28 post-infec-

ción, caracterizada por la presencia de necrosis y desestructuración tisular. Por el contrario, la inflamación plantar en C57BL/6 fue disminuyendo hasta presentar un aspecto normal al final del ensayo, y los procesos de infiltración y necrosis aparecieron de forma más precoz y restringida. La producción incrementada y sostenida de IL-4 en ratones susceptibles frente a los resistentes podría explicar, al menos en parte, algunas de las diferencias observadas en la calidad y cantidad de la respuesta inmune entre ambas cepas. Así, el título de anticuerpos anti-SLA fue 100 veces mayor en BALB/c que en C57BL/6. Además, los anticuerpos anti-KMP-11 y anti-PQ se detectaron sólo en animales susceptibles, durante la fase proliferativa y conjuntamente a los fenómenos de necrosis en tejidos infectados, respectivamente. Todos estos datos sugieren que la expresión de los diferentes antígenos de membrana e internos del parásito está estrechamente relacionada con el desarrollo de la enfermedad y con los estados de resistencia y susceptibilidad en leishmaniosis experimental murina.

Trabajo financiado por el Plan Nacional de Investigación Científica, Desarrollo e Innovación Tecnológica del Ministerio de Ciencia y Tecnología (Ref. del Proyecto: BIO2002-04049-C02-02).

16.- Implicación de la proteína inmunosupresiva Tc52 de *Trypanosoma cruzi* en la inmunopatología de la enfermedad de Chagas en ratones

E. Garzón¹, M. Coutinho Borges¹, A. Cordeiro-da-Silva², V. Nacife³, M. de Nazareth Meirelles³, E. Guilvard¹, M.F. Bosseno¹, A. Gustavo Guevara⁴, S. Frédérique Brenière¹, A. Ouaiissi¹

¹IRD UR 008 "Pathogénie des Trypanosomatidés", Centre IRD de Montpellier, Francia. ²Department of Biochemistry, University of Porto, Portugal. ³Department of Ultrastructure and Cellular Biology, FIOCRUZ, Río de Janeiro, Brasil. ⁴Laboratory of Clinical Investigations, Hospital Vozandes, Quito, Ecuador

Trypanosoma cruzi es el agente causal de la enfermedad de Chagas. En estudios precedentes hemos identificado una proteína inmunosupresiva secretada por *T. cruzi* denominada Tc52. Clones simples mutantes *tc52*^{+/-} fueron obtenidos mediante la delección de un alelo del gen *tc52*. En este estudio, hemos analizado la respuesta inmunitaria y el fenotipo de la enfermedad en ratones infectados con los parásitos mutantes *tc52*^{+/-} durante la fase aguda y crónica de la infección. Nuestros resultados indican que la infección con el clon mutante *tc52*^{+/-} conduce a parasitemias más bajas que aquellas observadas con el clon salvaje. Asimismo, los procesos inflamatorios y las lesiones cardíacas observadas en los ratones infectados con el clon *tc52*^{+/-} son menos importantes que en los animales infectados con el clon salvaje. Hemos demostrado, por primera vez, la expresión de la Tc52 por las formas replicativas (nidios amastigotes) en el tejido cardíaco de ratones infectados. Esta expresión es más elevada en los nidios del clon salvaje que en los nidios del clon mutante *tc52*^{+/-}. Además, el mecanismo de inmunosupresión (inhibición de la proliferación de linfocitos T) fue observado solamente en ratones infectados

con el clon salvaje. Por otro lado, demostramos que la proteína Tc52 modula la respuesta Th1/Th2 *in vivo*. En efecto, la producción de IL-10 es aumentada y la IL-2 es disminuida en los ratones infectados por el clon salvaje. Por el contrario, los ratones infectados con el clon mutante *tc52*^{+/-} presentan una expresión de citoquinas comparable a los ratones no infectados. Así, la actividad inmunosupresiva de la proteína Tc52 *in vivo* reposa sobre el control de la producción de IL-2 (señal de proliferación). Por el contrario, no se observó mayor diferencia entre los dos grupos de ratones a nivel de la activación polyclonal: (i) hiper celularidad de los linfocitos (CD4⁺, CD8⁺, y B) y macrófagos, y (ii) producción de inmunoglobulinas no específicas. Estos resultados demuestran que la proteína Tc52 es un factor de virulencia que participa al disfuncionamiento del sistema inmunitario y que, por consecuencia, participa al desarrollo de la enfermedad de Chagas. Asimismo, nuestros resultados indican que la proteína Tc52 constituye una cible potencial para la puesta a punto de estrategias de interferencia con el desarrollo del parásito.

17.- Un nuevo modelo de ratón inmunodeficiente para el estudio *in vivo* de los estadios eritrocíticos de la malaria humana

A. Moreno¹, M. Moreno¹, J. Moreno¹, C. Eguiluz², N. van Rooijen³, Z.G. Chen¹, A. Benito⁴

¹Servicio de Parasitología, Instituto de Salud Carlos III, Crta. Majadahonda-Pozuelo km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, España. ²Servicio de Veterinaria, Instituto de Salud Carlos III, Crta. Majadahonda-Pozuelo km 2, 28220 Majadahonda, Madrid, España. ³Department of Cell Biology and Immunology, Faculty of Medicine, Vrije Universiteit, Amsterdam 1081 BT, The Netherlands. ⁴Servicio de Medicina Tropical, Sinesio Delgado 4-12 Pabellón 13, 28029 Madrid, España

Recientemente, se han puesto a punto diferentes modelos de ratones inmunodeficientes para el estudio *in vivo* del parásito humano *Plasmodium falciparum* (*P.f.*) en pequeños animales de laboratorio. Sin embargo, el uso de estos modelos para el cribado de nuevos antimaláricos o vacunas está limitado por el reducido número de animales que permiten el desarrollo de este parásito. El objetivo principal de este estudio fue determinar si un nuevo protocolo de inmunomodulación podría reducir la resistencia de la línea de ratones NOD/LtSz-*scid* a la infección por *P.f.* y así obtener un modelo animal que permitiera realizar estudios a gran escala de la malaria humana. Este nuevo modelo fue comparado con el modelo utilizado actualmente, en el cual la línea de ratones inmunodeficientes Beige/Nude/Xid (BNX) es utilizada para obtener el desarrollo *in vivo* de este parásito. Ambas líneas de ratones fueron tratadas con el mismo protocolo de inmunomodulación e infectadas con *P.f.* En ambos modelos se midió el porcentaje de ratones infectados, el desarrollo del parásito, la respuesta periférica de leucocitos y la fagocitosis de los glóbulos rojos

infectados con *P.f.* en diferentes órganos. Los resultados muestran que la combinación del nuevo protocolo de inmunomodulación con el fondo genético de los ratones NOD/LtSz-*scid* permite el desarrollo del parásito durante 17 días en un porcentaje elevado de ratones infectados (75%) mejorando así los resultados obtenidos con el precedente modelo. La comparación de los resultados obtenidos en ambos modelos durante el estudio histológico sugieren que el alto porcentaje de ratones NOD/LtSz-*scid* infectados con *P.f.* podría estar relacionado con el recudido reclutamiento de macrófagos observado en los tejidos responsable de la eliminación de la sangre periférica de los glóbulos rojos infectados.

Este trabajo ha sido financiado por La Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales (RICET), por el programa Intramural del Instituto de Salud Carlos III (MPY-118/03), por el proyecto SAF2003-08720 MCYT y una beca de la Fundación Séneca de la Comunidad Autónoma de Murcia.

18.- Clonación y caracterización de antígenos de excreción/secreción de metacestodos de *Taenia solium*

E. Ferrer^{1,4}, P. Bonay², M. Foster³, L.M. González¹, M. Cortéz⁴, I. Dávila⁵, L.S.J. Harrison⁶, R. Parkhouse⁷, T. Gárate¹

¹Instituto de Salud Carlos III, Centro Nacional de Microbiología, Majadahonda, Madrid, España. ²Centro de Biología Molecular, Universidad Autónoma de Madrid, Madrid, España. ³Institute for Animal Health, Woking, Surrey, UK. ⁴Centro de Investigaciones Biomédicas (BIOMED), Universidad de Carabobo, Maracay, Venezuela. ⁵Departamento de Parasitología, Universidad de Carabobo, Valencia, Venezuela. ⁶Sir Alexander Robertson Centre for Tropical Veterinary Medicine, University of Edinburgh, Scotland, UK. ⁷Instituto Gulbenkian de Ciência, 2780-156 Oeiras, Portugal

La neurocisticercosis (NCC) es causada por el estado larvario de *Taenia solium*. Los antígenos de excreción/secreción (E/S) de metacestodos de *T. solium* han sido estudiados por su alta especificidad en el inmunodiagnóstico de la enfermedad, por esta razón el principal objetivo de este trabajo fue la clonación y caracterización de antígenos E/S y la evaluación de su antigenicidad. Por inmunocribado de una genoteca de cDNA de metacestodos de *T. solium* con sueros de conejos inmunizados con antígenos E/S y glicoproteínas de *T. solium* aislamos un clon (M13h) que codifica una proteína de 85 aminoácidos (aa). El alineamiento de dicha secuencia con las secuencias de los bancos de datos mostró alta similitud con miembros de la familia de antígenos diagnósticos de 8 kDa de metacestodos de *T. solium*. Mediante PCR encontramos otros dos miembros (B1 y M4), que codifican péptidos de 85 y 66 aa respectivamente. La naturaleza secretora de los antígenos M13h y B1 fue confirmada por localización subcelular en el sistema secretor

de células NRK. Los insertos fueron subclonados en el vector pGEX-4T-1, expresados, purificados y se evaluaron por ELISA con sueros y líquidos céfalo-raquídeos (LCR) de pacientes con NCC activa e inactiva, pacientes con otras infecciones relacionadas e individuos sanos. La sensibilidad de M13h, B1 y M4 fue de 83,9%, 96,8% y 74,2% respectivamente con los sueros de los pacientes con NCC activa. En NCC inactiva las sensibilidades fueron menores, 58,1%, 67,7% y 16,1%, respectivamente. Con las muestras de LCR la reactividad de las moléculas decreció en relación con los sueros. Estos resultados indican que B1, M13h y M4 podrían ser nuevos miembros de la familia de antígenos diagnósticos de 8 kDa de metacestodos de *T. solium*, y muy útiles en el diagnóstico de Cisticercosis.

Financiamiento: EU/INCO-DC (project CT95-0002), FIS (00/407, 03/1114) y ISCIII-Programa Intramural. Elizabeth Ferrer fue financiada por becas de AECE, ISCIII y RICET-FIS.

19.- Análisis de los espaciadores internos del ADN ribosomal (ITS-1 e ITS-2) y del gen 5.8 S del género *Mepraia* Mazza, Gajardo et Jörg 1940 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae)

L. Calleros^{1,2}, D. Klisiowicz¹, F. Panzera², R. Pérez², M. Lorca³, S. Mas-Coma¹, M.D. Bargues¹

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España. ²Sección de Genética Evolutiva, Instituto de Biología, Facultad de Ciencias, Universidad de la República. Montevideo, Uruguay.

³Departamento de Parasitología, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago de Chile, Chile

Las especies del género *Mepraia* son endémicas de Chile y se distribuyen desde los 18° hasta los 34° de latitud Sur. En 2002 se realizó un análisis filogenético de 57 especies de triatomini, basado en secuencias de ADN ribosomal 16S y 12S, en el cual *Triatoma eratyrsiformis* aparecía como especie hermana de *M. spinolai*, lo que llevó a los autores a incluir a todas las especies del complejo spinolai en el género *Mepraia*. Así, el género pasaría a estar constituido por cuatro especies: *M. spinolai*, *M. gajardo*, *M. eratyrsiformis* y *M. breyeri*. Esta clasificación difiere de la hecha en base a datos morfológicos, de distribución latitudinal y altitudinal y de hábitos alimenticios, en la cual las especies *T. eratyrsiformis* y *T. breyeri* están dentro del género *Triatoma*. En el presente estudio fueron analizadas las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 y el gen 5.8S del ADNr de poblaciones de estas cuatro especies, procedentes de distintas regiones de Chile y de Argentina. Los resultados del análisis de las secuencias nos han permitido constatar que: a) los ITSs del ADNr permiten la diferenciación entre poblaciones de una misma especie dentro del género *Mepraia*, al igual que ha sido demostrado en otros géneros de Triatomini; b) los ITSs de las poblaciones de *M. spinolai* y *M. gajardo* estudiadas son

muy similares, mostrando muy poca divergencia genética entre sí, inferior a la detectada entre especies diferentes en otros Triatomini; c) tanto el ITS-1 como el ITS-2 del único ejemplar analizado de *T. breyeri*, fueron similares a los de *T. eratyrsiformis*; d) dos grupos o genotipos de secuencias bien diferenciados aparecen claramente en el complejo spinolai: (i) *M. spinolai* y *M. gajardo* y (ii) *T. breyeri* y *T. eratyrsiformis*. Los resultados obtenidos constituyen la primera aportación sobre caracterización molecular en base al ADN ribosomal en el complejo spinolai y sugieren la existencia de dos grupos y la necesidad de una revisión sistemática de estas especies.

Trabajo subvencionado por el Proyecto CDIA No. ICA4-2003-1000 del Programa INCO-DEV y ECLAT No. IC18-CT98-0366 del Programa INCO-DC (DG XII, EC, Bruselas), No. 3042/2000 de la Dirección General de Cooperación para el Desarrollo, Generalitat Valenciana (Valencia, España) y No. CO3/04 de la Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales - RICET, del Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, Fondo Investigación Sanitaria, Ministerio de Salud, España. Estancia de L. Calleros en Valencia financiada por la red "EUSAPH2" del programa ALFA (DG I, EC, Bruselas).

20.- Discriminación molecular entre poblaciones de *Triatoma rubrovaria* Blanchard, 1843 (Hemiptera, Reduviidae, Triatominae) mediante análisis de las secuencias de la región intergénica del ADN ribosomal

D.R. Klisiowicz¹, F. Panzera², R.S. Pacheco³, S. Mas-Coma¹, M.D. Bargues¹

¹Departamento de Parasitología, Facultad de Farmacia, Universidad de Valencia, Av. Vicent Andrés Estellés s/n, 46100 Burjassot, Valencia, España. ²Instituto de Biología, Sección de Genética Evolutiva, Facultad de Ciencias, Montevideo, Uruguay. ³Departamento de Bioquímica e Biología, Instituto Oswaldo Cruz, Río de Janeiro, Brasil

Triatoma rubrovaria es una especie silvestre con posible capacidad para la domiciliación y es considerada un vector competente de la enfermedad de Chagas. Su distribución incluye el sur de los estados de Paraná y Río Grande do Sul en Brasil y el nordeste de Argentina y Uruguay. En Río Grande do Sul (RS) fueron caracterizadas dos poblaciones distintas en términos cromáticos e iso-enzimáticos sugiriendo un aislamiento reproductivo entre estas poblaciones. En el presente estudio fueron analizadas las regiones intergénicas ITS1 e ITS2 y el gen 5.8S del ADNr de poblaciones de *T. rubrovaria* procedentes de Santana do Livramento (RS, Brasil), Santiago (RS, Brasil), Río Negro (Uruguay) y Salto (Uruguay). La longitud total de esta región osciló entre 1370 y 1375 pares de bases (pb) y su composición nucleotídica, sesgada hacia A+T, fue de 67,52%-67,98% (media 67,71%). Un total de 7 genotipos fueron detectados en las poblaciones estudiadas: 4 genotipos en Brasil (2 de ellos representan la población de Santana do Livramento y los otros 2 la de Santiago) y 3 genotipos en Uruguay. Las diferencias nucleotídicas totales fueron 9 en el ITS-1, con una divergencia nucleotídica entre las poblaciones del 1,23%, y 4 en el ITS-2, con una divergencia del 0,81%. El gen 5.8S es idéntico en todas las poblaciones (155 pb de longitud y 42,58% de A+T). Los genotipos

de la población de Santiago son los más diferentes y poseen una longitud menor del ITS-1 (725 pb) e ITS-2 (490 pb). Los resultados indican que ITS-1 e ITS-2 son buenos marcadores para demostrar la heterogeneidad entre cada una de las poblaciones de *T. rubrovaria* estudiadas. Es la primera vez que se detecta, tanto en el ITS-1 como en el ITS-2 en triatomini, una divergencia genética tal entre poblaciones de una misma especie que no es debida a microsátélites, sino a verdaderas mutaciones o inserciones/delecciones. La implicación en la vigilancia epidemiológica de la enfermedad de Chagas es evidente, ya que esta especie es la más frecuentemente encontrada tras el control de *T. infestans* en RS, Brasil.

Trabajo subvencionado por el Proyecto CDIA No. ICA4-2003-1000 del Programa INCO-DEV y ECLAT No. IC18-CT98-0366 del Programa INCO-DC (DG XII, EC, Bruselas), No. 3042/2000 de la Dirección General de Cooperación para el Desarrollo, Generalitat Valenciana (Valencia, España) y No. CO3/04 de la Red de Investigación de Centros de Enfermedades Tropicales - RICET, del Programa de Redes Temáticas de Investigación Cooperativa, Fondo Investigación Sanitaria, Ministerio de Salud, España.