

Efecto *in vitro* de una sustancia alcaloidea aislada de *Amphimedon viridis* (Porifera) sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*

Edgar Marchán M.¹, Dwight Arrieche¹, Willian Henríquez² y Oscar Crescente²

¹Instituto de Investigaciones en Biomedicina y Ciencias Aplicadas, IIBCA-UDO, Cumaná, Venezuela. Tel. (58-93) 514185. Fax: 521297; ,

²Dpto. Química., Esc. Ciencias, Núcleo Sucre, UDO, Cumaná, Venezuela. Telf: 302462; Fax: 513780; ,

Recibido 29-VI-2000. Corregido 3-VII-2000. Aceptado 6-VIII-2000.

Abstract: The dose dependent antiproliferative effect of an alkaloidal substance extracted from the sponge *Amphimedon viridis* was tested on *Leishmania mexicana* promastigotes. Sponges were collected in Isla Larga, Venezuela (10° 20' 20" – 10° 24" N, 64° 19' - 64° 22' W), cut and dipped in methanol for vacuum filtering extraction every 24 hr. The aqueous extract was separated by chromatography over silica gel. The parasites were from the Venezuelan NR strain. Their growth rate was reduced by 50 % with a dose of 10 µg/ml in 48 hr, whilst concentrations of 30 and 40 µg/ml induce leishmanicidal action after 110 and 20 min, respectively. Lysis is preceded by an immediate increase in cellular volume associated with progressive damage of cellular content and the destruction of organelles. These findings suggest that one important factor associated with the antiproliferative effect of this alkaloidal substance on *L. mexicana* promastigotes is the loss of the plasma membrane selective permeability.

Key words: Marine sponge, *Amphimedon*, *Leishmania*, natural product, alkaloid.

Desde 1985 la leishmaniasis es considerada como un problema de salud pública mundial. 350 millones de personas habitan en zonas de alto riesgo, registrándose durante 1997, 80 000 muertes y una prevalencia de 12 millones de casos (Reportes de la UNDP/WB/WHO 1995, 1998).

En la actualidad, no hay drogas eficaces para el tratamiento de esta enfermedad; además, causan efectos colaterales muy severos. La quimioterapia de la leishmaniasis consiste en el uso de los antimoniales pentavalentes (Sbv), utilizados en la forma de estibogluconato de sodio (Pentostan) o anti-

moniato de meglumina (Glucantime), las cuales son las drogas a escoger para tratar todas las formas de la enfermedad, a pesar de la toxicidad renal y cardíaca asociadas. A esto se unen las dificultades para su administración por los largos períodos de tratamiento requeridos y los elevados costos. La resistencia de los parásitos a los antimoniales es otro problema grave que está haciendo más difícil el tratamiento de la leishmaniasis (Canto-Cavalheiro *et al.* 1996, Ramos *et al.* 1996, Machado-Coelho *et al.* 1996).

Ante esta realidad compleja, las esponjas marinas, fuente de una gran variedad de pro-

ductos naturales, constituyen un potencial a evaluar en la búsqueda de nuevas alternativas racionales para combatir esta enfermedad. De estos invertebrados se han aislado compuestos con propiedades citotóxicas como alcaloides, teopederinas y micalamidas, además de isocianatos, derivados de aminoácidos policlorados y sesquiterpenos funcionalizados con grupos poco comunes, que están siendo evaluados (Angerhofer *et al.* 1997, Byriel *et al.* 1997, Charan *et al.* 1997, Dundei *et al.* 1997, Garson *et al.* 1997).

En *Amphimedon viridis*, Berlinck *et al.* (1997) demostraron la existencia de una potente actividad hemolítica y antimitótica en un extracto butanólico y aislaron una halitoxina con propiedades cito y neurotóxicas como la de *A. compressa*. Henríquez *et al.* (1997), partiendo también del extracto butanólico de *A. Viridis*, aislaron una fracción metanólica por métodos cromatográficos con una notable actividad antibacteriana y un amplio espectro de acción que incluye bacterias Gram positivas y Gram negativas patógenas.

Este trabajo describe el efecto *in vitro* de la fracción metanólica aislada de *A. viridis* sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Esponjas marinas: Los ejemplares de la esponja azul, *Amphimedon viridis*, Duchassaing y Michelotti 1864 (Porifera: Demospongiae), fueron recolectados alrededor de Isla Larga, Bahía de Mochima, Estado Sucre, Venezuela (10° 20' 20" – 10° 24" Lat. N, 64° 19' - 64° 22' Long. W).

Procesamiento de las muestras: La esponja fresca fue cortada en trozos que fueron colocados en metanol, luego se realizaron extracciones sucesivas por filtración al vacío con papel de filtro Whatman No. 1, cada 24 horas hasta el agotamiento. El metanol fue evaporado a presión reducida en un roto-evaporador (Büchi) a 40 °C, resultando una solución acuosa, la cual fue particionada con n-butanol. La fase butanólica se

concentró y este extracto se fraccionó a través de cromatografía de columna al vacío (CCV) sobre sílica gel para cromatografía de capa fina (TLC) en un crisol filtrante, usando n-hexano, acetato de etilo, acetona y metanol. Luego se fraccionó el extracto obtenido en metanol sobre gel de Sephadex LH-20 con mezclas de acetato de etilo-metanol (2: 1, 1: 1, 1: 2) y metanol.

Las pruebas químicas para alcaloides (reactivo de Dragendorff) se realizaron mediante el método descrito por Marcano y Hasegawa (1991), mientras que los análisis de RMN ¹H se hicieron a 400 MHz (Bruker, 400 MHz) usando metanol deuterado como disolvente y tetra metil silano (TMS) como estándar interno. También fueron analizadas las muestras a través de un cromatógrafo de gases (CG) (Hewlett Packard 5890 serie II) acoplado a un detector por espectrometría de masas (EM) (Hewlett Packard 5971A).

Parásitos: Se utilizaron promastigotes de *Leishmania mexicana* (cepa NR), originalmente aislada en 1980 de un paciente venezolano con leishmaniasis tegumentaria difusa. Se cultivaron en medio Schneider-*Drosophila* a 26 °C, suplementado con 5 % de suero fetal bovino. Los cultivos fueron iniciados con 2x10⁶ promastigotes/ml y se añadió la fracción de *A. viridis*: 4, 10, 20, 30 y 40 µg/ml disuelta en el mismo medio, al alcanzar una densidad de 10⁷ promastigotes/ml (fase exponencial del crecimiento). La densidad celular fue medida indirectamente en un espectrofotómetro a 560 nm y por cuenta directa en un hemocitómetro.

Microscopía electrónica de transmisión: Se tomaron alícuotas (1 ml) de los cultivos, antes del tratamiento (controles) y a las 48 horas después de añadir la fracción alcaloidea de *A. Viridis*. Estas alícuotas se centrifugaron (1 000 gravedades durante 5 min), lavando el sedimento con tampón fosfato de sodio (PBS, pH = 7.4, 0.1 M), luego se fijó con glutaraldehído (2.5%, en PBS 0.1 M, 4 °C, 90 min), se lavó el sedimento, se incluyó en agar-agar, seguido de post-fijación en tetróxido de osmio (1 %, 90 min.) y se

Los cortes finos se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo (Reynolds 1963), y se observaron en un MET H-600.

RESULTADOS

Mediante el análisis de CG/EM de la fracción metanólica purificada de *A. viridis* se evidenció la presencia de una sustancia predominante que presenta un ion molecular de 238 m/z. Los análisis de RMN ^1H revelan señales a desplazamientos químicos: δ 7.58 dd, 6.11 dd, 5.43 q, 5.24 q, 2.33 t, 2.01 q y 0.94 t. Por otra parte, la prueba positiva con el reactivo de Dragendorff indica que el compuesto es de naturaleza alcaloidea, y la reacción negativa a la ninhidrina indica que no es un péptido.

La sustancia alcaloidea afectó la proliferación de los promastigotes de *L. mexicana*, inhibiendo el crecimiento de una manera dependiente de la dosis (Fig. 1). Con 10 $\mu\text{g/ml}$ del compuesto se inhibió la velocidad del crecimiento 50 % en 48 hr (CI_{50}), mientras que con 20 $\mu\text{g/ml}$ hubo una inhibición total e inmediata del crecimiento, correspondiendo a la concentración mínima inhibitoria (CMI). Con 30 y 40 $\mu\text{g/ml}$ se induce la lisis celular a los 110 y 20 minutos, respectivamente. La dosis letal al 50% (DL_{50}) para 20 minutos de tratamiento corresponde a 40 $\mu\text{g/ml}$. Bajo estas dos últimas condiciones, por observaciones directas de los parásitos se pudo constatar un cambio de la forma celular, pérdida de la movilidad e hinchamiento hasta transformarse en formas totalmente esféricas, que preceden la lisis celular.

Los promastigotes control son de forma alargada, de citoplasma electrónico denso con un gran número de ribosomas libres o asociados con el retículo endoplasmático rugoso (rer). Se observó la presencia de gotas de lípidos (0.3 – 1.2 μm) y de vacuolas conteniendo gránulos de polifosfatos. El núcleo es típico, con gránulos de eucromatina adosada a la membrana interna nuclear. Se observaron organismos en diferentes etapas de actividad metabólica; las células en interfase son

alargadas, mientras que las que se van a dividir son más pequeñas; el núcleo está alargado o hay dos porciones bien definidas (Fig. 2, 3).

Se observaron cambios morfológicos en las células tratadas, de la forma alargada a la

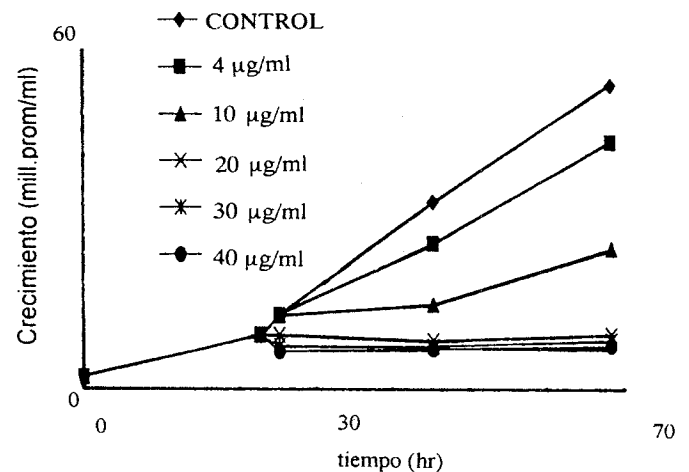
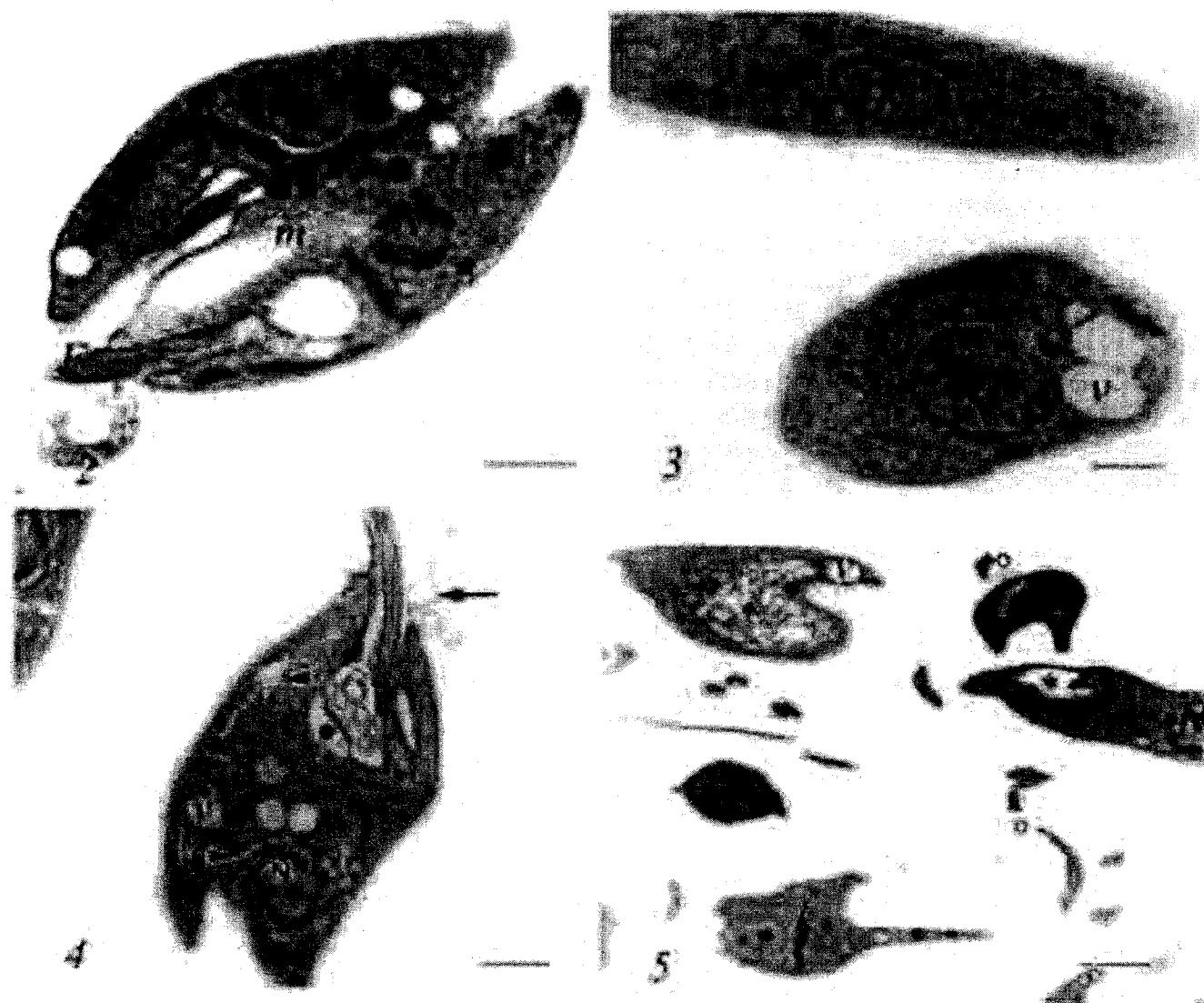


Fig. 1. Efecto dependiente de la dosis de la sustancia alcaloidea de *A. viridis* sobre la proliferación de promastigotes de *L. mexicana*.

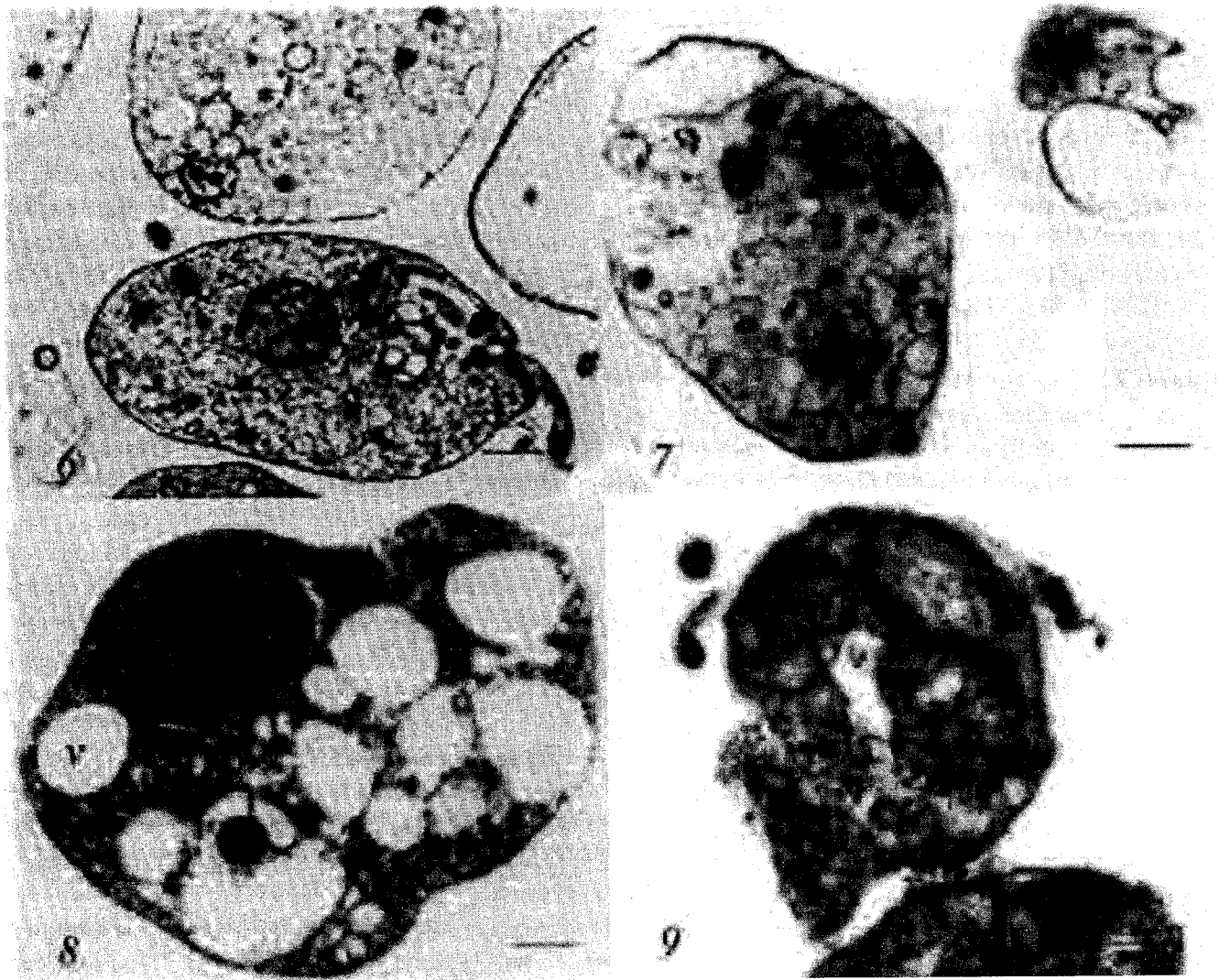
Fig. 1. Dose dependent effect of *A. viridis* alkaloidal compound on the proliferation of *L. mexicana* promastigotes.

ovalo-redonda, hasta la lisis celular. Con 4 $\mu\text{g/ml}$ hubo células hinchadas, las cisternas del rer estaban dilatadas, ocupando el área donde se detectó la vacuolización del citoplasma; además, en la bolsa flagelar y en el flagelo la membrana celular estaba separada formando figuras mielínicas (Fig. 4). A partir de 10 $\mu\text{g/ml}$ fueron abundantes las células con un considerable aumento del volumen celular, en ellas se podía reconocer los organelos, mientras que otras presentaron un citoplasma electrónico transparente hasta llegar a la lisis celular (Fig. 5). Sin embargo, se observaron células alargadas con indicios de separación de membranas en la zona flagelar y vacuolización de una parte del citoplasma (Fig. 6). A la concentración de 20 $\mu\text{g/ml}$ las células que permanecieron viables tenían mayor cantidad de lisosomas secundarios que



Figs. 2-5. Promastigotes de *L. mexicana* con diferentes tratamientos de la sustancia alcaloidea extraída de *A. viridis*. 2. Organismo control en división. 3. Organismo control con el citoplasma electrónico denso y forma fusiforme característica. 4. Con el tratamiento de 4 µg/ml el retículo endoplasmático y la membrana nuclear () están dilatadas, además se observa la separación de la membrana en la bolsa flagelar (*) y en el flagelo (). 5. Con el tratamiento de 10 µg/ml (CI₅₀) las células presentan desorganización del citoplasma (*), zonas de menor densidad electrónica, y células con separación de la membrana plasmática (detalle dentro de círculo). Núcleo (N), kinetoplasto (K), vacuola lipídica (v), flagelo (F), microtúbulos subpelliculares (m). Escala: Fig. 2, 0.95 m. Fig. 3, 0.60 m. Fig. 4, 1.10 m. Fig. 5, 0.80 m.

Figs. 2-5. Transmission electron micrographs of *L. mexicana* promastigotes with different treatments of the alcaloidal compound isolated from *A. viridis*. 2. Control sample in division. 3. Promastigote control with characteristic electron dense cytoplasm and fusiform cell shape. 4. Treatment: 4 µg/ml, endoplasmic reticulum and nuclear membrane are dilated (), the cellular membrane is separated at the flagellar pocket (*), and at the flagellum (). 5. Treatment: 10 µg/ml (IC₅₀), cells with an increase in cytoplasm disorganization (*), reduced electron dense zones and separation of the plasmatic membrane (inside circle). Nucleus (N). Kinetoplast (k). Subpellicular microtubule (m). Flagellum (F). Vacuole (v). Scale bar: Fig. 2, 0.95 m. Fig. 3, 0.60 m. Fig. 4, 1.10 m. Fig. 5, 0.80 m.



Figs. 6-9. Alteraciones ultraestructurales de los promastigotes de *L. mexicana* con diferentes tratamientos de la sustancia alcaloidea extraída de *A. viridis*. 6 Tratamiento con 10 $\mu\text{g/ml}$, (CI_{50}). 7 Tratamiento con 20 $\mu\text{g/ml}$, (CMI). 8 Tratamiento con 30 $\mu\text{g/ml}$. 9 Tratamiento con 40 $\mu\text{g/ml}$, (DL_{50}), se observó aumento de la desorganización del citoplasma, vacuolización, y destrucción de los organelos. Escala: Fig. 6, 0.95 μm . Fig. 7, 0.95 μm . Fig. 8, 0.40 μm . Fig. 9, 0.95 μm .

Figs. 6-9. Ultrastructural alterations of *L. mexicana* promastigotes with different treatments with the alkaloidal compound isolated from *A. Viridis*. 6 Treatment: 10 $\mu\text{g/ml}$ (IC_{50}). 7 Treatment: 20 $\mu\text{g/ml}$ (MIC). 8 Treatment: 30 $\mu\text{g/ml}$. 9 Treatment: 40 $\mu\text{g/ml}$, (LD_{50}), an increase in cytoplasm disorganization, vacuolization and organelles destruction was observed. Scale bar: Fig. 6, 0.95 μm . Fig. 7, 0.95 μm . Fig. 8, 0.40 μm . Fig. 9, 0.95 μm .

en los tratamientos anteriores (Fig. 7), a 30 $\mu\text{g/ml}$ el citoplasma estaba muy vacuolado (Fig. 8) y finalmente, a la concentración más alta de 40 $\mu\text{g/ml}$ el contenido citoplasmático estaba completamente desorganizado (Fig. 9).

DISCUSIÓN

Los análisis químicos de la fracción metanólica revelan la presencia de un compuesto predominante (basado en CG/EM). Esta sustancia de *A. viridis* es de naturaleza alcaloidea, evidenciado por la reacción positiva al reactivo de Dragendorff y negativa a la ninhidrina. En relación con su estructura, el estudio de RMN ^1H muestra señales a campo de: δ 7.58 dd que pueden corresponder a protones β heteroaromáticos, : 6.11 dd asignable a protones olefínicos. Las señales 5.43 y 5.24 q se pueden asignar a protones olefínicos o protones sobre un carbono terciario unido a oxígeno y a 2.33 t correspondiente a un grupo metilo unido a un átomo de nitrógeno. La purificación total del compuesto, actualmente en progreso, permitirá la dilucidación definitiva de la estructura.

Charan *et al.* (1997) aislaron de la esponja marina tropical *Haliclona* sp. una serie de alcaloides denominados haliclonaciclaminas, con propiedades citotóxicas y sugirieron que posiblemente constituyen un mecanismo de defensa natural. Probablemente, esta propiedad es compartida por la sustancia alcaloidea presente en *A. viridis* en condiciones naturales, lo cual está por demostrarse.

Se han aislado productos naturales de esponjas marinas con propiedades leishmanicidas, uno de ellos es la llimaquinona que actúa de forma diferente al alcaloide de *A. viridis*, afectando la actividad de la fosfatasa ácida de superficie y el proceso de excreción del parásito (Rangel *et al.* 1997). También se han caracterizado dos peróxidos cíclicos de *Plakortis angulospergulatus*, cuyo fuerte efecto antiproliferativo está acompañado por una dramática disminución de la movilidad celular a los 30 minutos y lisis a las 24 horas (Compagnone *et al.* 1998). Según estudios en

progreso, de los autores, estos peróxidos tienen como blanco de acción a la membrana plasmática, lo que guarda analogías con lo reportado en este trabajo, a pesar de ser estructuras químicas distintas.

Los efectos inhibitorios del alcaloide sobre la proliferación de los promastigotes de *L. mexicana* están asociados con profundos cambios ultraestructurales, que se manifiestan con incremento del volumen celular, separación de la membrana del flagelo y vacuolización progresiva, aún a la concentración más baja (4 $\mu\text{g/ml}$). Estas alteraciones se hacen más notables en la medida en que se aumenta la concentración del compuesto, disminuyendo considerablemente el tiempo requerido para producir la lisis celular (40 $\mu\text{g/ml}$).

El efecto degenerativo observado sobre la morfología del flagelo, también reportado por Dagger *et al.* (1996) utilizando el Diazepam (7-cloro-1,3-dihidro-metil-5-fenil-2h-1,4-benzodiazepina-2-ona), señaló un bloqueo de la separación del flagelo, el cual es el primer paso visible del proceso de división celular.

Por otra parte, la vacuolización progresiva del citoplasma, la aparición de lisosomas secundarios y de gránulos electrónicos densos inducidos a concentraciones mayores que 10 $\mu\text{g/ml}$ del alcaloide, coinciden con los cambios descritos en cultivos de *Trypanosoma cruzi* en fase estacionaria (Winkler *et al.* 1986).

La concentración relativamente baja requerida para producir un potente efecto leishmanicida en sólo 20 minutos, sugiere que el mecanismo de acción del alcaloide tiene como blanco primario a la membrana plasmática. Como consecuencia de la interacción se desencadena una pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana, lo cual explicaría las alteraciones ultraestructurales drásticas discutidas en el presente trabajo.

Estos hallazgos son alentadores y constituyen la base para continuar los estudios en modelos *in vivo* experimentales luego de la purificación del compuesto, que permitan la posible utilización de este producto natural como un agente terapéutico de la leishmaniasis.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente por la subvención de los proyectos CI-5-1901-0848/99 y CI 5-023-0459/91-92. A Sheila Márquez Pauls (Instituto de Zoología Tropical, UCV) por la identificación de la esponja. A Alexis Mendoza León (Instituto de Biología Experimental, UCV) por donar la cepa de *Leishmania*. A Julio Urbina (Laboratorio de Química Biológica, IVIC) y Fracehuli Dagger (IBE, UCV) por la revisión crítica del manuscrito. A Roxy Luna, Gilma Hernández y Antonio Gómez (IIBCA-UDO) por su ayuda en el tratamiento de las muestras. A Neil Mago e Iván López (FUNDEMAR) por la digitalización de imágenes.

RESUMEN

Se describe el efecto antiproliferativo dependiente de la dosis de una sustancia alcaloidea de *Amphimedon viridis* sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. La velocidad del crecimiento fue reducida en un 50% con una dosis de 10 µg/ml en 48 horas, mientras que con 30 y 40 µg/ml se induce una acción leishmanicida a los 110 y 20 minutos, respectivamente. La lisis es precedida por un incremento inmediato del volumen celular asociado con el deterioro progresivo del contenido celular y la destrucción de los organelos. Estos hallazgos sugieren que un factor importante asociado con el efecto antiproliferativo de esta sustancia alcaloide contra los promastigotes de *L. mexicana*, es la pérdida de la permeabilidad selectiva de la membrana plasmática.

REFERENCIAS

- Angerhofer, C., E. Cline, M. Garson, N. Hooper & J. Simpson. 1997. Terpene metabolites from the tropical marine sponge *Axinyssa* sp. nov. Australian J. Chem. 50: 1123-1127.
- Anonymous 1995. UNDP/WB/WHO. Special Program for Research and Training in Tropical Disease (TDR). Twelfth programme report. Chapter 10: 135-146.
- Anonymous 1998. UNDP/WB/WHO. Special Program for Research and Training in Tropical Disease (TDR). Life in the 21st century. A vision for all. Report of the Director-General. p 44-51.
- Berlinck, R., R. Francisco, A. Almeida, C. Camargos, R. Dias, Y. Torres, M. Sanchez, J. Freitas, E. Malpezzi, L. Costa, E. Hajdu & R. Rocha. 1997. Marine sponge and tunicates: valuable sources of cytotoxic compounds. J. Venomous Animals and Toxins 3(1): 26.
- Bermúdez, R., Z. Campos, F. Castillo, H. Román & F. Dagger. 1997. Caracterización de los efectos del anafranil sobre promastigotes de *Leishmania mexicana*. Acta Cient. Venezolana 48 (Suppl. 1): 178.
- Byriel, K., E. Dumdei, M. Garson, C. Kennard & J. Simpson. 1997. New chlorinated metabolites from the tropical marine sponge *Dysidea herbacea*. Australian J. Chem. 50: 139-144.
- Canto-Cavalheiro, M., A. Carvalho do Amaral, L. Gomes-Cardoso, A. Echeverría, A. Ivo, A. Jansen & L. Leon. 1996. A comparative study on the effect of mesoionic compounds against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz 91 (Suppl.): 276.
- Charan, R., R. Clark, K. Field, A. Flowers, M. Garson, E. McCaffrey & R. Webb. 1997. The ecological role of cytotoxic alkaloids: *Haliclona* n. sp., an unusual sponge/dinoflagellate association. Australian J. Chem. 50: 1128-1131.
- Compagnone, R. S., L. Piña, H. Rangel, F. Dagger, A. Suárez, M. Ramy & D. Faulkner. 1998. Antileishmanial cyclic peroxides from the Palauan sponge *Plakortis* aff. *angulospergulatus*. Tetrahedron 54: 3057-3068.
- Dagger, F., Z. Campos, H. Rangel & H. Román. 1996. Antiproliferative effect of Diazepam on *Leishmania mexicana*. Mem. Inst. Osw. Cruz 91 (Suppl.): 278.
- Dumdei, E., A. Flowers, M. Garson & M. Moore. 1997. The biosynthesis of sesquiterpene isocyanides and isothiocyanides in the marine sponge *Acanthella cavernosa* (Dendy): evidence for dietary transfer to the dorid nudibranch *Phyllidiella pustulosa*. Comp. Biochem. Physiol. 118 A: 1385-1392.
- Garson, M., P. Raniga & J. Simpson. 1997. Biosynthesis of dichloroimines in the tropical marine sponge *Stylotella aurantum*. Tetrahedron Letters 38: 7947-7950.
- Henríquez, W., O. Crescente & I. López. 1997. Evaluación de la actividad antibacteriana, fototóxica y tóxica del extracto metanólico de la esponja marina *Amphimedon viridis*. Acta Cient. Venezolana 48 (Suppl. 1): 341.
- Machado-Coelho, G., W. Caiaffa, H. Oliveira, C. Costa,

- V. Toledo, P. Magalhaes, M. Hermeto, O. Genaro, P. Williams & W. Mayrink. 1996. Immunotherapy for american cutaneous leishmaniasis (ACL): evaluation of length of treatment. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz 91 (Suppl.): 289.
- Marcano, D. & M. Hasegawa. 1991. Productos naturales. Visión general. En "Fitoquímica orgánica". Capítulo 1. CDCH - UCV, Venezuela. p. 1- 42.
- Ramos, D., N. Nascimento & P. Cotrim. 1996. Studies on growth inhibition of *Leishmania major* by different irradiates snake venoms. Mem. Inst. Oswaldo. Cruz. 91 (Suppl.): 281.
- Rangel, H., F. Dagger & R. Compagnone. 1997. Antiproliferative effect of Illimaquinone on *Leishmania mexicana*. Cell. Biol. Int. 21: 337-339.
- Reynolds, E. 1963. The use of lead citrate as an electron opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17: 208-212.
- Stephan, C. 1977. Methods for calculating LC 50. In Mayer, F.L. & J Hamelink (eds.). "ASTM", Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation. Pensilvania, USA. p 65- 84.
- Verenzuela, Y., M. Gómez, I. Piña, A. Romero, R. Compagnone, H. Rangel & H. Ramos. 1997. Efecto diferencial de los análogos estructurales Didi-2 y Didi-8 sobre la proliferación *in vitro* de promastigotes de *Leishmania mexicana*. Acta Cient. Venezolana 48 (Suppl. 1): 174.
- Villaroel, L., J. Vivas & J. Urbina 1996. Acción de dos análogos de esteroides sobre la proliferación y perfil de esteroides endógenos de *Leishmania*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 91(Suppl.): 279.
- Winkler, M., J. Vivas, M. Ogura & H. Finol. 1986. Presencia de estructuras con aspecto de gránulos de lipofucsina en *Trypanosoma cruzi*. 2^{das} Jornadas Venezolanas de Microscopía Electrónica. p. 90-91.