

Proteína capaz de ligar ácidos grasos de *Trypanosoma cruzi* como marcador molecular de diagnóstico de la enfermedad de Chagas

Fatty acids binding protein of *Trypanosoma cruzi* as molecular marker for Chagas illness diagnostic

Ofelia Córdova Paz Soldán¹, Nury Letelly Cabrera Alva²

RESUMEN

Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la Enfermedad de Chagas, se caracteriza por poseer una estrecha dependencia metabólica con el hospedador gran incapacidad para sintetizar sus propios ácidos grasos. Sugiriendo la presencia de transportadores específicos que permitan incorporar ácidos grasos necesarios para la síntesis de nuevas membranas; como son las proteínas capaces de ligar los ácidos grasos, denominadas *fatty acid binding protein* (FABP).

Los estudios electroforéticos e isoelectroenfoque de la fracción purificada de *T. cruzi* revelan una proteína oligomérica con monómeros de ~10 kDa y punto isoelectrónico (pI) de 3,39, característica que entre otras la incluye en la familia de las FABP. La importancia de estas proteínas capaces de ligar ácidos grasos (FABP) no sólo incluye su papel bioquímico y fisiológico, sino también el de ser utilizadas como proteínas antigénicas, por ser estructuralmente muy conservadas y poseer diferentes secuencias aminoácidas. En este sentido, y a fin de demostrar su posible papel inmunogénico, se evaluaron los niveles de anticuerpos y la inducción de citocinas tras una inmunización con la fracción purificada de *T. cruzi* en ratones balb/c.

Estudios sobre las características de la enfermedad muestran una gran dificultad en la obtención de antígenos protectores contra *T. cruzi*. En relación a esto, nuestros resultados sugieren un papel muy importante de la FABP en la mediación de la respuesta inmune. Por tanto, en presencia del antígeno (FABP de *T. cruzi*) se habría estimulado la respuesta inmune celular Th1 con producción en abundancia de las citocinas sobre todo de INF- γ que activa a los macrófagos a la destrucción de amastigotes. La existencia de niveles incrementados de IgG, en animales inmunizados sugiere una activación de la respuesta Th1 frente a la Th2 y la posibilidad de utilizar proteínas como potenciales antígenos de vacunación o como una alternativa de antígeno para el diagnóstico de esta parasitosis.

Palabras clave: *Trypanosoma cruzi*, enfermedad de Chagas, transportador específico, proteínas antigénicas, ácidos grasos.

¹ Médico Cirujano. Profesora de la Escuela Profesional de Medicina Humana de la Universidad Privada Antenor Orrego.

² Alumna de Medicina Humana.

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi; etiologic agent of Chagas illness, has narrow metabolic dependency with lodger, and high incapacity to sintetize its own fatty acids. Suggesting the presence of specific carriers that make possible to incorporate necessary fatty acids for the synthesis of new membranes, as proteins that are able to bind fatty acids, known as fatty acid binding protein (FABP). Electrophoretic and isoelectroenfocusing studies of purified fraction of *T. cruzi* show an oligomeric protein with ~10 kDa monomers and 3,39 isoelectric point, characteristic that among others is included in the family of FABP. The importance of these proteins, with power to bind fatty acids (FABP), not only is their biochemical and physiological actions, but also to be used as antigenic proteins, due to the fact that they are structurally very conserved and have different aminoacids secuencias. At this sense, and the fact to show their possible immunogenic action, levels of antibody and citocine induction were evaluated, after an immunization with the purified fraction of *T. cruzi* in balb/c mice. Studies about characteristics of the ill show a high difficulty on obtaining protection antigens against *T. cruzi*. Regarding to this, our results suggest a very important role of FABP as intermediary for immune response. Therefore, in the presence of antigen (FABP of *T. cruzi*) immune cellular response Th1 would have been stimulated with abundant production of citocines, mainly INF- γ that make macrophags active for the destruction of amastigots. The existence of increased levels of IgG₂ in immunized animals suggests an activation of Th1 answer against Th2 and the possibility of using those proteins as potentials antigens of vaccination or as an alternative of antigens for the diagnostic of this parasitosis.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, chagas illness, specific transporte, antigen proteins, fatty acidos.

I. INTRODUCCIÓN

Trypanosoma cruzi es el agente etiológico de la enfermedad de Chagas, un problema de salud publica que carece de una quimioterapia e inmunoprofilaxis que ayuden a su control. Se encuentra actualmente influenciada por factores epidemiológicos, bioecológicos y socioeconómicos de la población rural de América Central y América del Sur (Dias 2000). Naturalmente afecta de 16 - 18 millones de personas en 21 países, con estimaciones de 500 000 personas infectadas año y con tasas de mortalidad mayor del 10-15 % en la fase aguda de la enfermedad. (WHO 2003).

Estudios sobre la fisiopatología de la enfermedad de Chagas evidencian una fuerte participación del sistema inmune en la patogénesis. Los primeros cambios aparecen con activación del complemento y una participación temprana de los factores humorales. Durante la infección aguda se ha demostrado la presencia de citocinas asociada con la respuesta celular CD4 tipo Th1, como el IFN α e IL2, IL6, IL12 y TNF. Asimismo, se observa una inducción de respuesta humoral y celular dependiente de linfocitos T en el punto de interacción parásito-célula, activación de la respuesta Th1 y una respuesta Th 2 con elevación de la IL4 e IL10 que conllevan fundamentalmente a la producción de anticuerpos (Andrade 1999). La fase crónica se caracteriza por una reacción inflamato-

ria con predominio de linfocitos T CD8+ (Tostes et al 1994).

Estudios sobre el metabolismo de *T. cruzi* muestran la utilización de proteínas y grasas como posible fuente energética exógena en las diversas formas evolutivas del parásito; así como una capacidad para enlogar su cadena de lípidos (Liendo 1998). Lípidos que no aseguran su supervivencia en cultivo, por lo que requieren de una fuente externa de ácidos grasos y colesterol, presente en el suero adicionado al medio (Cox 1996). Los ácidos grasos, por su naturaleza química, son insolubles o poco solubles en los medios acuosos, pueden ingresar a través de las membranas por simple difusión pasiva o siguiendo una cinética mediada por proteínas (Stremmel 1988), tales como las fatty acid binding proteins FABP (Ockner 1972).

Las FABP son proteínas citosólicas de 14 a 15 kDa, capaces de unirse reversible y no covalentemente a los ácidos grasos de larga cadena y/o moléculas hidrofóbicas con afinidad submicromolar. Son específicas de los diferentes tejidos (Banaszak 1994) y, a diferencia de otros tipos de proteínas, se caracterizan por su abundancia en los compartimentos tisulares y en orgánulos subcelulares como la mitocondria y el núcleo (Berger et al. 1996, Dowell y col. 1997). Han sido encontradas en células animales y vegetales (Arondel et al 1990), insectos (Cavagnari y col 1998), en nemátodos parásitos de plantas

(Blaxter 1998), y helmintos parásitos (Chabalgoty et al 1997, Malcolm y col. 2000).

La detección de anticuerpos contra antígenos de *T. cruzi* por métodos serológicos es el principal soporte para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. Las pruebas de diagnóstico que se utilizan actualmente se basan en extractos antigénicos de epimastigotes; formas no infectivas de *T. cruzi* que limitan la especificidad, debido a la ausencia de regiones con epítopos reactivos para IgG e IgM presentes en pacientes con enfermedad de chagas congénita (Umezawa and Silveira 1999). Por tanto, los test de inmunodiagnóstico deberían basarse en fracciones de *T. cruzi* con epítopos de aceptable grado de pureza que permitan evaluar y diagnosticar eficientemente la infección (Umezawa and Silveira 1999).

Los modelos de inmunización que se vienen realizando en la enfermedad de Chagas refieren una inmunoprotección contra *T. cruzi* por los linfocitos T CD8 (+) citotóxicos (CTL) y las moléculas MHC clase I activadas, pero no de las células CD4 o linfocitos B que bloquean la inducción de anticuerpos IgG1 y de células Th1-CD4, controlando de esa manera la parasitemia (Miller et.). Sin embargo, otros estudios indican una fuerte respuesta humoral contra el parásito dominada por altos títulos de IgG₁ e IgG₂ anti *T. cruzi* (Wizel B et al. 1998). La protección inmunológica contra la infección experimental con *T. cruzi* ha sido posible con varias vacunas experimentales, incluyendo péptidos sintéticos del parásito (Umezawa 1999). La detección de las FABP por anticuerpos producidos en diversas enfermedades, como el reconocimiento de la FABP purificada de *G. lamblia* (GI-FABP) por Ig A de pacientes con giardiasis, (Hassan y col. 2002) la protección lograda con las FABP de *Leishmania* (Maache et al. 2003), o el uso de antígenos recombinantes de *S. mansoni* (rSm14) que provee total protección contra *F. hepática* sin causar respuesta autoinmune (Hillyer 1995, Sirisio y col. 2002), sugieren la posibilidad de utilizar las FABP purificadas de *T. cruzi* (Tc-FABP) como posible péptido de vacuna en la Enfermedad de Chagas.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

2.1 Cultivo *in vitro* del parásito

La cepa de *Trypanosoma cruzi* utilizada en el presente trabajo fue la cepa TP₁ aislada de *P. chinai*, triatomino recolectado en La Libertad - Perú y caracterizada en España (Miralles et al. 2002). La cepa *T. cruzi* Maracay, donada por la Universidad de Granada - España, ha sido utilizada como cepa de referencia las formas epimastigotes fueron cultivadas en medio Grace's a 28 °C. Las formas

metacíclicas del parásito fueron obtenidos siguiendo la metodología descrita por Osuna y col. (1979).

2.2 Obtención de proteínas capaces de ligar los ácidos grasos en *T. cruzi*

El aislamiento y la purificación de las proteínas capaces de ligar ácidos grasos FABP de *T. cruzi* se realizó cromatografiando un extracto de las formas epimastigotes de *T. cruzi*, en diversas columnas de afinidad: (a) Bio Bead para remover el detergente, (b) lipidex para remover los ácidos grasos libres o ligados a proteínas y, (c) sephadex para separar eficaz y rápidamente la FABP del resto de biomoléculas de afinidad. La concentración de proteínas se determinó por absorbancia siguiendo el método de Bradford con albúmina bovina como proteína estándar (Bradford 1976).

2.3 Electroforesis e Isoelectrofoque

Con la finalidad de determinar la masa molecular relativa de la proteína purificada y la migración de las proteínas según sus cargas hasta llegar a valores de pH del punto isoeléctrico, se realizaron técnicas electroforéticas e isoelectroenfoque de la fracción purificada de *T. cruzi* en geles de SDS-PAGE al 12,5% e Isoelectroenfoque con pI 3-9, respectivamente. Después del corrido electroforético e isoelectroenfoque de las proteínas, se tiñeron con nitrato de plata o azul de Comassie hasta visualizar las bandas proteicas.

2.4 Estudios Serológicos

A fin de evaluar la capacidad antigénica, se procedió a hacer reaccionar la fracción proteica purificada con sueros de pacientes con la Enfermedad de Chagas (positivos con la técnica de IFI y Elisa) y otra enfermedad parasitaria y bacteriana.

a) Elisa (Enzyme-linked immunoabsorbent assay)

A fin de encontrar anticuerpos IgG que reaccione con la FABP de *T. cruzi*, la fracción purificada fue diluida a 1 µg/50 µl y se le hizo reaccionar en un período específico de tiempo y de temperatura con los sueros de pacientes con Enfermedad de Chagas diluidos a: 1/100, 1/200, 1/400, 1/800, 1/1600, 1/3200; posteriormente, se le incubó con el inmunoconjugado (anti IgG marcada con peroxidasa) a 37 °C durante 30 min. Finalmente, se le adicionó el substrato específico (agua oxigenada) y se cuantificó espectrofotométricamente a 492 nm. El rango normal de cada ensayo fue definido como la media más tres desviaciones estándares para las 20 muestras de sueros de pacientes enfermos.

b) Wester Blott

Siguiendo el método de Towbin et al. (1979), la proteína purificada fue separada por electroforesis en geles SDS-PAGE al 20% y transferida a membrana de nitrocelulosa. Seguidamente, se procedió a bloquear e incubar a 37 °C durante 3 h con sueros positivos para Chagas, Lepra y Leishmaniosis, diluidos 1/50. Transcurrido ese tiempo, se incubó con el inmunoconjugado (anti IgG humana marcada con peroxidasa) y se le hizo reaccionar con diaminobenzidina y H₂O₂. El suero control positivo y negativo fue incluido en cada experimento.

2.5 Estudios de Inmunización

Para evaluar el carácter inmunizante de la proteína purificada de *T. cruzi*, la proteína acoplada se inyectó a partículas de alúmina (coadyuvante) vía intradérmica en dosis de 1 µg/ml cada 7 días (con un total de 4 dosis). En forma aleatoria, se distribuyó 2 grupos de 05 ratones: (i) un grupo control conformado por ratones solamente inmunizados, y (ii) un grupo problema constituido por ratones infectados e inmunizados. Tras la última inyección de la suspensión inmunizante, se inoculó tripomastigotes metacíclicos de *T. cruzi* como única inoculación

intraperitoneal a ambos grupos de ratones. Después de 30 días se anestesiaron y se sacrificaron por punción cardíaca para obtener suero.

a) Investigación de la respuesta celular

Para la inducción de la producción de citocinas, se extrajeron linfocitos del bazo de ratones inmunizados e infectados y de los ratones control (no inmunizados), los que se cultivaron y sensibilizaron con epimastigotes a 37 °C, 5 % de CO₂ durante 24 h. Transcurrido el tiempo, se centrifugaron y el sobrenadante fue transferido para su estudio de citocinas. La evaluación de citocinas: INF-γ (efector de la respuesta celular tipo Th1) e IL4 (efector de la respuesta celular tipo Th2), se realizó mediante una ELISA sándwich cuantitativa, del Kit Quantikine® (R & D Systems Europe, Inc).

b) Investigación de la respuesta humoral

Determinación de los Títulos de IgG anti FABP

Mediante esta técnica se sensibilizaron los pocillos de ELISA con formas epimastigotas y se cuantificaron los niveles de IgG anti FABP. Luego, se incubaron con suero de ratón (control) y el suero anti Tc-FABP a las diluciones de 1/100,

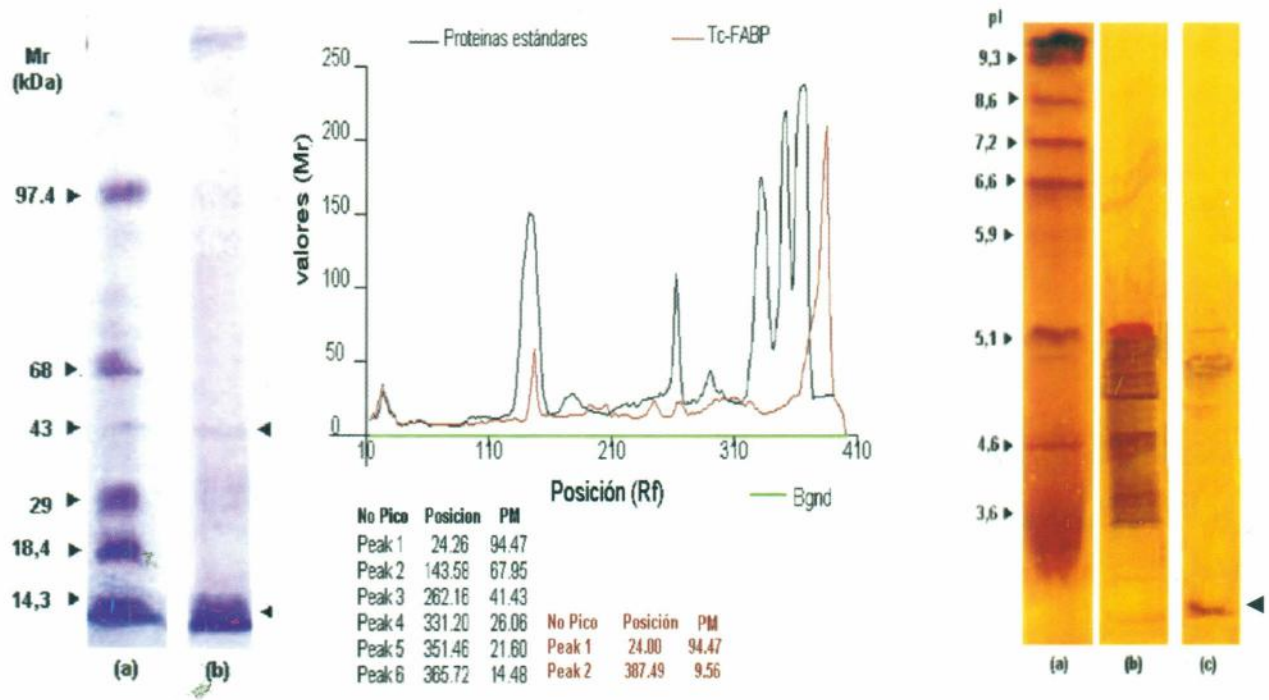
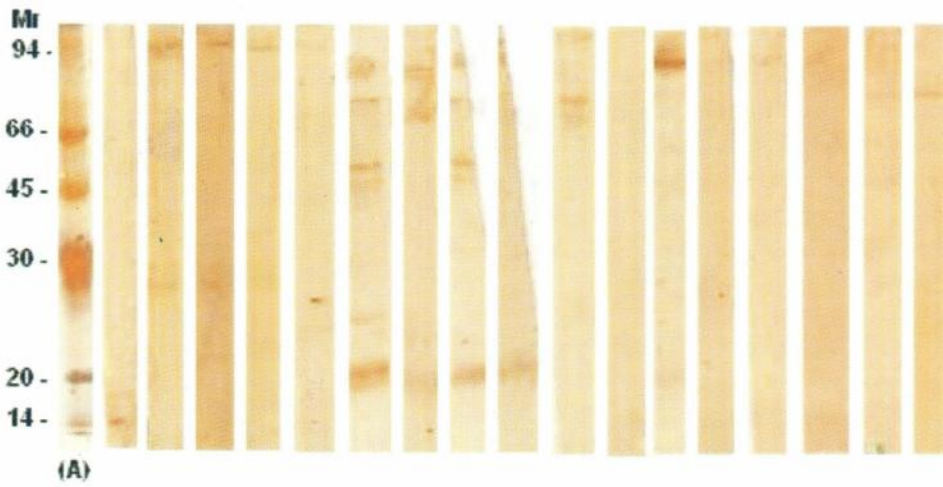
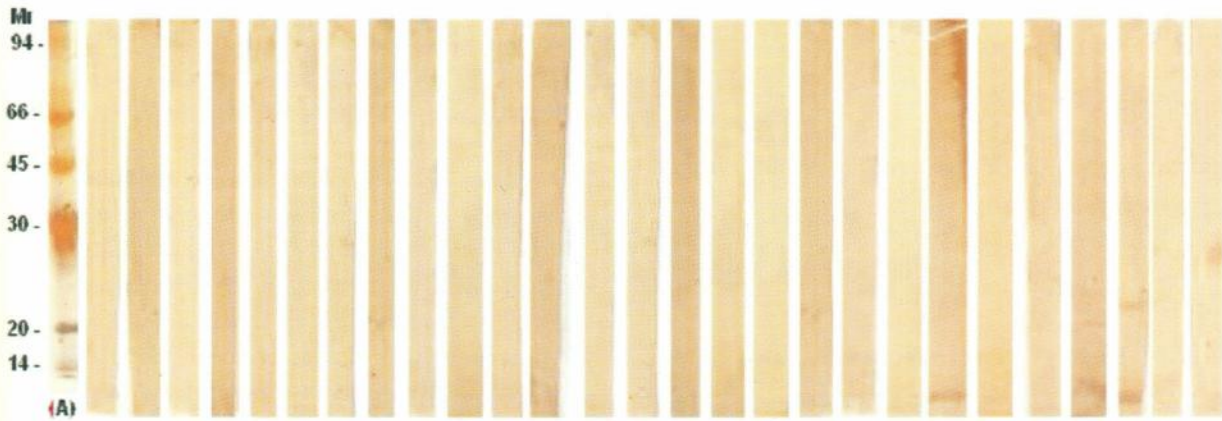


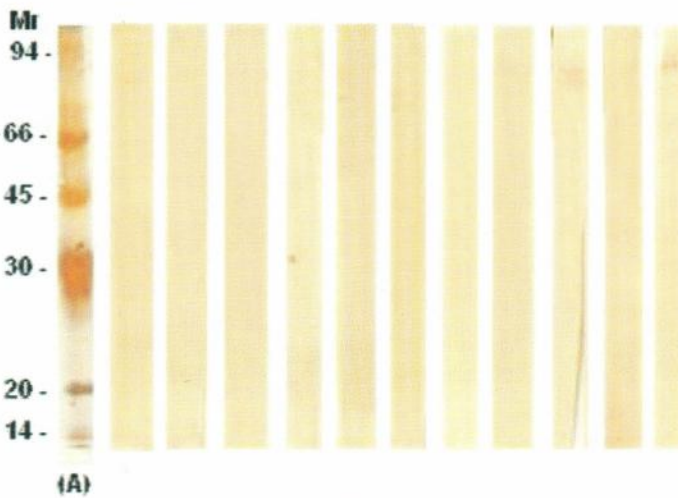
Figura 1. A la izquierda: SDS-PAGE en geles 12,5% teñidas con Azul de Comassie: (a) Proteínas estándar (b) Fracción purificada de *T. cruzi*. Al centro: se observa la presencia de una banda de ~ 10 kDa de acuerdo al programa Quanti Scan v 1.25. A la derecha: IEF en Phast Gel 3-9 teñidas con nitrato de plata: (a) Proteínas estándar (b) fracción purificada diluida 3:1 (c) fracción purificada 1:1



a)



b)



c)

Figura 2. a) Inmunoblott frente a sueros positivos para Chagas (A) proteínas marcadoras.
b) Inmunoblott frente a sueros positivos para leishmaniosis. (A) proteínas marcadoras.
c) Inmunoblott frente a sueros positivos para lepra. (A) proteínas marcadoras

1/200, 1/400, 1/800, 1/1600 y 1/3200, a 37 °C durante 30 min. Posteriormente, se incubó con anti IgG marcada con peroxidasa y, finalmente, se desarrolló con peróxido de hidrógeno. Los niveles de IgG se midieron a 492 nm en espectrofotómetro. El rango normal de cada ensayo fue definido como la media más tres desviaciones estándares para las 20 muestras de sueros de pacientes enfermos.

Isotipaje

Transcurrido los 30 días, la sangre fue extraída por punción cardíaca de los ratones en estudio y se obtuvo el suero. Los niveles de anticuerpos específico para la FABP de *T. cruzi* (candidato de vacuna) fue determinado por la técnica de ELISA de captura, evaluando la clase e isotipo de anticuerpo: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, IgM e IgE, mediante el kit de anticuerpo monoclonal de ratón (Sigma).

2.6 Análisis Estadístico

Los datos inmunológicos fueron recolectados e ingresados en un programa informático SLIDE WRITE vs 6.0, realizándose análisis de regresión, desviación standard y comparación de medias.

III. RESULTADOS

3.1 Electroforesis e Isoelectrofoque

Las técnicas electroforéticas en geles de SDS-PAGE al 12,5% revelando la banda de ~10 kDa. El punto isoelectrico de las diferentes diluciones de la fracción purificada de *T. cruzi* en geles de IEF 3-9 muestra una banda común en todas las diluciones de pI 3,39 y bandas con pI entre 5 a 3 (Figura 1).

3.2 Estudios Serológicos

Wester Blott

Se observa un reconocimiento de la bandas de 10 y de 90 kDa en un 75% de los casos y la banda de 28 kDa en un 25%. En los sueros de leishmaniosis se observó un reconocimiento del 10% para la banda de 10 kDa; mientras que con los sueros de Lepra no se observa reconocimiento antígeno-anticuerpo (Figura 2A, 2B, 2C).

3.3 Estudios de Inmunización

a) Investigación de la respuesta celular

Los resultados muestran altos niveles de INF- γ y de IL-4 en muestras de sobrenadante de linfocitos esplénicos sensibilizados con epimastigotes. También, se ha observado que los niveles de IL-4 son mayores con res-

pecto a los del INF- γ indicando una estimulación de la respuesta Th2 más activa que la Th1 (Figura 3A, 3B).

b) Investigación de la respuesta humoral

Los resultados revelan que el nivel de IgG1 se incrementan en la semana 4 de inmunización, potenciando de esta manera la respuesta humoral protectora frente a *T. cruzi*.

IV. DISCUSION

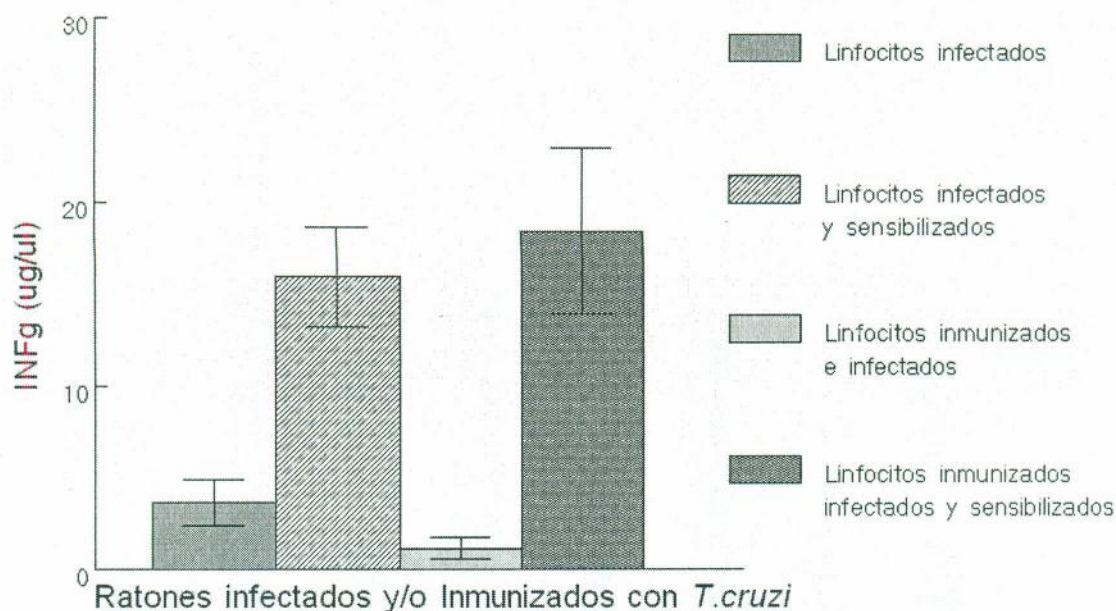
Trypanosoma cruzi, como la mayor parte de los protozoos parásitos, se caracteriza por una poseer una estrecha dependencia metabólica del hospedador. La imposibilidad de sintetizar sus propios ácidos grasos (Michael y col, 1999) supone la necesidad de incorporar los ácidos grasos por procesos de difusión a través de las membranas o mediante la presencia de transportadores específicos de este proceso, como las proteínas capaces de ligar los ácidos grasos descritas en otros organismos: *fatty acid binding protein* FABP.

La existencia de FABP en algunos protozoos parásitos, incluso más primitivos evolutivamente hablando como *Giardia* (Hassan et al, 2001), o como el caso de *Leishmania* (Maache et al., 2003) parásito perteneciente también a la misma familia Trypanosomatidae, corroboran la presencia de estas proteínas en *T. cruzi*. Esta proteína purificada muestra ser una proteína oligomérica de aproximadamente 60 kDa en su estado nativo, que mediante técnicas electroforéticas en SDS-PAGE, da monómeros de ~10 kDa (Figura 1), caracterización que la incluye en la familia de las proteínas de bajo peso molecular (Ockner, 1972). La proteína FABP de *Giardia* muestra tener una masa molecular de 8 kDa y un punto isoelectrico de 4,96 (Hassan, <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=pubmed&cmd=Search&term=%22Hassan+SM%22%5BAuthor%5D>> 2005).

Los estudios de isoelectroenfoque de esta proteína, revela que posee un punto isoelectrico (pI) de 3,39. (Figura 1), que es similar al observado en protozoos patógenos como *Giardia* (Hassan et al 2001) y *Leishmania* (Maache 2003), indicando el carácter ácido de esta proteína semejante al observado en otras FABP. Si bien existen bandas con pI 3,39; 4,47 y 5,24 (Figura 1), éstas podrían corresponder a las diferentes familias de proteínas o isoformas tras la agregación de la misma (Murphy y col 1999), semejante al observado a la isoforma nFh12 de pI 5,45 aislada de las formas adultas de *Fasciola hepatica*, que dependiendo del tipo de isoforma la reactividad inmunológica varía (Espino et al, 2001).

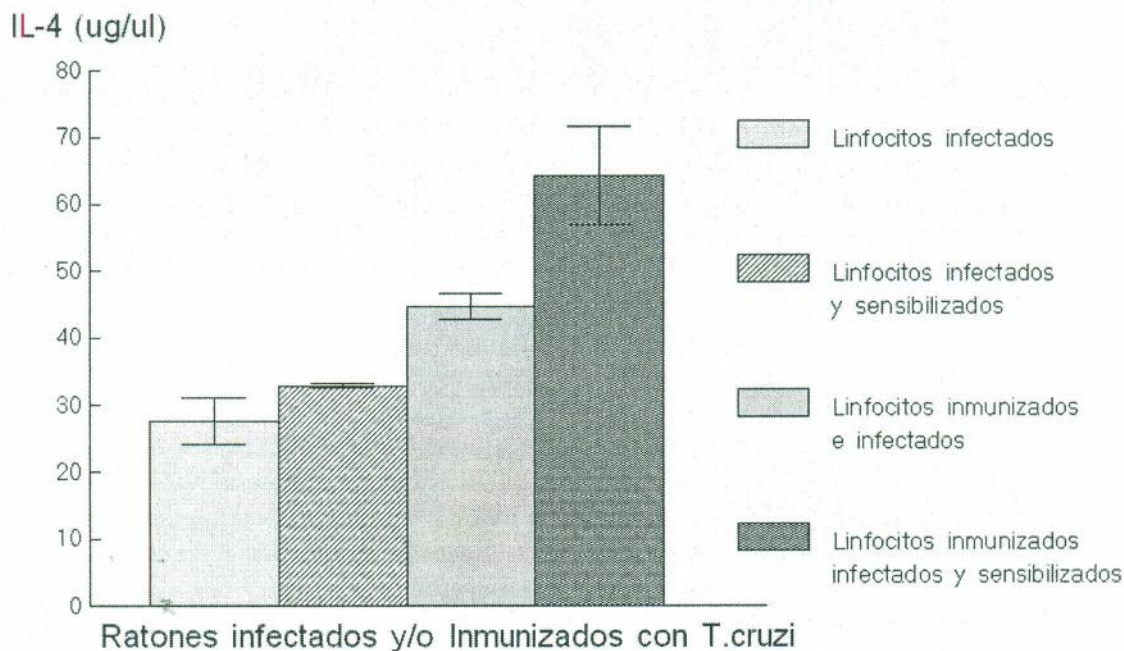
El estudio de las proteínas capaces de ligar ácidos gra-

Producción de IFN γ en linfocitos esplénicos



a)

Producción de IL-4 en linfocitos esplénicos



b)

Figura 3. a) Niveles de IFN- γ en linfocitos esplénicos sensibilizados e inmunizados con la proteína purificada de *T. cruzi*.

b) Niveles de IL-4 en linfocitos esplénicos sensibilizados e inmunizados con la proteína purificada de *T. cruzi*

(Figura 3A) e IL-4 (Figura 3B), sugiriendo una activación de las células T CD4⁺ y CD8⁺, resultados similares a los observados en macrófagos *in vivo* durante una infección por *T. cruzi*. La determinación de los niveles de INF- γ y de IL-4 muestra que los niveles son mayores en ratones inmunizados e infectados con respecto a ratones infectados, resultados que son similares a los obtenidos con las FABP aisladas de *Leishmania* (Maache et al, 2003) y las purificadas de helmintos parásitos como *Fasciola hepatica* (Hillyer, 1995, Espino et al, 2001), *F. gigantica* (Fg-FABP) (Sirisrio et al, 2002). En relación a nuestros resultados, se puede opinar que la FABP desempeña o protagoniza un papel muy importante en la mediación de la respuesta inmune, dependiente de una interacción entre la respuesta inmune parcialmente protectora y la respuesta que incrementa los síntomas de la enfermedad, es decir, la inducción de anticuerpos especialmente IgG₂. Por tanto, durante la respuesta inmunitaria, y en presencia del antígeno (FABP de *T. cruzi*), la producción en abundancia de las citocinas podría ser estimulada por la presencia de este antígeno dada su importancia en la producción del INF- γ (Figura 3A) que activaría los macrófagos para la destrucción de los amastigotes (Zhang y Tarleton, 2001).

Las FABP de *T. cruzi* inducen una respuesta inmune tipo Th1/Th2 semejante a lo que ocurre en la infección con *T. cruzi* (Di Noia et al, 2002), sugiriendo esta doble inducción un reconocimiento común de epítopos de la Tc-FABP por las células pertenecientes a los tipos Th1 y Th2. En humanos, la distribución de células productoras de citocinas en tejidos del miocardio revela que la activación de las células de tipo Th2 se asocia generalmente con una gran liberación de antígenos del parásito (De Reis et al, 1997).

La elevación de los niveles de IgG₁ (Figura 4) encontrados en los ratones inmunizados frente a lo que ocurre en los simplemente infectados sugiere en los primeros una activación de la respuesta Th1 frente a la Th2. Araujo y colaboradores (1999) consideran que los amastigotes, dentro de los macrófagos, inducen un equilibrio entre las citocinas liberadas por las Th1 y por las citocinas Th2 de los macrófagos supresoras de la Th1, es decir la IL-10 y el TGF β o por las citocinas equivalentes, liberadas por linfocitos CD8⁺. Los datos procedentes tanto de la producción de anticuerpos como de los indicadores de una activación de la respuesta inmune celular Th1 sugieren que estas proteínas podrían ser una alternativa importante para investigar la posibilidad de usarlas tanto de antígeno diagnóstico frente a esta parasitosis como potencialmente antígenos de vacunación.

La experiencia previa con otras FABP aisladas de parásitos con las que se logra altos porcentajes de protección como la producida con las FABP de *Leishmania* (Maache et al, 2003), o la utilización de antígenos recombinantes de FABP de *S. mansoni* (rSm14) (Hillyer 1988, Tendler y col. 1996, Sirisrio y col. 2002), donde se consigue una elevadísima protección que ronda una protección total contra *F. hepática*, sin causar respuesta autoinmune; anima a continuar ensayando nuevos sistemas de inmunización directamente con las Tc-FABP o con los genes o fragmentos de los mismos, a fin de poder estudiar una potencial inmunización activa frente a este agente infeccioso productor de una de las enfermedades más dañinas a nivel mundial.

V. CONCLUSIONES

1. Los estudios inmunológicos revelan que la proteína purificada de *T. cruzi* es altamente antigénica capaz de ser reconocida por los sueros de pacientes con la enfermedad de Chagas, no así con los sueros de otras enfermedades parasitarias y bacterianas; por lo que podría ser utilizada como antígenos de diagnóstico.
2. La inmunización de ratones con la FABP purificada de *T. cruzi* induce la producción de INF- γ , IgG₁ e IL-4 e IgG₂; indicadores de una respuesta celular Th1 y Th2 respectivamente.
3. Dado el carácter inmunogénico de las proteínas purificadas FABP de *T. cruzi* y en base a la activación de la respuesta Th1, se sugiere como una alternativa potencial de inmunización frente al parásito.

VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Andrade Z.A 1999. Immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz vol 94 (Suppl 1):*71-80.
- Araújo-Jorge Tania C. 1999. Biology and Ultra-structure of *Trypanosoma cruzi*: a 90 -years Old Challenge for Scientists) *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I:* 131-134.
- Banaszak L., Winter N., Xu Z., Bernlohr D. A., Cowan S., Jones T. A. 1994. Lipid-binding proteins: a family of fatty acid and retinoid transport proteins. *Adv. Protein Chem.* 45:89-151.
- Bradford M.M. 1976. A rapid and sensitive methods for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254.
- Brito Cf, Caldas IR, Coura Filho P, Correa-Oliveira R. Oliveira SC. 2000. CD4+ T.cells of schistosomiasis naturally resistant individuals living in an endemic area produce interferon-gamma and tumour necrosis factor-alpha in response to the recombinant 14 kDa *Schistosoma mansoni* fatty acid-binding protein. *Scand J. Immunol* 51(6): 595-601.
- Cavagnari B.M; P.Y. Scaraffia, N.M. Gerez de Burgos y J.A. Santomé 1998. Cambios ultraestructurales y presencia de una FABP en músculos de vuelo de "Dipetalgastermaximus" XXXIV Reunión Anual de SAIB. 25, 26 y 27 de noviembre de Mendoza.
- Chabalgoity J.A., J.A. Harrison, A. Esteves, R. Demarco de Hormae-

- che, R. Ehrlich, C.M. Khan, and C.E. Hormaeche. 1997. Expression and immunogenicity of an *Echinococcus granulosus* fatty acid-binding protein in live attenuated *Salmonella* vaccine strains. *Infect. Immun.* 65(6):2402-12.
- Cox F.E.G. 1996. *Modern Parasitology. A textbook of Parasitology. Second Edition.* BLACKWELL Science Ltd. Cambridge. USA. Pag. 2-4 y 129-131.
- Di Noia Javier M., Carlos A. Buscaglia, Claudia R. De Marchi, Igor C. Almeida y Alberto C.C. Frasch 2002. A *Trypanosoma cruzi* Small Surface Molecule Provides the First Immunological Evidence that Chagas' Disease Is Due to a Single Parasite Lineage. *The Journal of Experimental Medicine*, Volume 195 (4): 401-413.
- Dias JCP 2000. Epidemiologia. In Z Brener, Z Andrade, M Barral-Netto (eds), *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*, 2ª ed., Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p. 48-74.
- De Reis GA 1997. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Today* 13: 335-341.
- Espino A.M. y G.V. Hillyer. 2001. Identification of fatty acid molecules in a *Fasciola hepatica* immunoprophylactic fatty acid-binding protein. *J. Parasitol.* 87(2): 426-428.
- Hasan S., Diaz de la Guardia R., Maasse M, Córdova O., Mascaró MC and Osuna A. 2001. Isolation and purification of a fatty acids binding protein in *Giardia*. *Rev. Iber. Parasitol.* 61 (3-4), 59 - 66.
- Hasan S.M., Maachee M, Cordova O, Diaz de la Guardia R, Martins M y Osuna A. 2002 Human Secretory Immune Respose to fatty Acid- Binding Protein Fraction from *Giardia lamblia*. *Infection and Immunity* 70(4) : 2226- 2229.
- Hassan SM, Maache M, de la Guardia RD, Cordova OM, Garcia JR, Galiana M, Castroviejo DA, Martins M, Osuna A. Binding properties and immunolocalization of a fatty acid-binding protein in *Giardia lamblia*. *Parasitol.* 2005 Apr;91(2):284-92).
- Hillyer G.V. 1985. Induction of immunity in mice to *Fasciola hepatica* with *Fasciola/schistosoma* cross-reactive define immunity antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 34: 1127-1131.
- Hillyer GV. 1995. Comparison of purified 12 kDa and recombinant 15 kDa *Fasciola hepatica* antigens related to a *Schistosoma mansoni* fatty acid binding protein. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 90(2): 249 - 53.
- Liendo A, Lazard K, Urbina JA. 1998. Antiproliferative effects and mechanism of action of D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *J Antimicrob Chemother* 41:197-205.
- Maache M, Azzouz S, Gil JR, Galiana M, Córdova OM, Alvarez P, Diaz de la Guardia R. y Osuna A. 2003. Purification and Immunolocalization of a Fatty Acid Binding Protein in *Leishmania*. *Eur J Biochem.* Enviada.
- Maache M, Azzouz S, Diaz de la Guardia R, Alvarez P, Gil R, de Pablos LM, Osuna A. Host humoral immune response to *Leishmania* lipid-binding protein. *Parasite Immunol.* 2005 Jun;27(6):227-34.
- Malcolm W. Kennedy, Julie C Scott, Stevonn LO, Jeremy Beauchamp y Donald P. McManus. 2000. Sj-FABP fatty acid binding protein of the human blood fluke *Shistosoma japonicum*. *Boichem. J* 349. 377-384.
- Murphy E.J., R.D Edmondson, D.H. Russell, S. Colles, and F. Schroeder. 1998. Isolation and characterization of two distinct forms of liver fatty acid binding protein from rat. *Bioch. Biophys. Acta.* 1436: 413-425. Ockner R. K., Manning J.A., Poppenhausen R.B., Ho W.K.L. 1972.
- Ockner R. K., Manning J.A., Poppenhausen R.B., Ho W.K.L. 1972. A binding protein for fatty acids in citosol of intestinal mucosa, liver, myocardium and other tissues. *Science* 177: 56-58-58.
- Osuna A, Jimenez-Ortiz A, Lozano- Maldonado J. 1979. Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Iberica de Parasitología* 39: 129 - 133.
- Sirisrio A; R. Grams, S. Vichasri-grams, P. Ardeusngneon, V. Pankao, A. meepool, K. Chaithrayanon, V. Viyanant, P. Tan-Ariya, E.S. Upatham, P. Sobhon. 2002. Production and characterization of monoclonal antibody against recombinant fatty acid binding protein of *Fasciola gigantica*. *Veterinary Parasitology.* 105: 119-129.
- Towbin H., Staehelin T. y Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76, 4350-4354.
- Tostes Jr S, Lopes ER, Pereira FEL, Chapadeiro E. 1994. miocardite chagásica crónica humana: estudio cuantitativo dos linfocitos CD4 e dos Cd8+ no exsudato inflamatorio. *Rev Soc Bras Med Trop* 27: 127-134.
- Umezawa Eufrosina Setsu, José Franco da Silveira. 1999. Serological Diagnosis of Chagas Disease with Purified and Defined *Trypanosoma cruzi* Antigens *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I: 285-288.*
- Wizel B, Palmieri M, Mendoza C, Arana B, Sidney J, Sette A, Tarleton R. Human infection with *Trypanosoma cruzi* induces parasite antigen-specific cytotoxic T lymphocyte responses. *J Clin Invest* 1998 Sep 1;102(5):1062-71.
- WHO/World Health Organization. 2003. Tropical Disease Research, Publications, Geneva, Switzerland. Agust 17.
- Zhang L, Tarleton RL 1996. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol* 84: 203-213.