

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTOS DE
BIOLOGIA ANIMAL I Y PARASITOLOGIA



VARIABILIDAD INTRAESPECIFICA EN
Trypanosoma cruzi
Y ENSAYO DE NUEVOS METODOS
PARA EL CRIBADO FARMACOLOGICO

TESIS DOCTORAL



Archivo

RAFAEL A. MARTINEZ DIAZ

Madrid, 1996

21.355

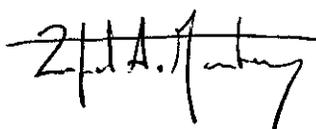
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
DEPARTAMENTOS DE
BIOLOGIA ANIMAL I Y PARASITOLOGIA



TESIS DOCTORAL

VARIABILIDAD INTRAESPECIFICA EN
Trypanosoma cruzi
Y ENSAYO DE NUEVOS METODOS
PARA EL CRIBADO FARMACOLOGICO

Memoria presentada por D. Rafael A. Martínez Díaz con el fin de optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas por la Universidad Complutense de Madrid.



Directores: Dra. D^a Alicia Gómez Barrio y Dr. D. José A. Escario García-Trevijano

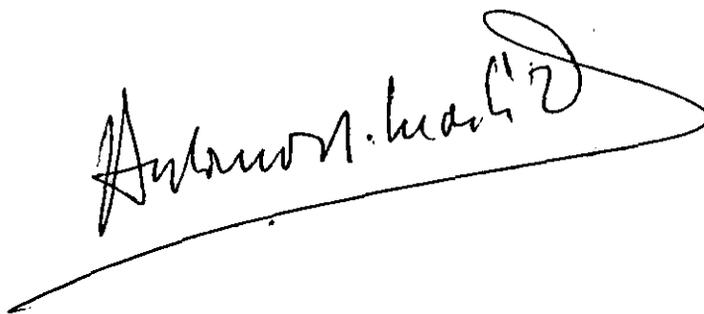


Madrid, 1996

ANTONIO R. MARTINEZ FERNANDEZ, CATEDRATICO Y DIRECTOR DEL
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA DE LA FACULTAD DE FARMACIA
DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID:

CERTIFICA:

Que el Licenciado en Ciencias Biológicas, D. Rafael A. Martínez Díaz, ha realizado en este Departamento y bajo la dirección conjunta de la Dra. D^a Alicia Gómez Barrio y el Dr. D. José A. Escario García-Trevijano la presente memoria titulada: "Variabilidad Intraespecifica en *Trypanosoma cruzi* y Ensayo de Nuevos Métodos para el Cribado Farmacológico", con el fin de optar al grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

A handwritten signature in black ink, reading "Antonio R. Martínez Fernández". The signature is written in a cursive style and is underlined with a long, sweeping horizontal stroke.

Madrid, Julio de 1996

Mi reconocimiento a todos los que con su enseñanza, consejo, ayuda, amistad y estímulo han posibilitado la realización de esta Tesis.

- INDICE -

	<u>Página</u>
I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS	2
II. REVISION BIBLIOGRAFICA	7
1. ENCUADRE TAXONOMICO	7
2. MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA	9
3. CICLO BIOLOGICO	12
4. VARIABILIDAD INTRAESPECIFICA	15
4.1. Caracterización de aislamientos. Zimodemas y Esquizodemas	15
4.2. Susceptibilidad de las distintas cepas a los fármacos	18
5. QUIMIOTERAPIA	19
5.1. Tratamiento de la enfermedad	19
5.2. Quimioprofilaxis	21
5.3. Otros productos activos y nuevas dianas	21
5.4. Resistencia de las cepas	24
6. <i>Trypanosoma cruzi</i> EN CULTIVO	25
6.1. Formas presentes en el insecto vector	25
6.1.1. Cultivo axénico de epimastigotes "in vitro"	25
6.1.2. Obtención de tripomastigotes metacíclicos	26
6.2. Formas presentes en el hospedador vertebrado. Cultivos celulares.	28
7. CRIBADO FARMACOLOGICO SOBRE <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
7.1. Modelos experimentales	34
7.1.1. Modelos "in vitro" extracelulares	34
- Epimastigotes	34
- Amastigotes libres	36
- Tripomastigotes	36
7.1.2. Modelos "in vitro" intracelulares. Amastigotes en cultivo celular	36
7.1.3. Modelos "in vivo"	38
7.1.4. Quimioprofilaxis en sangre	40
7.2. Elección de la cepa	42

III. MATERIAL Y METODOS	49
1. MATERIAL BIOLÓGICO	49
1.1. <i>Trypanosoma cruzi</i>	49
1.1.1. Cepa Bolivia	49
1.1.2. Cepa RAL	49
1.1.3. Cepa GM	50
1.1.4. Cepa MC	50
1.1.5. Cepa Y	50
1.1.6. Cepa Tulahuen	51
1.2. <i>Leishmania infantum</i> : Cepa PB75	51
1.3. Vector: <i>Rhodnius prolixus</i>	52
1.4. Células de vertebrado	52
1.4.1. Fibroblastos: Línea Vero	52
1.4.2. Macrófagos: Línea J774	53
1.5. Hospedador experimental. Ratón albino NMRI	54
2. MEDIOS DE CULTIVO	54
2.1. Medio LIT (Liver Infusion Tryptose)	54
2.2. Medio Grace (Grace's insect medium)	55
2.3. Medio EMEM (Minimum Essential Medium Earle's salts)	55
2.4. Medio RPMI	56
3. SOLUCIONES, COLORANTES Y REACTIVOS	57
4. PRODUCTOS DE SÍNTESIS Y FARMACOS DE REFERENCIA	
UTILIZADOS	61
4.1. Productos de síntesis	61
4.1.1. Serie T	61
4.1.2. Serie JDA	62
4.1.3. Serie SM	62
4.2. Productos de referencia: Nifurtimox, benzonidazol y violeta de genciana.	62
5. REPRODUCCION "IN VITRO" DEL CICLO BIOLÓGICO DE <i>T. cruzi</i> ...	67
5.1. Epimastigotes en cultivo axénico	67
5.2. Transformación a tripomastigotes metacíclicos	67
5.3. Infección de cultivos celulares. Formas amastigotes	68
6. TÉCNICAS DE CRIBADO	68
6.1. Modelos en uso	68
6.1.1. Recuento microscópico de epimastigotes en medio LIT	68

- Obtención de epimastigotes	68
- Adición de productos a ensayar	69
- Incubación y análisis de actividad	69
- Expresión de resultados	69
6.1.2. Recuento microscópico de células infectadas con amastigotes	70
- Preparación de los cultivos celulares infectados	70
- Adición de fármacos y análisis de actividad	71
6.1.3. Ensayo colorimétrico de citotoxicidad (macroensayo)	72
6.2. Modelos propuestos	73
6.2.1. Recuento colorimétrico de epimastigotes	73
- Obtención de epimastigotes	73
- Adición de productos a ensayar	74
- Incubación y análisis de actividad	74
- Expresión de resultados	75
6.2.2. Valoración inmunoenzimática (ELISA) de células infectadas con amastigotes	75
- Obtención de sueros	75
- Protocolo de IFI con epimastigotes para titulación de sueros	76
- Preparación de cultivos celulares infectados	77
- Adición de fármacos	78
- Revelado, análisis de actividad y expresión de resultados	78
6.2.3. Ensayo colorimétrico de citotoxicidad (microensayo)	79
7. OTRAS TECNICAS	81
7.1. Extracción y valoración de proteínas	81
7.2. Electroforesis SDS-PAGE de proteínas totales	82
7.3. Extracción y valoración de ADN	82
7.4. Amplificación AP PCR	83
7.5. Electroforesis de ADN amplificado	84
8. TRATAMIENTO ESTADISTICO	85
IV. EXPERIENCIAS REALIZADAS Y RESULTADOS	86
1. ESTUDIOS DE VARIABILIDAD ENTRE CEPAS	86
1.1. PRUEBAS BIOLOGICAS	86
1.1.1. Curvas de crecimiento de epimastigotes en LIT	86

1.1.2. Metacicloogénesis	91
1.1.2.1. Capacidad de transformación	91
1.1.2.2. Estudio de la distribución de tipos morfológicos en medio Grace.	97
1.1.3. Infección de cultivos celulares	101
1.1.3.1. Capacidad de invasión y dinámica de la infección en cultivo celular.	101
1.1.3.2. Infección diferencial en distintos tipos celulares (fibroblastos y macrófagos)	112
1.1.4. Sensibilidad a los fármacos de referencia de las distintas cepas	113
1.1.4.1. Sensibilidad a Nifurtimox	113
1.1.4.2. Sensibilidad a Benzonidazol	116
1.1.4.3. Sensibilidad a Violeta de genciana	119
1.2. PRUEBAS BIOQUIMICAS	122
1.2.1. Estudios de proteínas. Comparación de patrones protéicos	122
1.2.2. Estudios de ADN. Comparación de patrones de amplificación	122
1.3. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LAS PRUEBAS DE VARIABILIDAD	127
2. DESARROLLO Y COMPARACION DE TECNICAS DE CRIBADO	136
2.1. Desarrollo de los modelos experimentales	136
2.1.1. Técnica de cribado sobre epimastigotes	136
2.1.2. Técnica de cribado sobre amastigotes	138
2.1.3. Pruebas de citotoxicidad	139
2.2. Ensayos de actividad y comparación de resultados	141
2.2.1. Actividad sobre epimastigotes	141
2.2.1.1. Serie T	142
2.2.1.2. Serie JDA	143
2.2.1.3. Serie SM	144
2.2.1.4. Nifurtimox, benzonidazol y violeta de genciana	146
2.2.2. Actividad sobre amastigotes	147
2.2.2.1. Serie T	147
2.2.2.2. Serie JDA	148
2.2.2.3. Serie SM	149

2.2.2.4. Nifurtimox, benzonidazol y violeta de genciana	150
2.2.3. Ensayos de citotoxicidad	153
2.2.3.1. Serie T	153
2.2.3.2. Serie JDA	154
2.2.3.3. Serie SM	155
2.2.3.4. Nifurtimox, benzonidazol y violeta de genciana	156
V. DISCUSION	158
1. SOBRE LA VARIABILIDAD INTRAESPECIFICA	158
2. SOBRE LOS METODOS DE CRIBADO FARMACOLOGICO	165
VI. CONCLUSIONES	173
VII. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	176

**INTRODUCCION
Y OBJETIVOS**

I. INTRODUCCION Y OBJETIVOS.

INTRODUCCION.

Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi es un protozoo flagelado, perteneciente al grupo de los kinetoplástidos, que se caracteriza por presentar un marcado polimorfismo -propio del género dentro de la familia Trypanosomatidae- de modo que prácticamente presenta un tipo morfológico distinto en cada una de las fases de su ciclo biológico. Pero además de esta variación morfológica y funcional del propio microorganismo, presenta unas variaciones de comportamiento a nivel poblacional que afectan de una manera muy directa al efecto que, como parásito, puede ejercer sobre sus hospedadores, incluyéndose entre éstos el hombre.

Diferencias en el comportamiento de estas poblaciones del parásito -ya sean aislamientos, cepas o clones- son publicadas constantemente; unas veces referidas a la distinta patogenicidad, otras a distintas capacidades de infección, a diferentes comportamientos en el laboratorio o a distinta respuesta a fármacos y tratamientos. Esta variabilidad puede resultar determinante tanto en el desarrollo de trabajos experimentales como en la búsqueda de nuevos productos activos frente al parásito o incluso en el curso y el tratamiento directo de la enfermedad.

La tripanosomiasis americana -Enfermedad de Chagas- es una de las parasitosis más importantes en el hombre, tanto por su prevalencia como por la gravedad de su cuadro clínico. Se extiende por Centro y Sudamérica, concretamente entre las latitudes 41°N y 46°S, que corresponde al área de distribución de los vectores triatominos de hábitos antropofílicos; habiéndose citado casos aislados en el sur de los Estados Unidos y algunos adquiridos mediante transmisión transfusional en el norte de Estados Unidos y Canadá.

Se estima que existen entre 15 y 18 millones de personas infectadas en Sudamérica, así como 90 millones de individuos expuestos, con más de 50.000 defunciones anuales. Al margen de estas cifras, no hay que olvidar la repercusión social que acompaña a las enfermedades de carácter crónico. Las alteraciones cardíacas y/o digestivas que sufren de por vida los individuos

afectados interfieren considerablemente con su capacidad laboral; además, el coste médico derivado y el absentismo laboral consecuente suponen pérdidas de miles de millones de dólares en muchos países centro y sudamericanos, ya de por sí deficitarios.

A pesar de lo alarmante de la situación, las posibilidades de control son escasas. Como es general entre las enfermedades parasitarias, las perspectivas de disponer de una vacuna son muy remotas, estando actualmente la quimioterapia lejos de paliar las consecuencias de la carencia de una inmunoprolifaxis eficaz. En este sentido, los únicos fármacos disponibles para el tratamiento de la enfermedad de Chagas son los nitroheterociclos nifurtimox y benznidazol, ambos de eficacia cuestionable y toxicidad manifiesta. Además de producir índices muy variables de curación - no son eficaces contra todos los estados de la enfermedad ni contra todas las cepas patógenas-, requieren ser administrados durante periodos prolongados, con la consiguiente aparición de efectos colaterales adversos, que obligan en muchos casos a interrumpir el tratamiento.

De otra parte, la mayoría de los afectados pertenecen a áreas endémicas rurales, donde el tratamiento sintomático con digitales y diuréticos, la implantación de marcapasos en enfermos cardíacos y cirugía para pacientes con megaformaciones intestinales son procedimientos en la mayoría de los casos impracticables, en virtud de su elevado coste. Todo ello hace que siga siendo necesaria la búsqueda de nuevos fármacos activos frente al parásito.

Al margen de la transmisión por vía vectorial, el segundo mecanismo en importancia es la transfusión de sangre infectada. Por el momento, el único compuesto que resulta eficaz como quimioprolifáctico es el violeta de genciana, de conocido efecto tóxico, y con propiedades colorantes que motivan el rechazo por parte de los pacientes que van a ser transfundidos. En este hecho radica la importancia del desarrollo de moléculas que, aunque no curen la enfermedad, sí tengan efecto tripanocida *in vitro*.

El complejo ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* es un factor de gran trascendencia que debe influir en su susceptibilidad a la acción de los medicamentos. En el hospedador vertebrado se alterna la presencia de formas amastigote intracelulares y formas tripomastigote circulantes. Además, existe

gran similitud bioquímica y fisiológica entre los tripanosomas y las células del hospedador, con un número relativamente bajo de estructuras y procesos metabólicos exclusivos del parásito. Estos últimos deben ser precisamente las dianas para el desarrollo de sustancias de toxicidad selectiva y de nuevos procedimientos quimioterapéuticos; en este campo, los aspectos más estudiados actualmente son el ADN del kinetoplasto, los glicosomas, el metabolismo del oxígeno, de las bases púricas y pirimidínicas y del ácido fólico, así como la formación de microtúbulos y las estructuras de membrana.

Desde el punto de vista puramente técnico o de desarrollo práctico, existen dificultades añadidas para el diseño de pruebas idóneas de cribado farmacológico. Circunstancias como el polimorfismo del parásito y la diversa susceptibilidad de las cepas, la finalidad terapéutica o quimioproliférica de los ensayos, adecuaciones prácticas, económicas, higiénicas, de seguridad en la manipulación y las siempre presentes consideraciones éticas, hacen que el cribado farmacológico sobre *T. cruzi* precise de una constante revisión que permita atender al control de todas estas variables.

Por todo lo anterior y a pesar de ser una de las líneas prioritarias de investigación tanto en países endémicos como fuera de sus fronteras, la enfermedad de Chagas se destaca aún hoy día por mantener grandes cuestiones sin resolver y sobre todo por una falta alarmante de soluciones prácticas. Existe una enfermedad crónica difícilmente interpretable, existen zonas con fauna vectora y parásito pero sin casos de enfermedad, se han realizado multitud de aislamientos detectándose cepas con comportamientos dispares, unas muy infectivas y otras menos, unas muy patógenas y otras apenas, unas más sensibles que otras a ciertos productos y tratamientos. Pero sobre todo, no existe una terapia eficaz, y los escasos logros en el terreno de la profilaxis hacen que la enfermedad de Chagas se encuentre aún lejos no solo de ser erradicada, sino de poder ser eficazmente controlada.

OBJETIVOS.

El equipo de investigación en el que se ha desarrollado el presente trabajo se encuentra dedicado fundamentalmente a estudios de tipo farmacológico. El cribado de nuevas moléculas de síntesis o de extractos

vegetales, así como el desarrollo y perfeccionamiento de modelos nuevos o ya en uso para efectuar estos cribados han sido siempre la base de nuestro trabajo. Siguiendo esta línea ya establecida, la intención de esta Tesis es contribuir a la actualización de este campo, teniendo en cuenta factores de tanto interés hoy día, como es el tema de la variabilidad intraespecífica del parásito. Habiendo cepas de comportamiento tan dispar como se ha citado, no es factible centrarse únicamente en el método despreocupándonos del aislamiento con el que trabajamos, pues no obtendremos los mismos resultados aplicando la misma técnica sobre cualquier cepa elegida al azar.

Trabajar en esas condiciones sería cuando menos arriesgado y lo que pretendemos como finalidad última de este trabajo es optimizar los procedimientos para la búsqueda (desde el punto de vista técnico pero teniendo en cuenta las variables biológicas) de productos que permitan combatir la enfermedad; a la vez intentamos un acercamiento y una pequeña aportación al tema de la variabilidad intraespecífica de *T. cruzi*, dando pie a la apertura de una nueva línea dedicada a la caracterización. Ello nos permitirá abordar la gran cuestión de si la diversidad bioquímica de *T. cruzi* se ajusta del todo o en parte a la variabilidad biológica y médica del parásito, y esta cuestión solo puede ser resuelta mediante el estudio de las características biológicas y médicas de una extensa y representativa muestra de poblaciones naturales. Estudio al que pretendemos contribuir con la aportación de este trabajo realizado con cepas de distinta procedencia biológica y geográfica.

En definitiva, los objetivos prioritarios de la investigación planteada se centran en:

1. Aplicación de pruebas biológicas y bioquímicas a la caracterización intraespecífica de *T. cruzi*.
2. Desarrollo y optimización de modelos de cribado farmacológico sobre *T. cruzi*, con dos vertientes en su aplicabilidad:
 - A. Selección de nuevos compuestos activos que ofrezcan una alternativa a los fármacos y quimioprolácticos existentes.
 - B. Determinación de la susceptibilidad al tratamiento de cepas de diversa naturaleza como parámetro de estudio de la variabilidad intraespecífica.

**REVISION
BIBLIOGRAFICA**

II. REVISION BIBLIOGRAFICA.

1. ENCUADRE TAXONOMICO.

Según la revisión taxonómica de los protozoos realizada por Levine y colaboradores en 1980, *T. cruzi* queda encuadrado del siguiente modo:

Subreino Protozoa (Goldfus, 1818) von Siebold, 1845

Tipo Sarcomastigophora Honigberg y Balamuth, 1963

Protozoos con núcleo de un solo tipo; reproducción sexual, cuando existe, esencialmente singámica; poseen flagelos, pseudópodos o ambos tipos de órganos locomotores.

Subtipo Mastigophora Diesing, 1866

Trofozoitos que poseen típicamente uno o más flagelos, reproducción asexual básicamente por fisión binaria longitudinal; en algunos grupos, reproducción sexual.

Clase Zoomastigophorea Calkins, 1909

Sin cloroplasto; de uno a varios flagelos; formas ameboides con o sin flagelos en algunos grupos.

Orden Kinetoplastida (Honigberg, 1963) Vickerman, 1976

Con uno o dos flagelos que se originan en una depresión, típicamente con un bastón paraaxial, además del axonema; mitocondria única que ocupa toda la longitud del cuerpo, que suele contener un kinetoplasto Feulgen-positivo situado cerca de la base del flagelo; el aparato de Golgi se sitúa por lo general en la región de la depresión flagelar, sin conexión con el flagelo.

Suborden Trypanosomatina Kent, 1880

Flagelo único, libre o unido al cuerpo por una membrana ondulante; kinetoplasto pequeño y compacto.

Familia Trypanosomatidae (Doflein, 1901) Grobstein, 1905

Pueden existir en dos o más de cuatro formas o estados que se denominan amastigote, promastigote, epimastigote y tripomastigote. Incluye a los protozoos que viven en la sangre y los tejidos del hospedador humano.

Género *Trypanosoma* Gruby, 1843

Subgénero *Schizotrypanum* (Chagas, 1909) Nöller, 1931

Especie *T. (S.) cruzi* Chagas, 1909

En base a características relacionadas con la localización de las formas infectantes dentro del vector y por tanto a la forma de transmisión, el género *Trypanosoma* se puede separar en dos grupos o secciones sin valor taxonómico: sección Salivaria y sección Stercoraria. La sección Stercoraria contiene tres subgéneros, uno de los cuales es *Schizotrypanum*, creado originariamente por Chagas (1909) como género para *T. cruzi* pero posteriormente reducido a rango de subgénero por Nöller (1931) y que incluye la especie *cruzi* quedando su nombre científico por tanto como *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909.

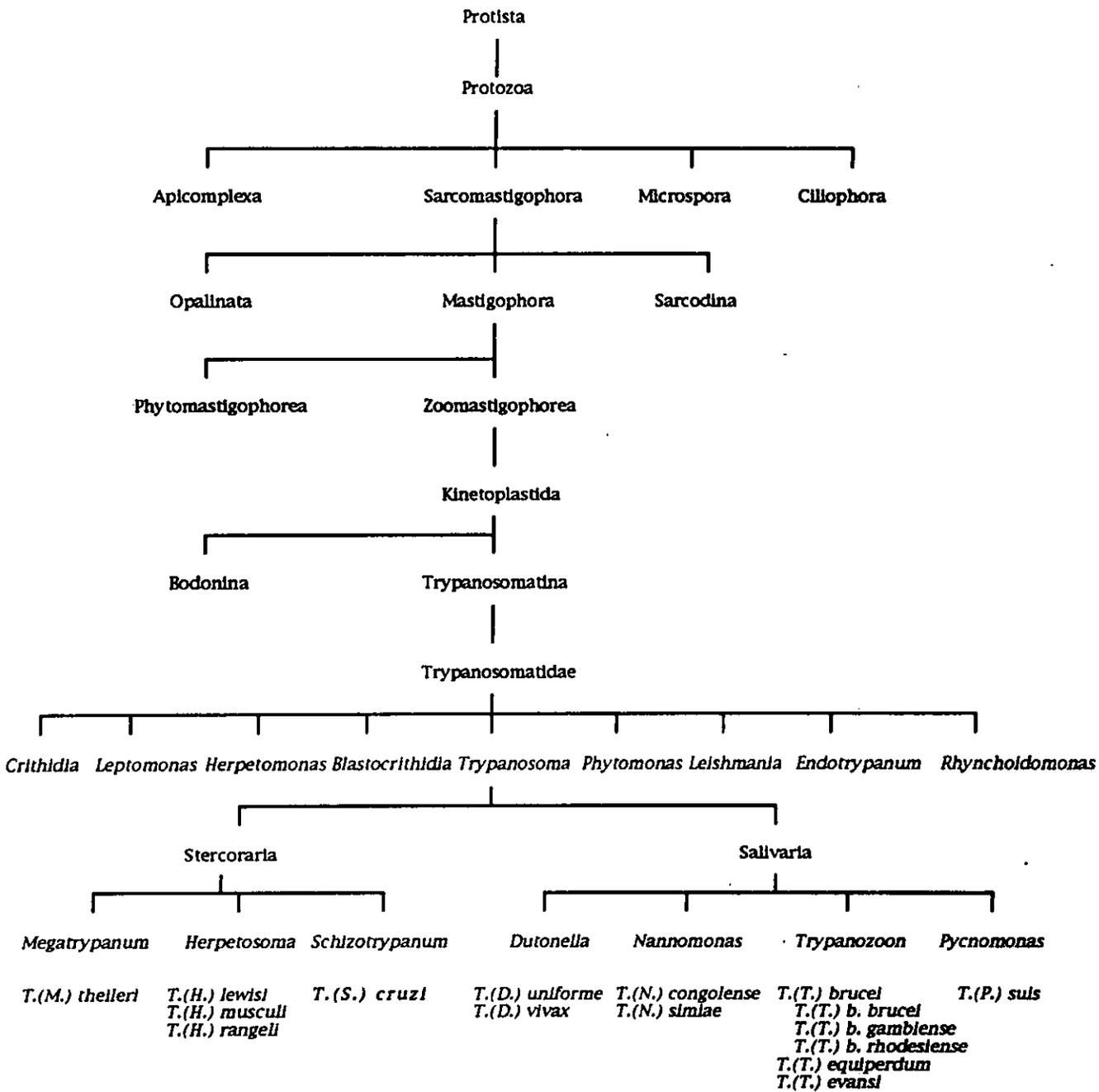


Fig 1. Localización taxonómica de *T. cruzi* entre las especies más representativas del género *Trypanosoma* (según Molyneaux y Ashford, 1983).

2. MORFOLOGIA Y ULTRAESTRUCTURA.

T. cruzi se caracteriza por un marcado polimorfismo presentándose en forma amastigote en las células del sistema reticuloendotelial y otros tejidos del hospedador vertebrado, siendo ésta la forma multiplicativa intracelular; sin embargo Andrews y col. (1987) afirman observar un 10% de amastigotes circulantes en sangre, lo que iría en contra de la idea generalizada de que son formas exclusivamente intracelulares. Las formas epimastigote aparecen en la fase logarítmica de crecimiento en cultivo axénico, en el intestino del vector y al principio o final del ciclo intracelular en el hospedador vertebrado; son las formas multiplicativas extracelulares. Finalmente, las formas tripomastigote aparecen en células de tejidos y en la sangre del vertebrado, en el intestino posterior y deyecciones del invertebrado y en la fase estacionaria de crecimiento en cultivos axénicos, así como en la fase líquida de cultivos celulares; estas formas no se dividen. La estructura y morfología de las distintas formas de esta especie responden al patrón general de la familia Trypanosomatidae (figuras II, III y IV).

La membrana plasmática de *T. cruzi* está formada, como en cualquier célula, por proteínas y lípidos, a los que se añade un glucocáliz compuesto por carbohidratos. La carga negativa superficial va ligada a la presencia de restos de ácido siálico. Según Alcina y Fresno (1987), la estructura de la membrana plasmática es lo que determina el tipo de interacción con el hospedador y su sistema inmunitario.

Bajo la membrana plasmática existe una capa de microtúbulos subpeliculares, cuyo número varía según el estadio del ciclo y que están conectados entre sí y a la membrana plasmática por filamentos cortos de naturaleza desconocida. La capa de microtúbulos aparece interrumpida únicamente a nivel de la bolsa flagelar, una región celular donde ocurren procesos de exo y endocitosis.

El flagelo de *T. cruzi* presenta un axonema con la estructura microtubular básica 9+2. Su longitud varía desde 1 μm que mide en amastigotes hasta alcanzar los 20 μm al final del ciclo intracelular, probablemente por adición de tubulina en el extremo terminal. Lateralmente al eje mayor del axonema, existe una estructura de microfilamentos que constituyen el denominado eje paraaxial

Fig. II. Aspecto de cultivo axénico de **epimastigotes** en medio LIT. x2500. Giemsa.

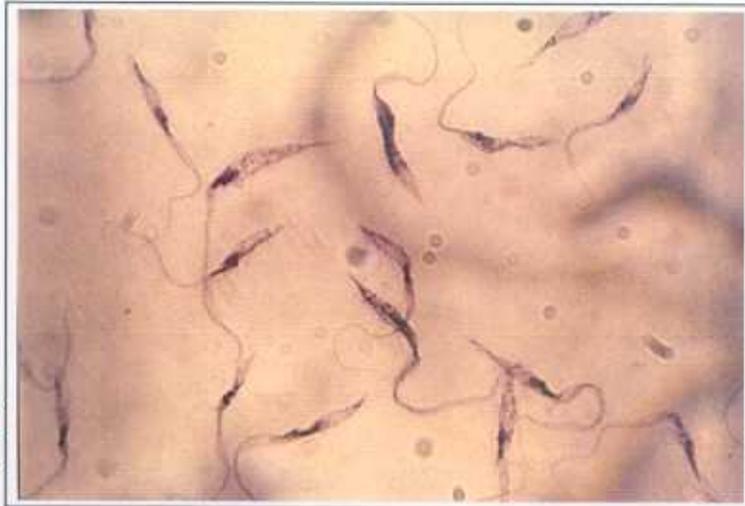
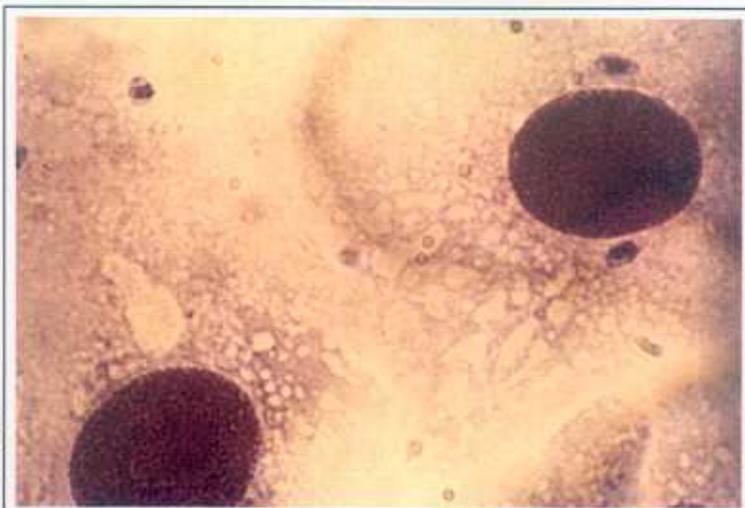


Fig. III. Aspecto de cultivo axénico en medio Grace, con predominio de formas **tripomastigote**. x2500. Giemsa.



Fig. IV. Cultivo celular. Formas **amastigote** infectando células Vero. x2500. Giemsa.



o eje paraflagelar, de función desconocida. En epimastigotes y tripomastigotes, en los que el flagelo emerge lateralmente al cuerpo celular, existen uniones tipo desmosoma, y la onda flagelar induce un movimiento aparente a la célula, dando la impresión de una membrana ondulante. El movimiento flagelar está generado por la acción ATPasa de los brazos de dineína microtubulares, en un proceso dependiente de ATP. En la base flagelar se aprecian dos corpúsculos basales compuestos por nueve tripletes de microtúbulos; el corpúsculo basal está separado de la porción extracelular del flagelo por la lámina axosomal.

En epimastigotes y tripomastigotes se han encontrado orgánulos a los que se ha denominado glicosomas por contener enzimas glicolíticas, que pueden representar los peroxisomas de muchas células eucariotas. Estos orgánulos están implicados en la oxidación de aminoácidos y en el metabolismo del agua oxigenada y al parecer también lo estarían en la *beta* oxidación de los ácidos grasos y la biosíntesis "de novo" de pirimidinas.

El retículo endoplásmico se encuentra principalmente en las proximidades del núcleo y bolsa flagelar, y está en comunicación directa con el aparato de Golgi. Ambos orgánulos parecen llevar a cabo la síntesis de glicoproteínas que se localizan en la membrana plasmática del parásito. Los ribosomas, distribuidos por todo el citoplasma, están compuestos por un 45% de proteínas y un 55% de RNA.

El núcleo es pequeño, de 2,5 μm , con un nucleolo central o ligeramente excéntrico y su membrana se continúa con el retículo endoplásmico. Está demostrada la presencia de nucleosomas, que son subunidades básicas de cromatina compuestas por ADN-histonas, similares a las de otras células eucarióticas. *T. cruzi* es un organismo diploide, y aunque es posible (Brenner en 1972 observó puentes citoplasmáticos entre estos flagelados), no se ha comprobado aún que exista un proceso de intercambio genético.

T. cruzi presenta una sola mitocondria. En ésta, y cerca del corpúsculo basal o cinetosoma, existe un complejo de fibras de ADN que constituye el kinetoplasto. Este complejo está constituido por minicírculos y maxicírculos que forman una red gigante de ADN y que en epimastigotes representan el 20-25% del contenido total de ADN. Hay 5×10^3 - 10^4 minicírculos y 20-50

maxicírculos por red. Los primeros tienen una longitud de 0,45 μm , lo que corresponde a 1440 pares de bases y un peso molecular de 0.94×10^6 . Los minicírculos varían muy rápidamente su secuencia debido a mutaciones puntuales; en cada uno de ellos existe una zona de secuencia constante que se repite cuatro veces por molécula y cuatro regiones divergentes intercaladas entre las primeras (estas son similares, no solo en todas las moléculas de un mismo parásito, sino en aquellas de distintos aislamientos). Si bien no se conoce con exactitud el papel de los minicírculos en la fisiología de los tripanosomas, parece que los maxicírculos contienen información genética y pueden sintetizar ARN.

Actualmente, el estudio de la secuencia de los minicírculos tiene interés por su relación con la heterogenicidad existente entre poblaciones naturales de *T. cruzi*, reflejada en su distinta capacidad de invasión celular, virulencia y morbilidad en modelos animales, susceptibilidad a sueros inmunes y a fármacos, histotropismo, morfología y composición antigénica. Así, además de los patrones isoenzimáticos o zimodemas, para la identificación de poblaciones de *T. cruzi* se ha recurrido recientemente al estudio de los distintos patrones por medio de endonucleasas de restricción de los minicírculos de ADNk. Así Morel y colaboradores (1980) propusieron el término esquizodema para definir subpoblaciones de *T. cruzi* que poseen similares perfiles de restricción (= secuencia) mediante electroforesis en geles de poliacrilamida de los minicírculos.

3. CICLO BIOLÓGICO.

T. cruzi cumple un ciclo biológico indirecto mantenido originariamente entre mamíferos silvestres pertenecientes a los ordenes Marsupialia, Chiroptera, Rodentia, Lagomorpha, Edentata, Carnívora y Primates (principalmente zarigüeyas, armadillos, murciélagos, primates, mofetas, ardillas, mapaches, etc.), e insectos hemípteros de la familia Reduviidae.

Cuando el hombre entra en contacto con sus focos naturales, alterando el equilibrio ecológico y posibilitando la invasión domiciliar de algunas especies de triatomíneos, que transportan al agente etiológico a ecotopos artificiales, la enfermedad se transforma en antropozoonosis (fig. V).

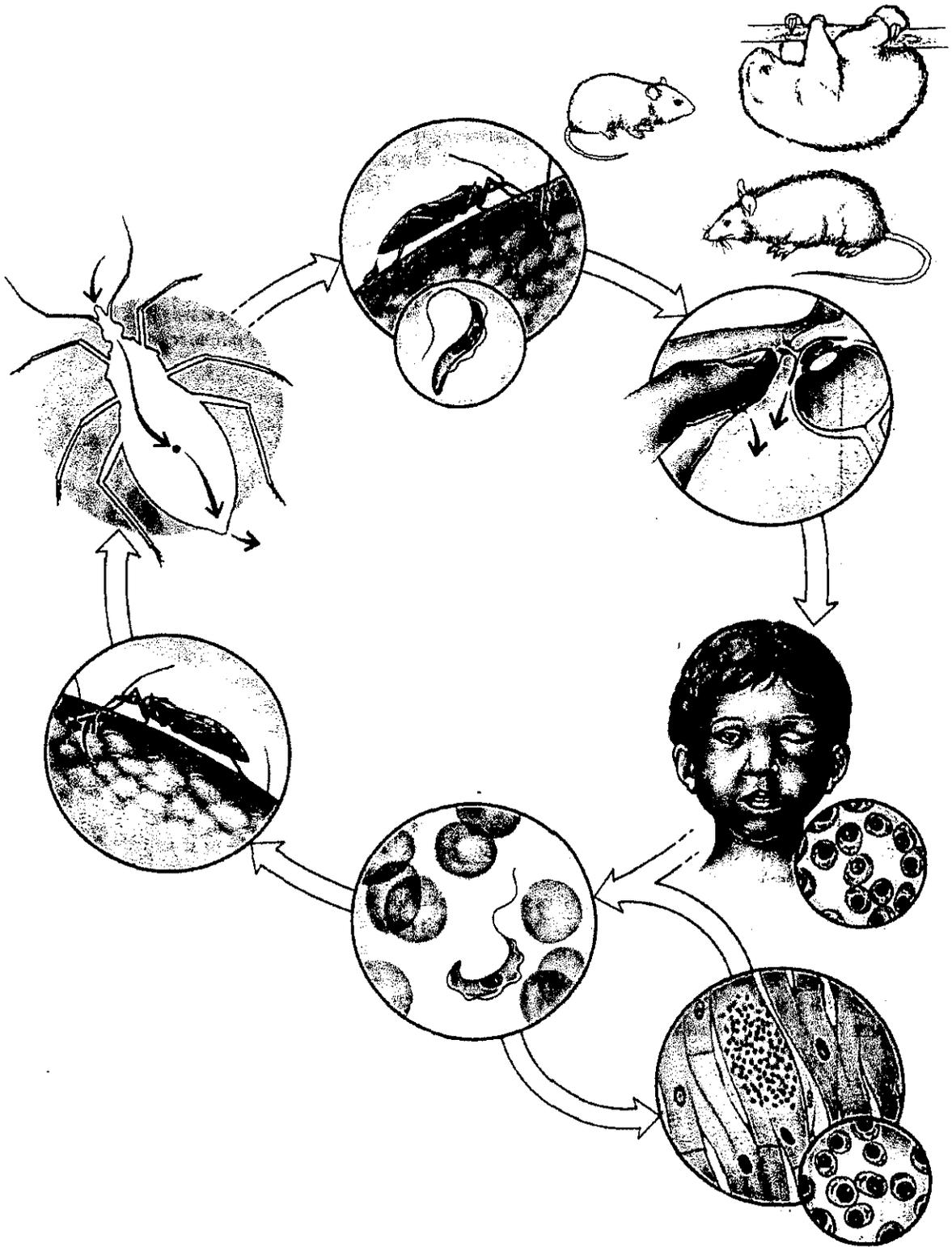


Fig V. Ciclo biológico de *T. cruzi* (según Despommier y Karapelou, 1987).

Si bien hay descritas toda una serie de vías menores de transmisión (transfusional, lactogénica, por ingestión, mecánica por otros insectos hematófagos, accidental en laboratorio, por el coito y por trasplante de órganos), en el 80% de los casos la tripanosomiasis se transmite cuando una chinche infectada, al alimentarse deposita sus deyecciones con formas metacíclicas en la piel del hospedador. Los parásitos invaden el organismo a través de la picadura o penetrando activamente las mucosas. Son fagocitados por macrófagos y atravesando la membrana de la vacuola fagocítica se disponen en la matriz citoplasmática. En este sentido, Osuna y colaboradores (1986) han comprobado que las formas infectantes evitan la fusión lisosomal, que produciría la destrucción del parásito, incrementando el pH citoplasmático de la célula fagocítica mediante la liberación de amonio y poliaminas.

Los tripomastigotes tardan unas 3 horas en reorganizarse como amastigotes, y entonces permanecen quiescentes por espacio de 35 horas antes de empezar a dividirse. Ocurren unas 9 divisiones asincrónicas para producir en torno a 500 amastigotes, un 25% de los cuales degenera y el resto se transforman en tripomastigotes, que abandonan la célula en unos minutos y escapan a la sangre como formas no multiplicativas.

El proceso está bajo control genético del parásito, de modo que la diferenciación amastigote-tripomastigote solo se iniciará después de un número preprogramado de divisiones intracelulares. El ciclo total de división intracelular, según hemos podido comprobar en nuestras experiencias, no suele exceder "in vitro" de 96 horas. Los tripomastigotes resultantes son polimórficos: existen formas delgadas dotadas de mayor capacidad para penetrar en las células del hospedador, que predominan en las etapas iniciales para ir progresivamente desapareciendo, y formas gruesas más infectantes para el vector.

Los tripomastigotes sanguíneos invaden células de tejidos, principalmente muscular, teniendo especial predilección por el músculo cardíaco (cepas miotrópicas) o son de nuevo fagocitadas por macrófagos (cepas reticulotrópicas o fagocitotrópicas). Cualquiera que sea el tipo celular, se repite en su interior el ciclo multiplicativo formándose pseudoquistes reproductores.

El desarrollo en el hospedador invertebrado comienza con la ingestión de tripomastigotes de la sangre del vertebrado, los cuales se transforman en epimastigotes multiplicativos. Durante la evolución inicial se han encontrado así mismo formas redondeadas (esferomastigotes y amastigotes) en el estómago; estas pueden transformarse en epimastigotes cortos, que empezarían a multiplicarse en el intestino, o en epimastigotes largos incapaces de multiplicarse pero que alcanzan activamente el recto a los 3-4 días de la ingestión de sangre infectada.

Por microscopía electrónica de barrido se ha comprobado que los metacíclicos derivan de los epimastigotes cortos unidos a la cutícula rectal, preferentemente a nivel de la glándula rectal. El trabajo de Homsy y colaboradores (1989) demuestra que el proceso de diferenciación se activa en presencia de prolina o glutamato y de un 5% de CO₂; sin embargo la adherencia de los epimastigotes a un sustrato según ellos no influye, en contra de otros autores, en la diferenciación. Por su parte Schaub y Böker (1986) afirman que es en condiciones de ayuno del vector cuando existe preferencia por parte de los tripanosomas por colonizar las papilas rectales.

Los metacíclicos se eliminan con las heces junto con epimastigotes no transformados, siendo la duración de este ciclo de 6-15 días dependiendo del estado del vector y de la temperatura.

Se han señalado numerosos factores como posibles inductores de la metaciclogénesis (transformación de epimastigote a tripomastigote metacíclico; apartado 6.1.2.), pero cualquiera que sea el mecanismo desencadenante, los metacíclicos eliminados en las deyecciones del triatomino determinan la infección en el hospedador vertebrado.

4. VARIABILIDAD INTRAESPECIFICA.

4.1. CARACTERIZACION DE AISLAMIENTOS. ZIMODEMAS Y ESQUIZODEMAS.

Es bien conocida la heterogenicidad existente entre las poblaciones naturales de *T. cruzi*, reflejada en su distinta capacidad de invasión celular,

virulencia y morbilidad en modelos animales, susceptibilidad a sueros inmunes y a fármacos, histotropismo, morfología y composición antigénica. La variabilidad enzimática ha dado lugar a una de las clasificaciones más utilizadas mediante el encuadre de los distintos patrones isoenzimáticos en diferentes zimodemas (poblaciones que difieren en dichos perfiles). Se habla de tres zimodemas principales y varios subordinados (Miles y col., 1978 y 1980). El zimodema Z_1 y en menor grado el Z_3 pueden asociarse a casos humanos, mamíferos y vectores de áreas de transmisión selvática, produciendo el primero patología aguda y crónica y el segundo sólo aguda. El zimodema Z_2 se ha encontrado en áreas de transmisión doméstica y se asocia a la forma aguda de la enfermedad.

En cuanto a la distribución geográfica de los zimodemas, ésta no parece seguir un patrón determinado; en el norte y noreste de Brasil pueden encontrarse los tres zimodemas y en el centro del país Z_1 y Z_2 . En Venezuela y Colombia se encuentran Z_1 y Z_3 . En Chile se han detectado Z_1 y Z_2 y en Perú, Ecuador, Honduras y el sur de los Estados Unidos aparece Z_1 . Según Tibayrenc y Desjeux (1984), Z_1 estaría relacionado con zonas de gran altura y Z_2 con zonas de llanos y valles.

Además de los patrones isoenzimáticos o zimodemas, para la identificación de *T. cruzi* se ha recurrido también al estudio de los distintos patrones por medio de endonucleasas de restricción de los minicírculos de ADNk. Así Morel y col. (1980) propusieron el término esquizodema para definir subpoblaciones de *T. cruzi* que poseen similares perfiles de restricción. Más recientemente han sido incorporadas a los estudios de variabilidad en *T. cruzi* nuevas técnicas como la hibridación con sondas de ADN, anticuerpos monoclonales y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990; Avila y col., 1991; Macedo y col., 1992; Steindel y col., 1993) como nuevos métodos para la caracterización de cepas y clones.

Pero la vieja cuestión acerca de cual es el motor de esta variabilidad sigue latente. Muchos autores han demostrado en el laboratorio que algunos protozoos parásitos pueden sufrir recombinación genética: *T. brucei* (Jenni y col., 1986 y 1990; Sternberg y col., 1988; Walliker, 1989; Tait y Turner, 1990), *Plasmodium falciparum* (Walliker y col., 1987), *Toxoplasma* (Pfefferkorn y col.,

1980), *Entamoeba histolytica* (Sargeant y col., 1988; Blanc y col., 1989) y *Leishmania* (Lanotte y Rioux, 1990). Otros autores mantienen que la recombinación genética también se produce en poblaciones naturales de *T. brucei*, *P. falciparum* y *Leishmania* pero no en poblaciones naturales de *T. cruzi*. La variación revelada en numerosos análisis isoenzimáticos y de ADNk a partir de muestras procedentes de variados orígenes geográficos y diversos hospedadores, junto a la existencia de patrones heterocigóticos fijos, que se mantienen generación tras generación, sugiere que *T. cruzi* es un organismo diploide, genéticamente muy polimorfo y que manifiesta una estructura clonal que implicaría una ausencia o muy restringida sexualidad (recombinación).

Según Tibayrenc y Ayala (1987) y de acuerdo con esta idea, las entidades denominadas zimodemas serían simplemente clones naturales del parásito que pueden ser identificados por medio de técnicas isoenzimáticas, y de la misma manera, los esquizodemas serían clones naturales identificados por análisis con endonucleasas de restricción de las variaciones en el ADNk.

Los mismos autores, al tratar de relacionar 43 zimodemas de *T. cruzi* con el fin de establecer relaciones filogenéticas, observan que resulta imposible realizar agrupamientos coherentes. Parece ser que la evolución clonal de *T. cruzi* es antigua y que los numerosos clones se han desarrollado independientemente durante mucho tiempo. Así, la gran heterogeneidad bioquímica del parásito sería consecuencia directa de una larga evolución por separado de los clones naturales.

La relevancia de la cuestión acerca de la posible estructura clonal de *T. cruzi* y la existencia o no de recombinación es grande, ya que tendría importantes implicaciones médicas. Incluso si algún fenómeno de recombinación ocurriese durante la evolución, los clones naturales retendrían sus características sobre grandes áreas geográficas y largos periodos de tiempo. Steindel y col. (1993) encuentran similitudes en patrones de amplificación por AP PCR entre aislamientos de la misma procedencia geográfica y diferencias entre aislamientos de distinta localización.

Si los clones se han desarrollado a lo largo del tiempo como entidades genéticas independientes, las características médicas de cada cual deben ser estudiadas por separado y la cuestión central es si la gran diversidad clonal

se ajusta del todo o en parte a la variabilidad biológica y médica de *T. cruzi*. Y esta cuestión solo puede ser resuelta mediante el estudio de las características biológicas y médicas de una extensa y representativa muestra de poblaciones naturales.

4.2. SUSCEPTIBILIDAD DE LAS DISTINTAS CEPAS A LOS FARMACOS.

Son conocidas las grandes variaciones que presentan las distintas cepas de *T. cruzi* en cuanto a su sensibilidad a la acción de los fármacos. Se ha demostrado que el éxito del tratamiento de la infección experimental con benzonidazol y nifurtimox depende de la cepa empleada (Andrade y col., 1975 y 1985) y no de otros factores como la fase clínica de la infección (Filardi y Brener, 1990).

Neal (1988) compara "in vivo" cinco conocidas cepas de laboratorio resultando dos de ellas no sensibles al tratamiento (Sonya y Colombiana) mientras que el resto sí lo son (Y, Tulahuen, y Perú). Las variaciones en la sensibilidad de las cepas se observan también con otros medicamentos (Avila y col., 1981). Las cepas Sonya y Colombiana por este motivo no son adecuadas para el cribado farmacológico.

Filardi (1990) encuentra el mismo grado de sensibilidad al benzonidazol en las distintas fases clínicas de la infección de cada una de las seis cepas experimentadas (usando como criterio de curación el hemocultivo (Filardi y col., 1987)). La sensibilidad sería, por tanto, una característica de la cepa.

La resistencia de las cepas sin embargo, no es un fenómeno de "todo o nada". Comparando la sensibilidad a benzonidazol y nifurtimox en ratones (100 mg/kg vía oral) de 47 cepas de *T. cruzi*, Filardi (1987) encuentra todo el gradiente entre el 0% y el 100% de susceptibilidad frente a estos medicamentos. La resistencia a los fármacos además, se reduce en gran medida cuando se incrementan experimentalmente las dosis de medicamento, aunque la aplicación clínica de esta solución supondría alcanzar niveles demasiado tóxicos en pacientes humanos (Filardi y Brener, 1990).

La resistencia de la infección experimental al tratamiento con nifurtimox

o benzonidazol se asocia, aunque de forma parcial, con la preferencia miotrópica de la cepa y con las formas sanguíneas gruesas, mientras que las cepas sensibles son reticulotropas o miotropas y predominan formas sanguíneas esbeltas (Neal y van Bueren, 1988; Andrade y col., 1985; Melo y Brener, 1978). Esto podría ser atribuido a la diferente incorporación de los medicamentos por los diversos tejidos infectados o a la distinta intervención sinérgica del sistema inmunitario, variable con la cepa del parásito (Muller y col., 1986). La intervención del sistema inmune en la actividad quimioterápica ha sido demostrada por Toledo y col. (1990).

5. QUIMIOTERAPIA.

5.1. TRATAMIENTO DE LA ENFERMEDAD.

Desgraciadamente no contamos, hoy día, con ninguna droga totalmente activa frente a la enfermedad de Chagas; los únicos fármacos disponibles para su tratamiento son los nitroheterociclos Nifurtimox y Benzonidazol, ambos de eficacia cuestionable y toxicidad manifiesta.

Nifurtimox (Lampit, Bayer 2502) es un nitrofurano que se administra vía oral a dosis diaria de 8-10 mg/kg distribuída en tres tomas. El curso del tratamiento es prolongado (60 días) y suele extenderse hasta 120. Los niños (1-10 años) toleran mejor el fármaco y pueden ser tratados con dosis de 15-20 mg/Kg/día durante 90 días. En casos congénitos se han administrado hasta 25 mg/Kg/día junto con 5 mg/Kg/día de fenobarbital para prevenir los efectos neurológicos laterales. El fármaco es rápidamente absorbido y detectado en suero; los niveles empiezan a disminuir a las 3 horas y no es detectable después de un día; por ello es necesario mantener ininterrumpidamente altos niveles del nitrofurano durante periodos prolongados.

Los porcentajes de curación evaluados por xenodiagnóstico o distintos tests serológicos oscilan, según datos de diversos autores, desde el 30-40% al 86% (Cerisola y col., 1977; Schenone y col., 1981). En pacientes crónicos, Nifurtimox es menos eficaz (Brener, 1979; Avila y col., 1983; Gutteridge, 1982 y 1985). Algunos resultados negativos obtenidos "in vitro" sugieren que debe

ser metabolizado en el organismo o bien combinarse con componentes del hospedador.

Benzonidazol (Rochagan, Ro 7-1051, Rodinil) es un nitroimidazol que se administra vía oral a dosis de 5-7 mg/Kg/día durante 30-120 días.

Los metabolitos de ambos fármacos se excretan en orina. Ambos pueden producir trastornos gástricos, pérdidas de peso, erupciones cutáneas, neuritis periférica y depresión de la médula osea. Son carcinógenos a dosis elevadas en animales de experimentación, aunque no se ha descrito ningún caso en pacientes. Todos los efectos secundarios son reversibles si se suspende el tratamiento. Nifurtimox, como cualquier nitrofurano, causa además anemia hemolítica en individuos deficientes en glucosa 6P deshidrogenasa.

Benzonidazol tiene un efecto inhibitorio sobre la síntesis protéica y de ácidos nucleicos. Los nitrofuranos son tóxicos por su capacidad para formar radicales libres que reducen el O_2 molecular, acumulándose anión superóxido (O_2^-), peróxido de hidrógeno y radical hidroxilo (OH^-) (Docampo y Moreno, 1984). Los microsomas hepáticos de rata catabolizan la reducción del nifurtimox a anión nitro, que reacciona rápidamente con O_2 para regenerar el nitro derivado y O_2^- . En todas las formas de *T. cruzi* se ha demostrado la formación de este radical. Como el parásito no contiene glutatión peroxidasa o catalasa, ocurre la formación espontánea de OH^- . Este es el radical de O_2 más tóxico, ya que produce alteraciones en el ADN y peroxidación de lípidos y oxidación de grupos tiol de las proteínas. De esta forma, la síntesis protéica y de ácidos nucleicos son las principales dianas del nifurtimox. Las células del hospedador también parece que metabolizan los nitrofuranos, como lo hace *T. cruzi*, aunque más lentamente. Ello explica el grado de selectividad en la acción; no obstante, los compuestos son considerablemente tóxicos en humanos; particularmente el cerebro y las gónadas, que no producen catalasa, son los tejidos más sensibles a los efectos tóxicos de nifurtimox.

Si bien el mejor conocimiento del metabolismo del parásito está abriendo caminos al desarrollo de nuevos fármacos, lo cierto es que, por el momento, no existe tratamiento eficaz para la enfermedad de Chagas. El problema se complica además en enfermos crónicos, en los que aunque a veces se prescribe el tratamiento con Nifurtimox o Benzonidazol, éste no

detiene el progreso de las alteraciones electrocardiográficas. En estos casos, debido a los resultados parasitológicos cuestionables, el beneficio clínico incierto y los efectos secundarios, muchos investigadores son cada vez más refractarios al tratamiento de pacientes crónicos. La única alternativa es pues el tratamiento sintomático, pero desgraciadamente la distribución de digitales, diuréticos y marcapasos para enfermos cardíacos y la cirugía para megaformaciones intestinales son procedimientos caros y lógicamente impracticables en las áreas endémicas rurales.

5.2. QUIMIOPROFILAXIS.

La situación en cuanto a disponibilidad de productos quimioprolácticos que eviten la transmisión transfusional, segundo mecanismo en importancia, no es muy distinta. Desde la década de los 50, en que Nussenzweig comprobó que el violeta de genciana destruye las formas sanguíneas de *T. cruzi* in vitro, ninguno de los compuestos propuestos como posibles sustitutos ha superado su actividad. La anfotericina B parece que elimina los tripomastigotes de la sangre almacenada a 4°C a concentraciones de 3 µg/ml, sin inducir hemólisis durante un periodo de 21 días, a través de la unión con esteroides de la membrana del parásito (Cruz, Marr y Berens, 1980). No obstante, constituye solo un ejemplo de los muchos compuestos y series químicas (acridinas, naftoquinonas, etc.) ensayados que no han logrado desplazar al cristal violeta. Las propiedades colorantes del compuesto constituyen un serio inconveniente para su aplicación de rutina con propósitos quimioprolácticos. De ahí se deriva la importancia del desarrollo de moléculas, que aunque no curen la enfermedad, sean tóxicas para *T. cruzi* "in vitro".

5.3. OTROS PRODUCTOS ACTIVOS Y NUEVAS DIANAS.

Otros nitrofuranos, como el denominado SQ 18,506 (Sims y Gutteridge, 1978; Gugliotta y col., 1980) y la nitrofurazona (Schlemper y col., 1977), con propiedades tripanocidas, no han superado los ensayos clínicos por su falta de eficacia a las dosis toleradas por el hombre.

La actividad de los 7 y 8 aminoquinoleínas (primaquina) con un grupo

metoxi en posición 6 se conoce desde la década de los 50 (Goble, 1949 y 1952); aunque no presentan a dosis terapéuticas los problemas de toxicidad de otros antichagásicos, son tóxicos exclusivamente para formas extracelulares, lo que ha limitado su aplicabilidad en los ensayos clínicos. Sin embargo, según datos de McCabe (1988), la primaquina actúa preferentemente sobre formas intracelulares.

El bromuro de etidio (derivado de la fenantridina) cuando se compleja con el ADN disminuye su toxicidad, aunque ésta sigue siendo considerable para el hospedador. A la vez adquiere propiedades lisosomotróficas (Trouet y col., 1976). Incapaces de difundir a través de las membranas biológicas, esos complejos deben ser interiorizados por las células mediante endocitosis, teniendo así acceso a las vacuolas lisosomales. Una vez en la vacuola, el complejo es enzimáticamente digerido, liberando el bromuro de etidio. A pesar de todo, en ensayos experimentales, el compuesto no consigue eliminar los estados tisulares de *T. cruzi*, por lo que tiene escasa eficacia en fase crónica.

El antihiperuricémico Alopurinol es activo sobre las enzimas que participan en el metabolismo de las purinas. *T. cruzi*, que no sintetiza proteínas "de novo", utiliza la vía de salvamento de bases púricas y nucleósidos, transformando el Alopurinol (análogo a la hipoxantina) en un nucleótido (aminopirazolopirimidina, análogo de la adenina) que es incorporado al ARN con consecuencias letales para el parásito (Marr, Berens y Nelson, 1978). Este mecanismo, único en protozoos, explica la baja toxicidad en humanos. No obstante, sus efectos parecen depender de la cepa de *T. cruzi*. Su eficacia está además limitada por su vida media en plasma, que es demasiado corta.

Otra serie que muestra una potente actividad en el Chagas experimental son los antifúngicos imidazólicos. El más activo, administrado por vía oral, ketoconazol, presenta una elevada toxicidad hepática; sin embargo, no se ha descartado, dado su actividad a dosis extraordinariamente bajas. "In vitro", a concentraciones de 5 ng/ml sobre cultivos tisulares de amastigotes, según datos de Goad y col. (1989), altera la biosíntesis de esteroides de los tripanosomas, sin afectar a la composición de esteroides del tejido humano.

También se han ensayado en los últimos años los antineoplásicos

azaespiranos, como el espirogermanium, y los antidepresivos tricíclicos clomipramina e imipramina, así como la rifampicina. El salicilato sódico, algunos tiazoles, derivados del tiofeno, tiosemicarbazonas, 5-nitroimidazoles, etc, pero su falta de eficacia en algunos casos, la toxicidad en otros e incluso razones puramente comerciales, han impedido su desarrollo completo (Ducanson y col., 1977; Neville y Verge, 1977).

A la vista de esta situación, resulta por tanto imprescindible orientar la investigación hacia la búsqueda de nuevos fármacos para el tratamiento de la enfermedad de Chagas. En este sentido, una de las principales dianas contempladas para el desarrollo de fármacos en tripanosomas es el glicosoma. La compartimentación subcelular de la glicolisis en estos parásitos es notablemente distinta a la situación en el resto de los eucariotas, donde la glicolisis ocurre en el citosol. La glicolisis es esencial sobre todo para los tripanosomas africanos, ya que son casi enteramente dependientes de la conversión aeróbica de la glucosa en piruvato. Aunque en *T. cruzi* esta vía no es tan crucial, la existencia de enzimas glicosomales -hexoquinasa, fosfofructoquinasa, gliceraldehido 3P deshidrogenasa y fosfogliceratoquinasa- con características peculiares, orienta el diseño de nuevos fármacos.

Otro sistema único, potencialmente vulnerable a nuevos tripanocidas es el metabolismo y las funciones celulares del glutatión y las poliaminas, que intervienen en procesos vitales para la célula. Aunque los tripanosomas carecen de glutatión reductasa y glutatión peroxidasa que les defiendan de los efectos tóxicos de las formas reactivas de oxígeno (H_2O_2 , O_2^- , OH^-), se ha identificado recientemente un sistema enzimático de regulación de su balance redox tiol-disulfuro intracelular. El compuesto es el N1,N8 bis (glutatiónil) espermidina y ha sido denominado tripanotión. El descubrimiento del enzima tripanotión reductasa, que mantiene el compuesto en su forma ditiol -dihidrotripanotión- hace posible el intercambio tiol-disulfuro con otros disulfuros intracelulares, como es el glutatión. El tripanotión debe por tanto reemplazar al sistema glutatión en tripanosomátidos en la eliminación de peróxidos, responsables junto con otros radicales de oxígeno de la toxicidad de muchos tripanocidas. La enzima tripanotión reductasa ya ha sido aislada de *T. cruzi* y es un buen objetivo para el diseño de nuevos fármacos.

Entre los interferidores de esta vía metabólica está la α

difluorometilornitina (DFMO), de eficacia manifiesta sobre tripanosomas africanos (Bacchi, 1981; McCann y col., 1983), que inhibe la ornitindescarboxilasa (ODC) (Metcalf y col., 1978), enzima clave en la biosíntesis de poliaminas; ello produce también una disminución del nivel de dihidrotripanotión.

En la biosíntesis de las poliaminas interviene también la metionina (Bacchi, 1981), que se transforma en S adenosín metionina (SAM), la cual se decarboxila y transfiere un grupo propil amino para formar las poliaminas espermidina y espermina; el producto de la reacción es la metiltioadenosina (MTA). Esta se recicla a metionina con la participación de un enzima metiltioribosa quinasa (MTR) que actúa previa liberación de la adenina, y que es exclusivo de bacterias y protozoos, y por tanto un blanco ideal para agentes quimioterapéuticos; análogos a esta enzima actuarán como antiprotozoósicos, al inhibir la recuperación de la metionina, que además de alimentar la biosíntesis de poliaminas interviene en otras funciones celulares como son la síntesis de proteínas y las reacciones de transmetilación.

De otra parte, en cuanto a la capacidad de *T. cruzi* para detoxificar a los agentes quimioterápicos, aunque no bien estudiada, sí se sabe que el parásito posee un sistema citocromo P-450 monooxigenasa que metaboliza numerosos sustratos y que puede ayudar a reducir la concentración de los fármacos por debajo del nivel terapéutico.

5.4. RESISTENCIA DE LAS CEPAS.

La resistencia natural de muchas cepas de *T. cruzi* a los nitroderivados puede ser el factor responsable de los resultados controvertidos en cuanto a eficacia del tratamiento. Es bien conocida la variación en cuanto a susceptibilidad de distintas cepas que pueden ser predominantes en determinadas áreas geográficas (Filardi y Brener, 1984). También Filardi y Brener (1987) han comprobado que la eficacia de los fármacos oscila del 0 al 100% en función de la procedencia del aislamiento. Así, se ha apreciado resistencia en algunos obtenidos de reservorios o vectores silvestres, en los que el contacto previo con los agentes puede ser excluido. En la bibliografía se registran índices de curación del 81% en pacientes en fase aguda

F 29 (Pan, 1971), TMM (Avila y col., 1983), LIT + RPMI 1640 + 199 (Sadigursky y Brodskyn, 1986), etc.

En algunos de estos medios se trata de prescindir de la utilización de sueros o de componentes de la sangre porque dificultan estudios de tipo inmunológico o bioquímico, pero en nuestro caso lo que perseguimos es la producción de gran número de parásitos disponiendo de un cierto control sobre su crecimiento, es decir, disponiendo de unas curvas de crecimiento estables que nos permitan prever el desarrollo del cultivo (fase de crecimiento exponencial, picos, fase estacionaria, etc.).

Para este fin, el medio de cultivo más apropiado a nuestro juicio es el medio LIT ("liver infusion triptose"), medio monofásico descrito por Camargo en 1964 y cuya composición se detalla en el capítulo de Material y Métodos.

6.1.2. OBTENCION DE TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS.

El procedimiento más habitual para la obtención de formas metacíclicas de *T. cruzi* es el aislamiento del parásito a partir de sangre de animales de laboratorio con infecciones experimentales, pero también se aíslan formas tripomastigotes a partir de cultivos celulares infectados (Schmätz y Murray, 1982; Kanbara y Nakabayashi, 1983; Carvalho y Souza, 1983; Kloetzel y col., 1984).

En ambos casos se hace necesaria la separación de los parásitos y las células que los acompañan, ya sean sanguíneas o de cultivo, y para ello hay descritas numerosas técnicas, desde la simple sedimentación de los eritrocitos (Kierszenbaum y col., 1976; Ketti y Brener, 1976), o centrifugación (de Souza y col., 1977; Minter-Goedbloed, 1978), a la centrifugación previa aglutinación de los eritrocitos con Con A (Chiari y col., 1978) o fitohemaglutinación (Yaeger, 1960) o por lisis con NH_4Cl (Moft, 1974), centrifugación con solución de Ficoll (Budzko y Kierszenbaum, 1974), cromatografía de intercambio iónico (Lanham y Godfrey, 1968; Gutteridge y León, 1978), purificación en columna DEAE celulosa (Villalta y León, 1979), centrifugación en gradiente de metrizamida (Loures y col., 1980), centrifugación en gradiente Percoll discontinuo (Castanys, 1984), o bien centrifugación en gradiente de densidad (Mortatti y

Munk, 1985).

Pero todos éstos procesos, además de resultar laboriosos, suministran cantidades muy limitadas de parásitos y hoy día es posible la obtención de grandes cantidades de formas metacíclicas in vitro a partir de cultivos de epimastigotes; de hecho, un porcentaje pequeño y variable (por debajo del 25%) de epimastigotes se transforman en tripomastigotes durante la fase estacionaria (Camargo, 1964; Fernandez y Castellani, 1966).

En base a ésto se han realizado numerosos estudios tratando de determinar cuales son los factores que inducen la metaciclogénesis. Estos estudios se suelen basar en modificaciones de medios comúnmente utilizados para el cultivo de epimastigotes, por ejemplo, se ha visto que aumentando la concentración de hemina en el medio LIT, la proporción de tripomastigotes metacíclicos se ve incrementada alcanzando un pico del 80% tras 10 días con 20 mg de hemina/litro (Arévalo y col., 1985). También, formas epimastigotes incubadas con orina artificial de triatomino se transforman en tripomastigotes metacíclicos en 48 horas a 28°C cuando son añadidos al medio 10 mM de L-prolina o también de L-glutamato (Homsy y col., 1989). Además, en ausencia de glucosa y fructosa en el medio, los porcentajes de formas metacíclicas y el crecimiento se incrementan significativamente; así mismo, la adición de NaCl al medio sin monosacáridos incrementa de forma considerable la aparición de formas metacíclicas (Adroher y col., 1988).

Pero no solo las variaciones en la composición del medio influyen en la metaciclogénesis; son muchos los factores que han sido citados como estimuladores o inhibidores de ésta. Entre ellos están la cepa o clon utilizado (Carne y Dvorak, 1982), la duración del cultivo (Chiari, 1974), la presencia de lecitinas en el intestino del insecto (Pereira y col., 1980 y 1981), la adición de hemolinfa de insecto, extracto de redúvido u homogeneizado intestinal de triatomino al medio (Wood y Pipkin, 1969; Wood, 1976; Isola y col., 1981 y 1986), medio deficiente o agotamiento de ciertos componentes de ese mismo medio durante el crecimiento de los parásitos (Camargo, 1964; Chiari y col., 1978; Lopetegui y Miratello, 1982; Contreras y col., 1985), el uso de prolina como única fuente de carbono (Contreras y col., 1985), el pH inicial del medio, edad del cultivo, tamaño del inóculo, una preincubación a 21°C durante 48 horas (Castellani y col., 1967), y cambios de pH (Osuna-Carrillo y col., 1979).

A pesar de que no están perfectamente definidos aún estos factores inductores de la metacicloogénesis, se han desarrollado una serie de medios para el cultivo específico de formas tripomastigote metacíclicas con una alta efectividad; entre ellos se encuentran el medio LMC (Dusanic, 1980), el medio TAU ("artificial triatomine urine"; Contreras y col., 1985), o diversas modificaciones hechas sobre el "Grace's insect medium" (Grace, 1962). Una de esas modificaciones del medio de Grace, la realizada por Osuna Carrillo y col., (1979) que consiste, una vez suplementado el Grace's insect medium sin hemolinfa de insecto (Gibco) con un 10% de suero bovino fetal inactivado, en bajar el pH hasta 1,5 añadiendo ClH 1N y seguidamente ajustar a 5,8 con NaOH 1N, esterilizando finalmente por filtración, es la que hemos utilizado en nuestras experiencias, ya que ofrece un alto rendimiento al obtenerse porcentajes de hasta el 90% de formas metacíclicas en solo 9 días a partir de formas epimastigote procedentes de nuestros cultivos axénicos en medio LIT, mediante un sencillo procedimiento.

6.2. FORMAS PRESENTES EN EL HOSPEDADOR VERTEBRADO. CULTIVOS CELULARES.

En el mamífero hospedador, *T. cruzi* se presenta en dos estados: la forma amastigote intracelular (fig. VI a XI) y la forma tripomastigote sanguínea. Ya hemos visto cómo es posible la obtención de formas tripomastigote a gran escala a partir de medios de cultivo acelulares (libres de células), pero, aunque hoy ya se han descrito medios de cultivo acelulares para el mantenimiento de formas amastigote (Engel y Dvorak, 1988; Velasco y col., 1989), la transformación de las primeras a estas últimas se produce intracelularmente por lo que se sigue precisando de cultivos celulares para la obtención de amastigotes. Además, para la realización de nuestro proyecto de cribado sobre formas amastigote resulta beneficioso contar con estas formas en su ambiente natural, que es el interior de la célula, ya que esto nos permitirá obtener también datos relacionados con la capacidad de absorción de los productos ensayados por parte de las células, así como la citotoxicidad de los mismos.

Han sido varios los sistemas celulares utilizados como hospedadores para obtener el desarrollo intracelular de *T. cruzi* "in vitro", entre ellos se incluyen cultivos celulares primarios de embrión de pollo (Meyer y Oliveira,

1948; Bayles y col., 1966) y de músculo esquelético bovino embrionario (Dvorak, 1976; Neva y Gam, 1977), así como líneas celulares continuas, como células HeLa (Dvorak, 1976), células Vero (Brener, 1976; Bertelli y Brener, 1980) y fibroblastos L-929 de ratón (Tanowitz y col., 1975). También han sido usados sistemas de cultivo con células miocárdicas (Gutteridge y col., 1969; Bioul-Marchand y col., 1980).

En la tabla 1b se resumen algunos de estos sistemas celulares, así como el medio de cultivo utilizado para su mantenimiento. Para este fin existe toda una diversidad de medios definidos que varían en complejidad desde el Medio Mínimo Esencial de Eagle (MEM; Eagle, 1959), el cual contiene aminoácidos esenciales, vitaminas y sales, hasta medios complejos como el 199 (Morgan y col., 1950), CMRL 1066 (Parker y col., 1957), RPMI 1640 (Moore y col., 1967) y el F 12 (Ham, 1965). Los medios complejos contienen un gran número de diferentes aminoácidos y vitaminas, y están suplementados con otros metabolitos (p.ej. nucleósidos) y minerales.

Las concentraciones de nutrientes así como la complejidad varían, como hemos dicho, de unos medios a otros, así, mientras las primeras son bajas por ejemplo en el F 12 y altas en el DMEM (Dulbecco's modification of Eagle's MEM; Dulbecco y Freeman, 1959; Morton, 1970), este último tiene menos constituyentes. Esto da lugar a que se puedan usar simultáneamente distintos medios que se complementan mutuamente; así Barnes y Sato (1980) emplearon una mezcla 1:1 de DMEM y F 12 como base para su medio libre de suero, con objeto de combinar la riqueza del F 12 y la alta concentración de nutrientes del DMEM.

Pero la forma más habitual de enriquecer un medio de cultivo es suplementarlo con algún tipo de suero. Los sueros más usados en cultivo celular son el suero de ternera, suero bovino fetal, suero equino y suero humano, siendo los dos primeros tipos los más ampliamente utilizados, sobre todo para líneas continuas, que exigen una mayor suplementación al tener que multiplicarse para mantenerse durante generaciones.

En nuestro caso, como soporte para la obtención de formas amastigote, utilizamos una línea celular continua, concretamente células Vero, que son mantenidas en cultivo con Medio MEM suplementado con suero bovino fetal.

Fig. VI. *T. cruzi*. Infección *in vitro*. Células Vero en el 2º día p.i. con la cepa Y. x1000. Giemsa.

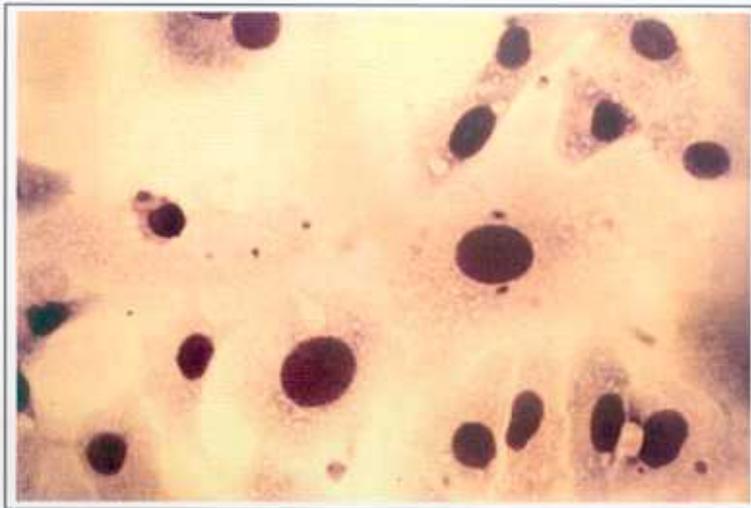


Fig. VII. *T. cruzi* (cepa Bolivia). Cultivo celular (Vero) en el 3º día p.i. x1000. Giemsa.

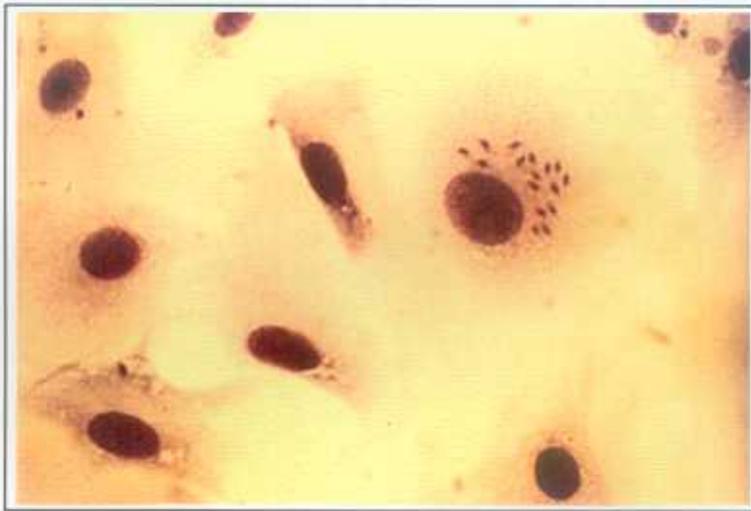
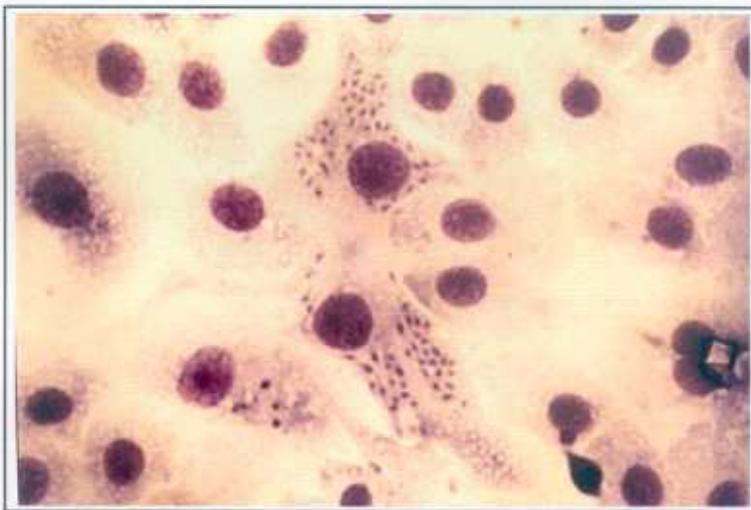


Fig. VIII. *T. cruzi* (cepa Bolivia). Cultivo celular (Vero) en el 4º día p.i. x1000. Giemsa.



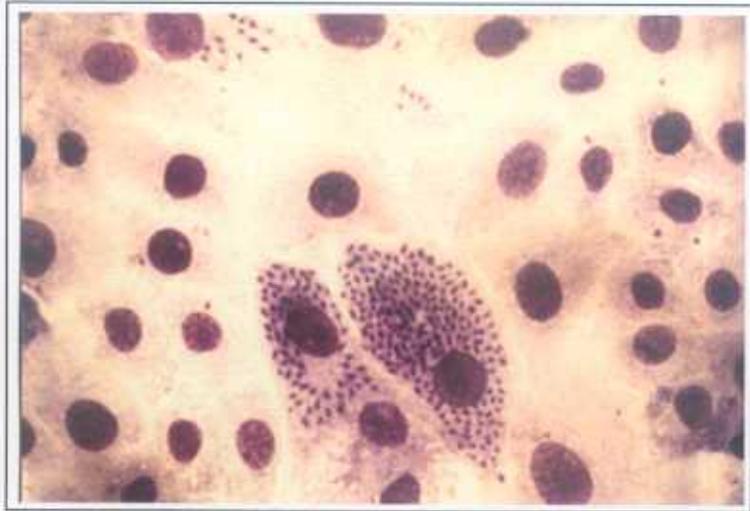


Fig. IX. *T. cruzi* (cepa Y). Cultivo celular (Vero) en el 5° día p.i. x1000. Giemsa.



Fig. X. *T. cruzi* (cepa Bolivia). Cultivo celular (Vero) en el 6° día p.i. Se aprecia una célula ya rota liberando formas tripomastigote. x1000. Giemsa.

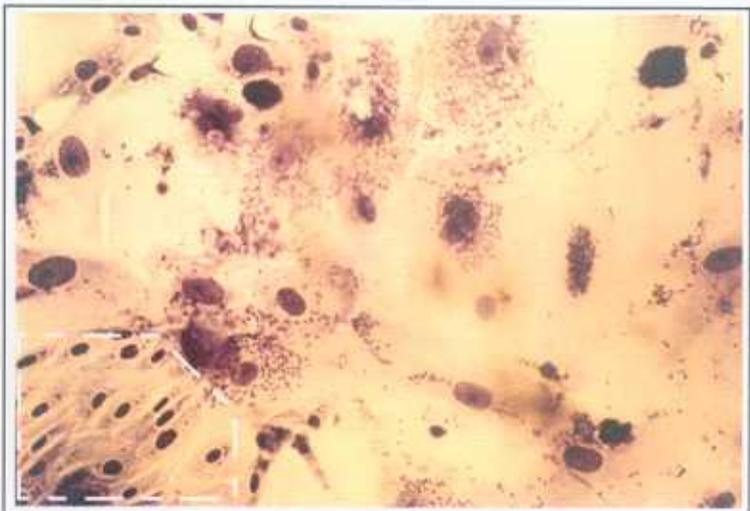


Fig. XI. *T. cruzi* (cepa Bolivia). Cultivo celular (Vero). Aspecto general en el 8° día p.i. Las primeras infecciones ya han roto las células, liberando formas tripomastigote que han dado lugar a reinfecciones (zona enmarcada). x500. Giemsa.

TABLA 1a. CULTIVOS DE FORMAS PRESENTES EN EL INSECTO VECTOR: DENSIDAD CELULAR FINAL Y TIPOS MORFOLOGICOS.

AUTOR	AÑO	DENSIDAD FINAL (células/ml)	TIPOS MORFOLOGICOS EN CULTIVO	MEDIO
CAMARGO	1964	1.5×10^8	<25% metacíclicos >75% epimastigotes	LIT
CASTELLANI	1967	7×10^7	40-70% metacíclicos Resto epimastigotes	HIL a pH 6.7
DIAMOND	1968		Epimastigotes	DIAMOND
PAN	1971	4×10^7	Epimastigotes	F 29
PAN	1971	10^7	Amastigotes	F 32
YOSHIDA	1975	10^8	Epimastigotes metacíclicos según cepa y composición	MEDIO LIBRE DE MACROMOLECULAS
WOOD	1976	8×10^7	<85% metacíclicos	GRACE + 0.25% DE EXTRACTO DE <u>R. prolixus</u>
ACEVEDO	1977	1.6×10^7		HX 25 MODIFICADO
AVILA	1979	2×10^7	Epimastigotes	MEDIO DEFINIDO
OSUNA-CARRILLO	1979	5×10^6	<93% metacíclicos	GRACE MODIFICADO
DUSANIC	1980	8×10^7	>89% metacíclicos	LMC
ISOLA	1981	3×10^8	60-90% metacíclicos	GRACE + EXTRACTO DE <u>T. infestans</u>
SULLIVAN	1982	5×10^7	>90% metacíclicos	GRACE
AVILA	1983	10^7	Epimastigotes	TMM. Medio mínimo definido
CONTRERAS	1985		Metacíclicos	TAU-3AAG. Artificial Triatomine Urine
SADIGURSKSY	1986	$6-8 \times 10^7$	Epimastigotes	LIT + RPMI 1640 + 199. Sin suero ni hemina
SANCHEZ	1990		95-100% epimastigotes	DIAMOND + 3.5% SBF

TABLA 1b. CULTIVO DE FORMAS PRESENTES EN EL HOSPEDADOR VERTEBRADO: DENSIDAD CELULAR FINAL Y TIPOS MORFOLOGICOS.

AUTOR	AÑO	DENS./ml	TIPOS MORFOLOGICOS	CELULAS SOPORTE	MEDIO
KRESS	1977		Amastigotes	Cultivo primario de macrófagos	MEM
PAN	1978	3×10^7	Amastigotes		F-69
BIOUL-MARCHAND	1980	2×10^7	Tripomastigotes	Línea celular miocárdica	DMEM
SANDERSON	1980	3×10^7 5×10^7	Tripomastigotes Amastigotes	WI 38, MR C5. Líneas diploides humanas	BME
OSUNA-CARRILLO	1980			HeLa	MEM
BERTELLI Y BRENER	1980		Amastigotes y Tripomastigotes	Vero	M-199
SCHMATZ Y MURRAY	1981	2×10^8	Solo tripo día 6. A y tripo día 11	Células mio-blásticas	DMEM + 199
VILLALTA Y KIERTSZENBAUM	1982	3.5×10^7	Amastigotes		ML-15 HA
SCHMATZ Y MURRAY	1982	10^9	Tripomastigotes	Células mio-blásticas irradiadas	DMEM + 199
CARVALHO Y SOUZA	1983	2.6×10^7	Tripomastigotes	Fibroblastos transformados	MEM
HUDSON	1984	1.7×10^7	Amastigotes y Tripomastigotes	Línea celular derivada de músculo	DMEM
CHAO	1984		Amastigotes	Rodent mieloma Y3-Ag 1,2,3. cells.	DMEM
VELASCO	1989	3×10^6	Amastigotes	Vero	MEM

7. CRIBADO FARMACOLOGICO SOBRE *Trypanosoma cruzi*.

Al igual que ocurre con las técnicas de cultivo y mantenimiento, los métodos de cribado sobre *T. cruzi* son muy diversos. Tal diversidad es debida a distintos factores entre los que cabría destacar el polimorfismo propio del parásito, la diversidad de hospedadores que infecta, la variedad de cepas y resistencias naturales que presentan, sin olvidar las distintas circunstancias que acompañan a la realización de la técnica, como pueden ser el coste, manejo del parásito, estudios bioquímicos, etc.

7.1. MODELOS EXPERIMENTALES.

Es ya conocida la débil correlación existente entre la actividad tripanocida "in vitro" e "in vivo" de los fármacos, y entre las DI50 (dosis inhibitoria 50) de un mismo medicamento en cada uno de los modelos experimentales, por lo que los resultados positivos en un modelo experimental no implican igual resultado en el otro (Ribeiro-Rodrigues, 1990).

De cualquier manera, y a pesar de la débil correlación entre ellos, existe toda una serie de modelos descritos en función de las necesidades, del grado de desarrollo de los productos a ensayar o de la actividad ya demostrada en modelos anteriores. Estas necesidades van desde el cribado primario en masa de series completas de actividad desconocida, hasta las pruebas "in vivo" previas a los ensayos clínicos. Un resumen de las posibilidades existentes hoy día para cada uno de los casos es lo que se detalla a continuación.

7.1.1. MODELOS "IN VITRO" EXTRACELULARES.

CRIBADO EN EPIMASTIGOTES.

Esta modalidad es la más ampliamente extendida y la que cuenta con mayor número de modelos dado que las formas epimastigotes son las de más fácil mantenimiento en cultivo, lo que da lugar a una gran agilidad en el

desarrollo de pruebas de cribado a gran escala.

Neal (1988) utiliza medio de cultivo de tejidos de insectos de Schneider con 10% de SBF, incubando a 26°C y haciendo recuentos con hemocitómetro. Las pruebas se realizan por triplicado o cuadruplicado en placas microtitulación con 400 µl de medio/pocillo, con epimastigotes a la concentración inicial de 1.000.000/ml, en presencia de distintas concentraciones de medicamento. Las diluciones se realizan en las placas seriadamente por transferencia secuencial con pipetas multicanal y el crecimiento se controla por la tasa de incorporación de timidina tritiada en comparación con los controles. Los datos se analizan por análisis de regresión lineal mediante un computador.

Por su parte, Scott (1987) expone 5 ml de cultivo de 80.000-100.000 epimastigotes/ml a concentraciones de medicamento (50 µg/ml) diluido en DMSO durante 24-72 horas. Se considera activo si el número de epimastigotes decrece tras 24 horas de incubación e inactivo si esta reducción ocurre tras 72 horas. El medio es MEM + 5% de SBF.

Para el crecimiento de los epimastigotes, Doyle (1989) utiliza medio LIT con hemina, antibióticos y 10% de SBF a 26°C, mientras que para mantenimiento usa medio RPMI con 10% de SBF. Los epimastigotes en crecimiento exponencial se resuspenden a 1.000.000/ml en medio LIT. Los medicamentos son disueltos en DMSO y las pruebas se hacen por duplicado con 5 dosis diferentes por cada sustancia, realizando los recuentos por contador de células electrónico en tiempos prefijados. Finalmente se efectúa un análisis de la cinética de crecimiento con un programa de ordenador.

Avila (1987) utiliza el cribado "in vitro" con epimastigotes en medio semidefinido, a 28°C, sembrando 500.000 parásitos/ml. Añade el medicamento (0-25 µl/ml) disuelto previamente en NaOH 1N en solución salina asépticamente en el día cero. A los 5-7 días realiza recuento en hemocitómetro, comparando resultados con los controles.

Por otro lado, Tanowitz (1987) lleva a cabo un cribado en colonias de agar. Para ello incorpora el medicamento en el bacto agar 0.5% según Witner (1982) y extiende los epimastigotes sobre el agar en placas de 35 mm

observando diariamente la formación de colonias (eficiencia de recubrimiento y diámetro de colonias). Según el propio Tanowitz, este método es más sensible que el LIT.

AMASTIGOTES EXTRACELULARES.

Esta modalidad de cribado resulta bastante laboriosa y complicada por la dificultad de obtención de formas amastigotes libres. A pesar de todo, De Castro (1987) realiza pruebas de medicamentos basadas en el efecto directo sobre el parásito extracelular y su proliferación, y en la interacción con la célula de músculo cardíaco. Los amastigotes se obtienen aislados a partir de cultivos celulares de líneas de macrófagos por centrifugación diferencial y purificación en gradiente de metrizamida. Estas experiencias sirven para estudiar la incorporación de metabolitos y la acción de medicamentos.

CRIBADO EN TRIPOMASTIGOTES.

Los tripomastigotes, al no ser formas replicativas, tampoco son muy utilizados para la realización de cribados, relegándose más su empleo a pruebas de quimioprofilaxis en sangre tal y como describimos en el apartado 7.1.4. Sin embargo, Roval (1990) utiliza tripomastigotes aislados de un medio bifásico, contra los que usa medicamentos diluidos en etanol y añadidos al medio a la concentración deseada. Se observan tras 5, 15, 30 y 45 horas de la adición del medicamento.

7.1.2. MODELOS "IN VITRO" INTRACELULARES. (AMASTIGOTES EN CULTIVO CELULAR).

Infección de cultivos celulares.

La proporción de células infectadas está en relación directa con el número de células infectivas, aunque en células epiteliales de riñón de perro también está relacionada con la dispersión celular; se infectan más las dispersas que las confluyentes, mientras que la infección de fibroblastos no se

altera con la densidad del cultivo (Schenkman, 1988).

Los metacíclicos diferenciados "in vitro" infectan igual que los obtenidos de insecto vector según Teixeira (1987), aunque Villalta (1987) encuentra diferencias entre metacíclicos de insecto y los procedentes de cultivo envejecidos de la misma cepa, siendo mucho más eficaces los primeros. La pérdida de virulencia en los cultivados no sería causada por el método de aislamiento.

Los propios amastigotes "in vitro" infectan bien algunas células como los monocitos humanos y fibroblastos (Ley y col., 1988) mientras no infectan en absoluto otras como las epiteliales de riñón de perro (Schenkman y col., 1988).

Para pruebas sobre amastigotes, Neal (1988) obtiene macrófagos peritoneales de ratón infectados con tripomastigotes sanguíneos, procedentes también de ratón, aislados por centrifugación diferencial y tripsinizados para mejorar la infectividad (Piras y col., 1982). Tras 24 horas de la siembra de 175.000 macrófagos en cada pocillo (placas de cultivo celular de 9 pocillos) se infecta con tripanosomas tripsinizados en proporción de 1:1 a 1:2, incubándose otras 24 horas. Se renueva el medio con el medicamento incorporado a la concentración establecida por cuadruplicado. Se incuba 3-5 días más, dependiendo de la cepa, a 37°C con aire + 0.5% de CO₂. Tras la incubación se fijan y se tiñen con Giemsa para su examen microscópico, y se establece la proporción de células no infectadas contando 100 células en cada pocillo.

Con distintos clones de la cepa Y se registran diferencias significativas en los porcentajes de infectividad sobre el mismo modelo celular (células Vero), en la proporción tripomastigote/amastigote obtenidos en el mismo tiempo y en su susceptibilidad a la lisis mediada por el complemento (Braga y col., 1990). Neal (1988) recomienda el uso de poblaciones clonadas, homogéneas y genéticamente estables, para estudios bioquímicos e inmunológicos.

En el modelo descrito por Roval (1990), las células Vero se despegan y resuspenden hasta 160.000/ml y se disponen 3 ml en frascos de 25 cm² durante 48 horas. Se infectan los frascos de similar aspecto con 1.000.000 de

tripanosomas aislados de un medio bifásico, durante 24 horas a 37°C. Se lava con medio RPMI para retirar los parásitos libres. Se sigue la infección en microscopio invertido y finalmente se recuperan los tripomastigotes producidos, que se utilizan para inocular nuevos cultivos. Se suspenden hasta 1.000.000/ml y se infectan otros frascos iguales con células Vero. Se mantienen 3 horas y se retiran y lavan dos veces los tripomastigotes que no infectaron. Finalmente, se incuban durante 4 días. Contra amastigotes, el medicamento disuelto en etanol puro se filtra por 0.22 μm y se diluye en medio hasta 5, 10 y 50 μM . Utiliza cuatro frascos por dosis. En dos frascos se lava a las dos horas. En todos se incuban durante 48 horas y se procesan las células para su estudio ultraestructural.

Scott (1987) usa placas de cultivo de 8 cámaras con 20.000 células humanas embrionarias de pulmón por cámara (Sanderson y col., 1980). El medio es EMEM con 2% de SBF inactivado + penicilina, gentamicina, estreptomycin y fungizona. Se incuban a 36°C con 5% de CO_2 . Los medicamentos se disuelven en DMSO (conc. final máxima 1% v/v). Se inoculan 2.000 tripomastigotes por cámara 24 horas después de sembrar las células, se retira el medio con el exceso de tripomastigotes al día siguiente y se añade el medio con medicamento a concentraciones de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y sucesivas diluciones 1/1000 hasta 10^{-8} mg/ml. Se incuban 4 días y se fijan y tiñen los cubres con Wright modificado. Finalmente, se determina el número de células infectadas por cámara y se calcula la dosis eficaz 50% por análisis de probits.

7.1.3. MODELOS "IN VIVO".

Dentro de las técnicas "in vivo" existen numerosos modelos descritos, de los que vamos a citar, de forma resumida, los más significativos.

Según el modelo de Scott (1987), se toman 10-20 ratones hembras por grupo de 16-18 g de peso y se inyectan intraperitonealmente con 50.000 tripomastigotes. Los compuestos se diluyen en DMSO y en carboximetil celulosa 5% en solución salina, se administran vía oral diariamente durante 5 días a partir de las 24 horas p.i. y se registra la mortalidad durante 43 días. La determinación de la curación de los animales tratados supervivientes se hace por recrudescencia de la infección aguda mediante inmunosupresión con

ciclofosfamida (50 mg/kg/día vía i.p. durante 20 días) y examen de parasitemia (microscopio y subinoculación en cultivo celular). También utiliza la subinoculación intraperitoneal de homogenados de corazón y bazo de ratones infectados en ratones sanos, examinando la parasitemia en éstos semanalmente.

Filardi y Brener (1982) describen un modelo para pruebas de terapia, más que de cribado propiamente. Utilizan la cepa Y inoculando 50.000 tripanosomas i.p. Se administran los medicamentos vía oral a dosis de 25, 50 y 100 mg/kg/día durante 20 días comenzando a las 24 horas p.i. También prueban una dosis única de 500 mg/kg 24 horas después de la inoculación. Los resultados se comprueban por examen directo desde 10-15 días p.t. durante 45-60 días. Con los negativos durante 15 exámenes se realiza subinoculación o hemocultivo en LIT (Camargo, 1964). Los tubos se examinan 30 y 60 días después.

Malanga (1981) concede mucha mayor importancia a la infectividad (presencia de parasitemia) que a la mortalidad, ya que la primera siempre es del 100% mientras que no es así en la segunda. El tratamiento vía oral comienza desde el 6º día p.i. (con 50.000 tripanosomas) y se sigue durante los 5 días sucesivos. Se examina la parasitemia observando sangre de la cola a 400x desde el día 21, cuando comienzan a presentarse en sangre en gran número, una vez a la semana durante 8 semanas. Se consideran infectados los que presentan al menos un tripanosoma en un examen. El resto era no infectado siempre y cuando no presentara miocarditis o amastigotes en secciones histológicas de miocardio a los 90 días. En otras pruebas el inicio del tratamiento se retrasa a los 60 días p.i., con la misma pauta y criterio de curación.

En su trabajo de 1990, Lopes dispone de lotes de 5 animales de 18-20 gramos inoculados con 10.000 tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y. El tratamiento comienza 24 horas p.i. por vía oral durante 7 días con dosis de 50 mg/kg/día. Se realiza un sólo recuento de parasitemia a partir del séptimo día con 5 mm³ de sangre obtenida de la cola entre porta y cubre de 22x22 mm. Se examinan 50 campos con lentes 10x (ocular) y 40x (objetivo), se calcula el número total de campos microscópicos y se obtiene el factor correspondiente a 1/50 de ese número total de campos. Este factor, multiplicado por el número

de tripomastigotes contados en cada porta, nos proporciona el número de tripanosomas por 5 mm³ y finalmente se compara con las cifras de los animales control. El resultado positivo es la ausencia de parasitemia.

Neal (1988) utiliza ratones de 17-20 g que son inoculados subcutáneamente con 100.000 tripomastigotes sanguíneos. El tratamiento con 30-120 mg/kg/día de medicamento comienza el séptimo día p.i. y dura 28-30 días. La parasitemia se examina al microscopio (400x) dos veces, al principio y al final del tratamiento y finalmente realiza hemocultivo en tres tubos de medio Warren (Neal, 1977) por cada animal. Como criterio de eficacia, se considera que los resultados negativos significan curación de los animales.

Para experiencias "in vivo" en ratón, Filardi y Brener (1990) infectan los animales con 10.000 tripomastigotes sanguíneos y administran el medicamento vía oral desde el cuarto día p.i. durante 20 días consecutivos. Efectúan el seguimiento de la parasitemia en el periodo de 10-30 días tras el tratamiento, y finalmente realizan hemocultivo de 0.2-0.4 ml de sangre de los animales en tubos con medio LIT (26-28°C) que se examinan entre 30-60 días para ver la presencia de flagelados. En el tratamiento de la fase crónica se sigue la misma pauta comenzando la administración después de 160 días de la infección.

Por último, Avila (1987) inocula 100.000 tripomastigotes intraperitonealmente y administra el medicamento a los 4 días p.i. durante 10 días consecutivos (1-32 mg/kg/día). Al final, calcula el tiempo medio de supervivencia (registro diario de la supervivencia de los ratones).

7.1.4. QUIMIOPROFILAXIS EN SANGRE.

Casi todos los autores incuban 24 horas a 4°C y subinoculan en ratón. (Letelier y col., 1990; Celentano y Gonzalez Cappa, 1988; Hammond y col., 1986).

Filardi (1984) propone un método rápido para probar la susceptibilidad "in vivo" de diferentes cepas a los compuestos activos. Se basa en el examen de las formas sanguíneas de *T. cruzi* en el momento de máxima

concentración hemática del medicamento, 1-2 horas tras la administración oral. Las cepas susceptibles disminuyen marcadamente su presencia en sangre en poco tiempo, 4-6 horas, mientras que las no susceptibles conservan el nivel que tenían previo al tratamiento.

Schlemper (1978) recomienda una prueba rápida "in vitro" en placas de hemaglutinación para el cribado quimioproláctico en pequeños volúmenes, recontando por el método de Brener (1962) los tripanosomas supervivientes (procedentes de ratones en fase aguda) tras 24 horas de contacto a 4°C en presencia del fármaco probado. Descarta los que tengan tripanosomas vivos y sólo pasa a realizar inoculación "in vivo" de los que resulten negativos en el recuento.

CRITERIOS DE CURACION.

Criterios parasitológicos.

La comprobación de parasitemia en los ratones por microhematocrito es eficaz en un 93% mientras que el hemocultivo sólo detecta el 57% y la serología un 63%. Sólo 3 de 154 ratones comenzaron a ser positivos después de 30 días y 6 más entre 25 y 30 días (Celentano y Gonzalez Cappa, 1989). Once de 182 ratones eran falsos negativos por microhematocrito, y fueron detectados por uno o los dos métodos alternativos. El uso de la triple metodología sólo aumenta un 3,2% el diagnóstico de la infección.

Criterios inmunológicos.

La serología convencional con inmunofluorescencia indirecta y fijación del complemento persiste como criterio firme para el seguimiento de la eficacia de los tratamientos quimioterápicos en la mayor parte de los pacientes. Sin embargo, la aseveración de la curación permanece aún controvertida. Glavao (1990) afirma que la serología convencional puede permanecer positiva en pacientes considerados como curados por otras pruebas conjuntas como el hemocultivo y la lisis mediada por el complemento. Sin embargo Boainain

(1990) estima que la lisis mediada por el complemento es mucho menos sensible que la inmunofluorescencia de membrana y que el xenodiagnóstico, y concluye que no es buen criterio para evaluación de la quimioterapia.

También Andrade (1982) y autores de la OMS (WHO, 1984) defienden las pruebas parasitológicas como criterios más aceptables, mientras que Cancado (1985) defiende que sólo la negativización de la serología es prueba evidente de curación tras la quimioterapia.

7.2. ELECCION DE LA CEPA.

En general los caracteres de las cepas se conservan, incluso durante muchos años, realizando pases sucesivos en ratón con pases periódicos por insecto (Rubio, 1955; Brener y Chiari, 1963, 1982; Hauschka, 1949; Packchianian y Sweetts, 1947; Postan y col., 1986), aunque se ha informado que la cepa Y disminuye su virulencia en ratón tras unos 20 años de cultivo, de forma no recuperable mediante el pase por triatmino (Barbosa y col., 1988).

Otras cepas incluso aumentan su virulencia con el cultivo durante años (Kagan y col., 1966) y otras la modifican, según el órgano afectado (Kanbara y col., 1987), la velocidad de crecimiento (Hermosura, 1985) y la edad del cultivo sin pase por animal (Pizzi, 1957; Hermosura, 1985; Kanbara y col., 1987). Se destaca la escasa virulencia de las cepas aisladas en Estados Unidos (Kagan y col., 1966).

No todas las cepas de *T. cruzi* son aptas para el cribado farmacológico debido a las grandes variaciones que presentan en cuanto a su sensibilidad a la acción de los fármacos. Se ha demostrado que el éxito del tratamiento de la infección experimental con benzonidazol y nifurtimox depende de la cepa de *T. cruzi* empleada (Brener y Chiari, 1967; Brener y col., 1976; Habekorn y Gonert, 1972; Andrade y col., 1975; Andrade y Figueira, 1977) más que de otros factores como la fase clínica de la infección (Filardi y Brener, 1990). Esto ocurre también con otros fármacos, como alopurinol y derivados. En infecciones experimentales de ratón, se encuentran destacadas diferencias en la susceptibilidad de las cepas al alopurinol, atribuidas por Avila

(1983) a una absorción y metabolismo del medicamento más lento por parte de las formas sanguíneas de algunas cepas concretas de *T. cruzi* (Avila, 1983; Avila y col., 1981 y 1984; Berens y col., 1982).

Ya en 1949, Hauschka citaba diferencias en la resistencia natural de dos cepas de *T. cruzi* a un derivado bisquinidina. Andrade (1984) encuentra diferencias significativas entre cepas de Minas Gerais y de Bahia (Brasil) en la resistencia a nifurtimox y a benzonidazol. Brener (1984) compara, con los mismos fármacos, 30 cepas inoculadas en ratón y encuentra 7 de ellas con resistencia moderada y 4 con resistencia extrema, curiosamente con el mismo grado para los dos medicamentos en todas las cepas, excepto en una. Filardi y Brener (1987) también encuentran entre otras muchas cepas, grandes diferencias en la susceptibilidad a estos medicamentos.

Neal (1988) compara "in vivo" cinco conocidas cepas de laboratorio, resultando dos de ellas no sensibles al tratamiento (Sonya y Colombiana), mientras que el resto sí lo son (Y, Tulahuen y Perú). Las variaciones en la sensibilidad de las cepas se observan también con otros medicamentos (Avila y col., 1981). Las cepas Sonya y Colombiana por este motivo no se consideran adecuadas para el cribado farmacológico.

Andrade (1977) obtiene en ratones un 87% de cura en la cepa Peruana frente a un 16.7% con la cepa Colombiana. Incluso observa un aumento de la resistencia al medicamento en los parásitos tratados y no eliminados por el medicamento.

La cepa Bolivia se muestra resistente a benzonidazol (18% de curaciones) y a nifurtimox (0%) en ratones con infección experimental, mientras que la cepa Y parece más sensible (57% y 35% respectivamente) según Ribeiro y col. (1988). El tratamiento comenzó al 3º día p.i. con dosis de 100 mg/kg durante 20 días por vía oral, controlando la parasitemia y realizando, a los 40 días, xenodiagnóstico y hemocultivo.

Filardi y Brener (1990), experimentando con seis cepas, encuentran el mismo grado de sensibilidad a benzonidazol en las distintas fases clínicas de la infección de cada una de ellas, usando como criterio de curación el hemocultivo. La sensibilidad por tanto sería una característica de la cepa.

Sin embargo la propia forma biológica del parásito de una misma cepa presenta distinta susceptibilidad: los amastigotes parecen más resistentes que los tripomastigotes en el tratamiento con nifurtimox, benzonidazol y megazol (De Castro, 1986).

La resistencia de las cepas, no obstante, no parece un fenómeno de "todo o nada". Al comparar la sensibilidad a benzonidazol y nifurtimox de 47 cepas de *T. cruzi* en ratones (100 mg/kg vía oral), Filardi y Brener (1987) encuentran todo el gradiente, entre el 0% y el 100% de susceptibilidad, frente a estos medicamentos. Además, la resistencia a los fármacos se reduce en gran medida cuando se incrementan experimentalmente las dosis de medicamento, aunque la aplicación clínica de esta solución supondría alcanzar niveles demasiado tóxicos en pacientes humanos (Filardi y Brener, 1990).

Por otro lado, aunque de forma parcial, se ha asociado la insensibilidad de la infección experimental al tratamiento con nifurtimox o benzonidazol con la preferencia miotrópica de la cepa de *T. cruzi* y con las formas sanguíneas anchas, mientras que las cepas sensibles son reticulotropas o miotropas y predominan formas sanguíneas esbeltas (Neal y van Bueren, 1988; Andrade y col., 1985; Melo y Brener, 1978). Esto podría ser atribuido a la diferente incorporación de los medicamentos en los diversos tejidos infectados, o a una distinta intervención sinérgica del sistema inmunitario, variable con la cepa del parásito (Muller y col., 1986). La intervención del sistema inmune en la actividad quimioterápica ha sido demostrada por Toledo (1990). Sin embargo, según Bueren (1989), el análisis del zimodema de cinco cepas no permite separar las sensibles de las resistentes a los medicamentos.

Existen además evidencias de la aparición experimental de clones resistentes (Andrade, 1974). A pesar de las posibles diferencias en los mecanismos de acción de nifurtimox y benzonidazol, "in vivo" se obtienen resistencias cruzadas entre ambos en líneas artificiales de *T. cruzi* resistentes, que habían sido seleccionadas por pases sucesivos "in vitro" en presencia de uno de los medicamentos. Las líneas se hacen resistentes a los dos fármacos, aunque se hayan seleccionado frente a uno solo (Abdo y col., 1990).

Algunas resistencias a la quimioterapia pueden ser debidas a las

diferentes sensibilidades de las células hospedadoras del cultivo. La efectividad de la primaquina contra *T. cruzi* intracelular se obtiene con 0.5 µg/ml en macrófagos mientras que se necesitan 5 µg/ml en células L929 (línea celular de fibroblastos subcutáneos de ratón). Por este motivo, la elección de la célula hospedadora en el cultivo puede estar condicionada a la no aparición de resistencias a los fármacos debidas a la línea celular. En todo caso conviene seleccionar líneas celulares del mismo origen que las células invadidas por el parásito en la infección natural (células derivadas del mesodermo).

Distintos clones obtenidos de la cepa Y difieren significativamente en varios aspectos: en los porcentajes de infectividad en el mismo modelo celular (células Vero), en la proporción tripomastigote/amastigote obtenidos en el mismo tiempo y en su susceptibilidad a la lisis mediada por el complemento (Braga y col., 1990). Se recomienda el uso de poblaciones de *T. cruzi* clonadas, homogéneas y genéticamente estables, para estudios bioquímicos e inmunológicos (Neal y van Bueren, 1988).

En las tablas 2a y 2b se resumen algunos de los métodos más frecuentemente utilizados para el cribado farmacológico sobre *T. cruzi*.

TABLA 2a. ALGUNOS METODOS DE CRIBADO "IN VITRO".

AUTOR	AÑO	TIPO MORFOL.	N° TRYP.	SOPORTE CELULAR	N° CELULAS	MEDIO CULTIVO	SOPORTE FISICO	VEHICULO	CONC.	T° ACCION	RECUESTO Y CRITERIOS
DE CASTRO	1987	Amast.									
SCOTT	1987	Epi.	80-100 10 ⁵ /ml			EMEM + 5% SBF		DMSO	50 µg/ml	24-72 horas	Act.: 24 h Inac: 72 h
AVILA	1987	Epi.	5 x 10 ⁵ /ml			Semidefinido		NaOH 1N en sol.sal	0-25 µg/ml	5-7 días	Hemocitómetro. Comp. controles
TANOWITZ	1987	Epi.				Bacto-agar	Placas 35 mm			Diana	Formación colonias
NEAL	1988	Epi.	1 x 10 ⁶ /ml			Tej. insecto Schneider	Placas Microtiter				Tasa inc. Timidina triada
DOYLE	1989	Epi.	1 x 10 ⁶ /ml			LIT RPMI		DMSO	60 mM 5 dosis		Contador elec. An. cinética.
ROVAL	1990	Tripo.	1 x 10 ⁶			Bifásico		Etanol	5 y 25 µM	5-45 días	Microscop. invertido
SCOTT	1987	Amast.	2000/ cámara	Humanas embrionarias de pulmón	20.000/ cámara	MEM + 2% SBF	Placas cultivo 8 cámaras	DMSO	10 µg/ml y dil 1/100	4 días	Tinción Wright. Cel. inf./ cámara
NEAL	1988	Amast.	1 : 1 1 : 2	Macrófagos periton. ratón	175.000/ pocillo		Placas cultivo 9 pocillos			3-5 días	Giemsa. % células infectadas
ROVAL	1990	Amast.	1 x 10 ⁶	Vero	160000/ml 3 ml	RPMI	Frac. 25 cm ²	Etanol	5,10 50 µM	48 horas	Estudio ultraestr.

TABLA 2b. ALGUNOS METODOS DE CRIBADO "IN VIVO".

AUTOR	AÑO	Nº TRYP. INOCULADOS	LUGAR DE INOCULACION	VIA ADMON. DEL TTO.	DOSIS	INICIO DEL TTO.	DURACION TTO.	SEGUIMIENTO	CRITERIOS DE CURACION Y DETERMINACION DE RESULTADOS
MALANGA	1981	50.000		Oral		6 días P.I.	5 días	Desde día 21	Exámen de parasitemia en sangre de cola a 400 x.
FILARDI Y BRENER	1982	50.000	Intra-peritoneal	Oral	25, 50, 100 mg/kg/día	24 h. P.I.	20 días	Desde 10-15 d. PT Hasta 40-60 días	Subinoculación o hemocultivo de negativos
SCOTT	1987	50.000	Intra-peritoneal	Oral		24 h. P.I.	5 días	Durante 43 días	Recrudescencia de la infección en supervivientes por inmunosupresión. Exámen de parasitemia.
AVILA	1987	100.000	Intra-peritoneal		1-32 mg/kg/día	4 días P.I.	10 días		Tiempo medio de supervivencia.
NEAL	1988	100.000	Subcutánea		30-120 mg/kg/día	7 días P.I.	28-30 días		Exámen de parasitemia a microscopio. Hemocultivos.
LOPES	1990	10.000		Oral	50 mg/kg/día	4 días P.I.	7 días		Recuento de parasitemia en sangre de cola.
FILARDI Y BRENER	1990	10.000		Oral			20 días	10-30 días P.T.	Hemocultivo.

MATERIALY METODOS

I. MATERIAL Y METODOS.

1. MATERIAL BIOLÓGICO.

1.1. *Trypanosoma cruzi*.

Se han utilizado en este trabajo seis cepas del parásito, algunas de ellas de uso extendido en el campo de la investigación, por lo que se dispone de datos previos acerca de ellas además de los resultados de nuestras propias experiencias. Se trata de aislamientos de distinta procedencia biológica y geográfica; uno aislado de un caso humano de Chagas (Y), tres procedentes de vectores triatomíneos (Bolivia, RAL y Tulahuén) y dos aislados de hospedadores vertebrados silvestres (GM y MC). En cuanto a la procedencia geográfica, cuatro son de origen brasileño (Y, RAL, GM y MC), una boliviana (Bolivia) y otra chilena (Tulahuen).

Todas las cepas fueron llevadas a cultivo en las mismas condiciones: muestras de sangre infectada de animales de experimentación se llevaron a hemocultivo en medio LIT de los que se obtuvieron cultivos axénicos de cada una de las cepas.

1.1.1. Cepa Bolivia.

Aislada, a partir de heces de *Triatoma infestans* infectados capturados en viviendas de Vitichi (Bolivia), en el Laboratorio de Parasitología de la Facultad de Medicina de Ribeirao Preto en 1971. Fué caracterizada por Funayama y Prado Junior en 1974. En infección experimental en ratón presenta una tasa de mortalidad del 83,4% con una parasitemia en sangre de hasta 49.000 tripomastigotes/ml, apareciendo este pico el día 15º post infección.

1.1.2. Cepa RAL.

Procedente también de heces de *Triatoma infestans* capturado en un domicilio rural de Sitio Aguas Claras, municipio de Santa Rosa de Viterbo, Sao

Paulo (Brasil). Fué inoculada en ratón y mantenida por pases intraperitoneales sucesivos cada 12 días. Caracterizada morfológicamente por Ribeiro y col. en 1993. Presenta el pico de parasitemia el día 12° post infección y provoca la muerte del ratón a partir del día 13° de la infección experimental.

1.1.3. Cepa GM.

Originaria también de Brasil y aislada mediante xenodiagnóstico a partir de Jaguar (*Felis yagouaroundi yagouaroundi*) procedente de Matto Grosso. Mantenido en ratón por medio de subinoculaciones intraperitoneales cada 10 días. Caracterizada morfológicamente por Prado Junior y col. en 1992. En infección experimental presenta una tasa de mortalidad del 100%, con un periodo prepatente que varía de 2 a 4 días y dando lugar a parasitemias en sangre de hasta 39.000 tripomastigotes/ml con el pico situado el día 10° post infección.

1.1.4. Cepa MC.

Tiene la misma procedencia geográfica que la anterior (Matto Grosso, Brasil) pero fué obtenida (también mediante xenodiagnóstico) a partir de lobo guará (*Chrysocyon brachyurus*). Caracterizada morfológicamente por Prado Junior y col. en 1992. Mantenido en ratón por subinoculaciones intraperitoneales cada 10 días, presenta una tasa de mortalidad del 93,3%, con unas parasitemias en sangre de hasta 28.000 tripanosomas/ml que tienen su pico entre el 7° y el 16° día post infección.

1.1.5. Cepa Y.

Aislada por el profesor Pedreira de Freitas en 1950 de un caso humano agudo procedente de Marilia (Sao Paulo, Brasil). Caracterizada morfológicamente por Silva y Nussenzweig en 1953. En infección experimental presenta una tasa de mortalidad del 100% con una parasitemia en sangre de hasta 10.000 tripanosomas/ml, que presenta su pico el día 11° post infección.

1.1.6. Cepa Tulahuen.

Aislada en la década de los 50 en Chile a partir de triatomíneos de la región de Tulahuén, fué descrita por Pizzi y Prager. En infección experimental en ratón produce una mortalidad del 100% apareciendo el pico de parasitemia a los 14 días de la infección.

Las cepas Y y Bolivia así como RAL, GM y MC fueron donadas a nuestro laboratorio por el profesor Dr. D. Miguel Belda Neto de la Universidad de Araraquara (Brasil) en los años 1985 y 1991 respectivamente.

La cepa Tulahuen fué cedida por el centro de Biología Molecular "Severo Ochoa" de Madrid en 1995.

Todas las cepas son mantenidas desde su aislamiento por pases sucesivos en ratón albino. Cada 4 años se hace un pase por insecto (*Rhodnius prolixus*) y se inocula nuevamente en ratón.

También son conservadas y almacenadas mediante **criopreservación** en nitrógeno líquido siguiendo el procedimiento que se describe a continuación:

- Sangrado de los ratones infectados.
- Recogida en PBS (50/50) heparinizado (1000 U/l).
- Dilución de la suspensión anterior 1/4 en buffer "Alsevers" con 10% de glicerol.
- Conservación en nitrógeno líquido.

En el caso de los cultivos, el criopreservante utilizado es dimetil sulfóxido al 5% en el propio medio de cultivo.

1.2. *Leishmania infantum*. Cepa PB 75.

Como punto de referencia comparativo, sobre todo en lo concerniente a las pruebas de tipo bioquímico, utilizamos un organismo perteneciente a la misma familia pero a un género completamente distinto y que cumple un ciclo

biológico con ciertas homologías pero a su vez con grandes diferencias, como es el caso de *Leishmania infantum*. La cepa PB 75 fué cedida a nuestro laboratorio por el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto Carlos III (Madrid).

El material empleado por nosotros en todo momento fueron formas promastigotes en cultivo axénico, mantenidas en medio RPMI-LIT 50% con un 10% de suero bovino fetal en estufa a 28°C.

1.3. VECTOR. *Rhodnius prolixus*.

Los insectos utilizados, de la especie *R. prolixus*, proceden del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto Carlos III (Madrid).

Han sido criados y mantenidos en nuestro laboratorio en frascos doblemente cerrados con gasa y una tela de nylon para evitar el escape accidental. Se mantienen en estufa a 24°C. Se alimentan cada 30 días mediante picadura durante 30-40 minutos a ratones sanos anestesiados procurando que no les alcance la luz.

Los frascos de cría y mantenimiento tienen un papel de filtro en el fondo para absorber las deyecciones y un aspa de cartones en el centro para que los insectos puedan trepar hasta la embocadura en el momento de la alimentación.

1.4. CELULAS DE VERTEBRADO.

1.4.1. FIBROBLASTOS. Línea Vero.

Como soporte celular para la obtención de formas amastigotes intracelulares y para estudios de capacidad de infección celular hemos empleado células Vero. La línea celular Vero fué establecida a partir de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) en 1962 por Yasumura y

Kawakita, de la Universidad de Chiba, Japón.

Las utilizadas en nuestras experiencias proceden del Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto Carlos III (Madrid).

Las células se mantienen indefinidamente en cultivos en monocapa por pases sucesivos en medio MEM suplementado con suero bovino fetal (SBF) inactivado e incubados en estufa de CO₂ regulada a 37°C y 5% de CO₂. Cada 2-3 días el medio consumido es sustituido por medio fresco y cada 7-8 días se procede a realizar subcultivos. Para despegar las células del sustrato con objeto de realizar los subcultivos se emplea una solución de EDTA en PBS, dejándola en contacto con ellas durante 10 minutos con el fin de que, al actuar sobre el calcio de las membranas, el EDTA las haga desprenderse.

1.4.2. MACROFAGOS. Línea J774.

También para los estudios de infección celular y desarrollo de formas amastigotes, fueron empleados macrófagos peritoneales de ratón pertenecientes a la línea celular J774. Esta línea fué cedida a nuestro laboratorio por el Centro Nacional de Microbiología, Virología e Inmunología Sanitarias del Instituto Carlos III de Madrid.

Al igual que la línea de fibroblastos, se mantienen indefinidamente en cultivo por pases sucesivos, en este caso en medio RPMI suplementado con suero bovino fetal en las mismas condiciones que la otra línea celular.

Ambas líneas celulares son también conservadas mediante **criopreservación** en nitrógeno líquido. La congelación se lleva a cabo en viales (criotubos con una capacidad de 1,8 ml) conteniendo 0,5 ml de MEM o RPMI con 10% de SBF y 10% de DMSO (dimetilsulfóxido), a los que se añaden 0,5 ml de la suspensión de células en MEM o RPMI. Mediante un congelador gradual se hace descender la temperatura a razón de 0,6-1°C por minuto hasta alcanzar los -70°C, momento en el que se sumergen los viales en el nitrógeno.

1.5. HOSPEDADOR EXPERIMENTAL. Ratón albino NMRI.

Se emplean ratones *Mus musculus* de la cepa NMRI criados y mantenidos en el animalario del Departamento de Parasitología en condiciones controladas de temperatura, humedad, fotoperiodo, atmósfera, alimentación, jaulas y cama.

Para el pase y mantenimiento de las cepas se utilizan ratones de ambos sexos, no realizándose nunca mezclas en una misma jaula de animales adultos procedentes de distintos grupos familiares para evitar la agresividad y los daños causados por los más fuertes.

2. MEDIOS DE CULTIVO.

2.1. MEDIO LIT. (LIVER INFUSION TRYPTOSE).

La obtención y cultivo de epimastigotes se realiza en una modalidad (Wittner y col., 1982) del medio axénico LIT (Liver Infusion Tryptose; Camargo, 1964) ampliamente utilizado y perfeccionado para el cultivo de *T. cruzi* por muchos autores.

- a)
- | | |
|--|-------------|
| CINa | 4.06 g |
| CIK | 0.46 |
| PO ₄ HNa ₂ | 8.06 |
| Glucosa | 2.00 |
| Triptosa (Difco) | 5.00 |
| Infusión de hígado (Liver Infusion
Broth, Difco) 5% | 100 ml |
| H ₂ O | csp 1000 ml |
| Ajustar pH=7.4 | |
- b) Solución de hemina:
- | | |
|----------------------|-------|
| Hemina (Sigma) | 25 mg |
| NaOH 1N | 1 ml |

Mezclar las soluciones anteriores.

Esterilizar en autoclave, 12 minutos a 121°C.

Conservar en refrigeración (4°C) y oscuridad.

c) Extemporáneamente, antes de su uso, se completa con suero bovino fetal (SBF) inactivado y estéril y una solución de antibióticos (disueltos en solución salina) esterilizada por filtración a través de filtro de 0.22 µm de diámetro de poro.

SBF inactivado estéril	10%
Penicilina	100 UI/ml
Estreptomycin	100 µg/ml

2.2. MEDIO GRACE (GRACE'S INSECT MEDIUM).

Los tripomastigotes metacíclicos se obtienen por transformación de epimastigotes en una modificación (Osuna-Carrillo y col., 1979) del medio Grace (Grace's Insect Medium; Grace, 1962).

- GRACE'S INSECT MEDIUM (Difco)	90 ml
- Suero bovino fetal inactivado	10 ml

Se mezclan y se hace descender el pH hasta 1.5 añadiendo GIH 1N.

Se ajusta nuevamente el pH hasta 5.8 con NaOH 1N.

Esterilizar por filtración. Agitar antes de usar.

2.3. EMEM (MINIMUM ESENTIAL MEDIUM EARLE'S SALTS).

Para el cultivo de la línea celular Vero utilizamos Medio Mínimo Esencial de Eagle con sales de Earle (EMEM) suplementado con un 20% de suero bovino fetal inactivado.

- EMEM 10x (Difco).....	20 ml
- H ₂ O bidestilada	csp 200 ml
- CO ₃ HNa	0.4 g (0.3 con HEPES)

- HEPES 1 g
- Glutamina 0.296 g/l
- SBF inactivado 50 ml
- Penicilina 14 mg
- Estreptomicina 25 mg
- Kanamicina 12 mg

Ajustar pH=7.2

Esterilizar por filtración

Conservar en refrigeración (4°C) y oscuridad.

2.4. MEDIO RPMI.

Para el cultivo de la línea de macrófagos se emplea medio RPMI suplementado también con un 20% de suero bovino fetal inactivado.

- RPMI 10x (Difco) 20ml
- H₂O bidestilada csp 200 ml
- CO₃HNa 0.4 g (0.3 con HEPES)
- HEPES 1 g
- Glutamina 0.296 g/l
- SBF inactivado 50 ml
- Penicilina 14 mg
- Estreptomicina 25 mg
- Kanamicina 12 mg

Ajustar pH=7.2

Esterilizar por filtración

Conservar en refrigeración (4°C y oscuridad).

Para el cultivo de formas promastigote de *Leishmania infantum* se utilizó una mezcla al 50% de los medios LIT + RPMI descritos anteriormente y suplementados en este caso con un 10% de suero bovino fetal.

3. SOLUCIONES COLORANTES Y REACTIVOS.

Solución Salina Fisiológica:

ClNa 8.5 g
Agua destilada 1000 ml

PBS (Phosphate Buffered Saline):

ClNa 8.00 g
PO₄HK₂ 1.21 g
PO₄H₂K 0.34 g
Agua 1000 ml

pH: 7.3

PBS-EDTA:

ClNa 8 g
ClK 0.2 g
PO₄HNa₂ 1.16 g
PO₄H₂K 0.16 g
H₂O csp 1000 ml
EDTA (ácido etilen diamino
tetracético) 0.5g

pH: 7.2

Esterilizar por filtración.

Sarkosil:

Sarkosil (Sigma) 1% en PBS

Azul Tripan (colorante vital):

Azul tripan 0.4% 10 ml
PBS 90 ml

Tintura de Iodo (Solución fijadora colorante):

Iodo metálico 5 g
Ioduro potásico 10 g
H₂O destilada 100 ml

Giemsa:

Giemsa madre 10%
H₂O destilada pH=7.2 90%

Azul de Metileno (solución fijadora colorante):

Azul de metileno 5 g
Etanol-Agua 50% v/v 1000 ml

Eosina 5%:

Eosina acuosa 5g
Etanol-agua 50% v/v 100 ml

Tampón para extracción de proteínas:

Tris ClH 1N
SDS 1-2%
pH = 5,5

Geles acrilamida-bisacrilamida en gradiente (5-20%) para electroforesis de proteínas:

	<u>Separador 20</u>	<u>Separador 5</u>	<u>Almacenador</u>
Acrilamida-bisacrilamida	1.330 ml	0.333 ml	0.25 ml
Separador/almacenador	0.25 ml	0.25 ml	0.5 ml
SDS 10%	0.02 ml	0.02 ml	0.02 ml
Agua destilada	0.297 ml	1.297 ml	1.130 ml
Persulfato amónico 1.5%	0.1 ml	0.1 ml	0.1 ml
TEMED	2.1 μ l	2.1 μ l	2.8 μ l

Azul Coomasie:

Coomasie.....	2,6 g
Etanol	400 ml
Ac. acético	100 ml
Agua dest.....	500 ml

Solución para decoloración de geles de proteínas:

Metanol	100 ml
Ac. acético.....	50 ml
Agua dest.....	csp 500 ml

Tampón para extracción de ADN:

Tris ClH	50 mM
EDTA	50 mM
CINa	100 mM
SDS	0.5%
pH = 7.6	
Proteinasa k	20 μ g/ml

Tris-EDTA (TE):

Tris ClH 10mM
EDTA 1mM
pH = 8

Geles de poliacrilamida (4%) para electroforesis de ADN*:

Acrilamida-bisacrilamida 2 ml
TAE (5x) 3 ml
Agua destilada 9,25 ml
Persulfato amónico 750 µl **
TEMED 7,5 µl

* Para dos geles

** 0,05 g persulfato amónico + 3 ml agua destilada

Tampón de muestra:

Bromofenol 0,025 g
Sacarosa 2,5 g
Glicerol 3 ml
Agua destilada csp 10 ml

TAE (Tris-acetate/EDTA):

50 x: Tris base 242 g
Acido acético glacial 57,1 ml
EDTA 0,5M (pH 8) 100 ml
Agua destilada csp 1 l

Fijador:

Etanol 22,5 ml

Acido acético glacial 1,125 ml
Agua destilada csp 225 ml

Nitrato de plata para tinción de geles:

AgNO₃ 0,3 g
Fijador 50 ml

Revelador:

NaOH 4,6 g
Formaldehido 1 ml
Agua destilada 150 ml

4. PRODUCTOS ENSAYADOS.

4.1. PRODUCTOS DE SINTESIS.

Para validar los modelos propuestos frente a las técnicas aplicadas habitualmente, seleccionamos tres series de productos de síntesis de distinta naturaleza y variada toxicidad, sobre los que fueron aplicadas ambas baterías de pruebas según se describe en el punto 6 de este apartado

4.1.1. Serie T.

Son 5 compuestos derivados del Violeta de Genciana, sintetizados en el Departamento de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia por la Dra. Carmen Avendaño. Las estructuras se muestran en la figura VI.

4.1.2. Serie JDA.

La serie JDA está constituida por 8 derivados de tiadiazina cuya síntesis fué realizada en el Instituto de Química Médica del Consejo Superior de Investigaciones Científicas bajo la dirección de la Dra. Carmen Ochoa. Sus estructuras se muestran en la figura VII.

4.1.3. Serie SM.

La serie SM consta de 9 moléculas sintetizadas en el Departamento de Química Orgánica de la Universidad Nacional de Educación a Distancia de Madrid, bajo la dirección de la Dra. Rosa Claramunt. La serie deriva del aldehído 5-nitrotiofen-2-carbaldehído con distintos sustituyentes. Sus estructuras se muestran en la figura VIII.

4.2. PRODUCTOS DE REFERENCIA.

Además de las tres series de síntesis citadas, fueron ensayados con el mismo fin tres productos de referencia. Como tales fueron empleados los dos fármacos habitualmente utilizados para el tratamiento de la enfermedad, **nifurtimox** y **benzonidazol**, así como el único empleado con fines quimioprolácticos, **violeta de genciana**. Su descripción y características se encuentran descritas en el apartado 5 de la revisión bibliográfica y sus estructuras químicas se muestran en la figura IX.

FIGURA VI: FORMULAS DE LOS PRODUCTOS PERTENECIENTES A LA SERIE T.

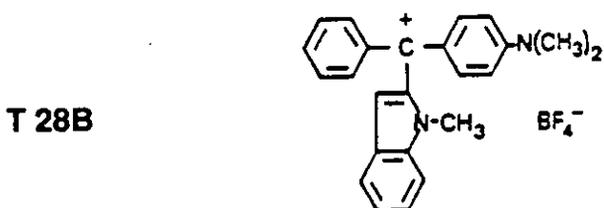
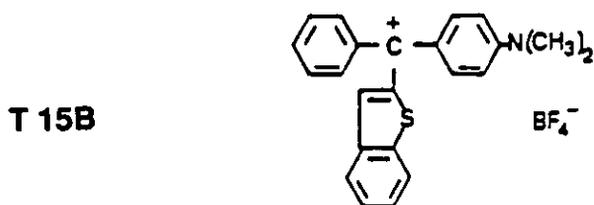
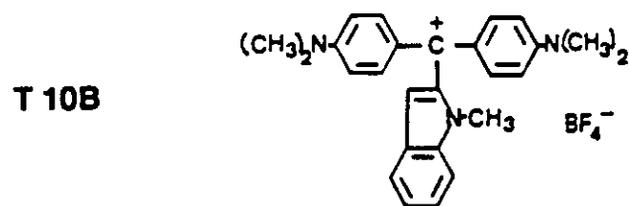
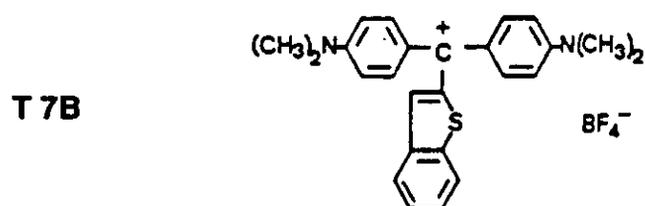
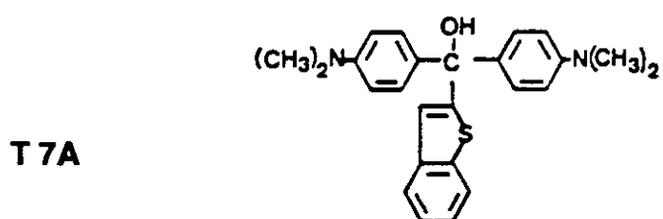


FIGURA VII: FORMULAS DE LOS PRODUCTOS PERTENECIENTES A LA SERIE JDA.

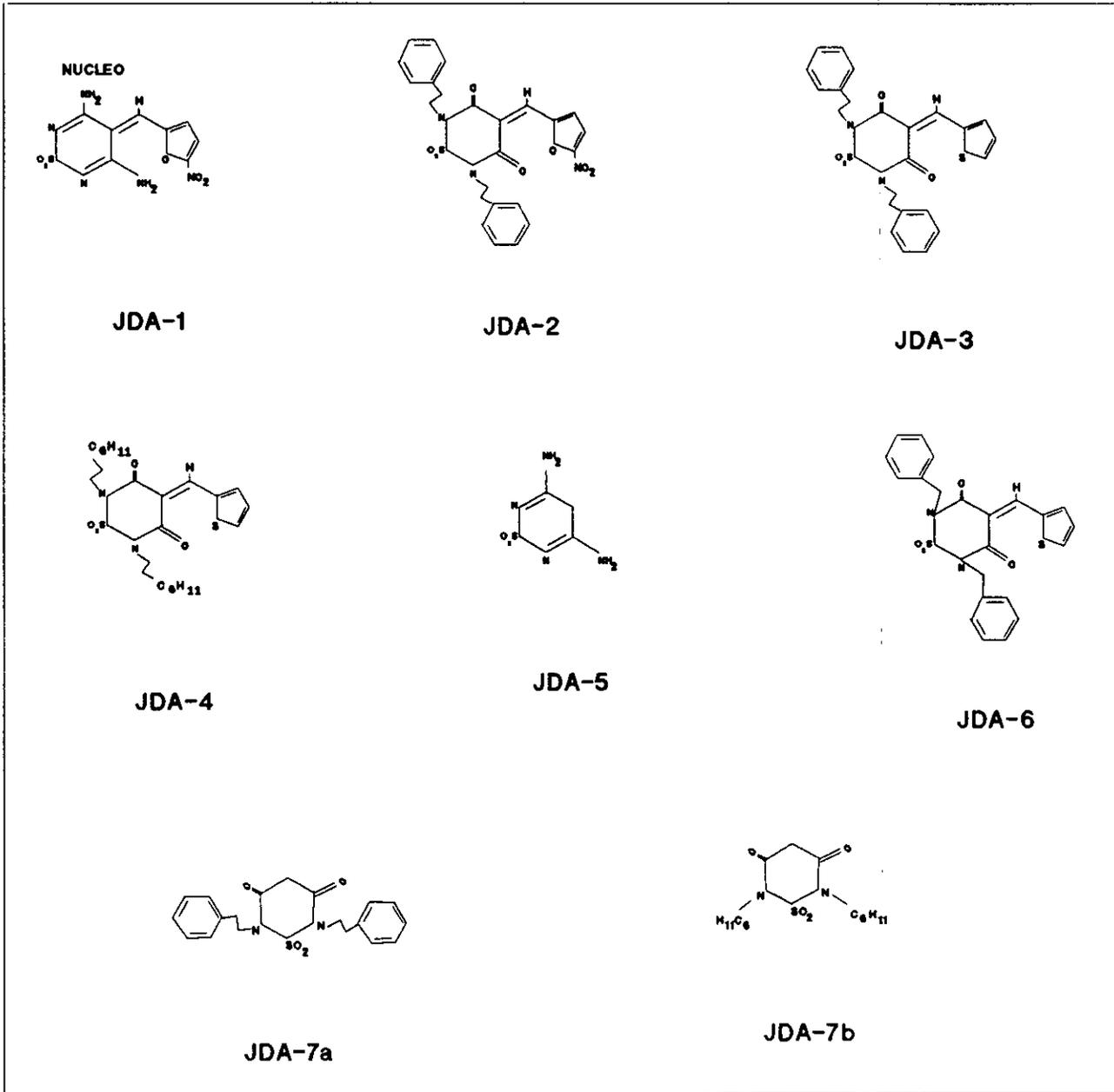
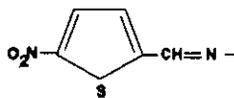
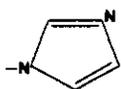


FIGURA VIII: FORMULAS DE LOS PRODUCTOS PERTENECIENTES A LA SERIE SM.



INT-1

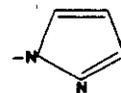
-R



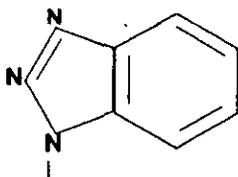
SM-1



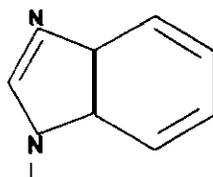
SM-2



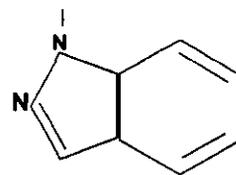
SM-3



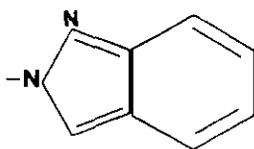
SM-4



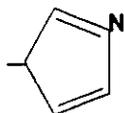
SM-6



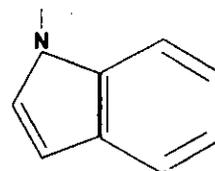
SM-7



SM-8

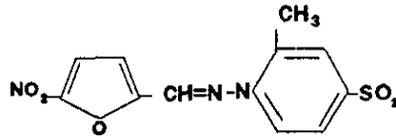


SM-9

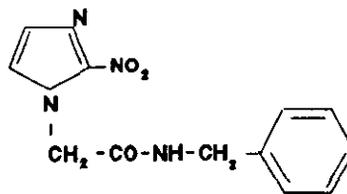


SM-11

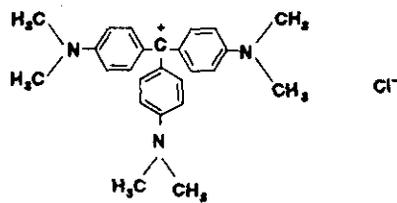
FIGURA IX: FORMULAS DE LOS PRODUCTOS DE REFERENCIA.



NIFURTIMOX



BENZONIDAZOL



VIOLETA DE GENCIANA

5. REPRODUCCION "IN VITRO" DEL CICLO BIOLÓGICO DE *T. CRUZI*.

Como apuntábamos en la revisión de los medios de cultivo, hoy día es posible la reproducción completa "in vitro" del complejo ciclo biológico de *T. cruzi*, pudiendo ser cultivados todos los estados presentes tanto en el insecto vector como en el hospedador vertebrado.

5.1. EPIMASTIGOTES EN CULTIVO AXENICO.

Para la primera obtención de epimastigotes se parte de tripomastigotes sanguíneos obtenidos por punción cardíaca de ratones infectados y anestesiados. Se añaden 0.5 ml de sangre infectada en tubos con 5 ml de medio LIT (según apartado 2.1) y se incuba a 28°C. Posteriormente se realizan subcultivos en medio fresco de estos cultivos originales efectuándose al menos dos pases en medio LIT antes de su utilización para realizar los ensayos.

El control de crecimiento y viabilidad se lleva a cabo con ayuda de una cámara de Neubauer.

5.2. TRANSFORMACION A TRIPOMASTIGOTES METACICLICOS.

Los tripomastigotes metacíclicos se obtienen por transformación de epimastigotes en medio Grace (apartado 2.2.). Se parte de epimastigotes en un cultivo axénico de 14 días de antigüedad en medio LIT. Se deja reposar para separar vivos de muertos durante 2 horas a 28°C. Se centrifuga durante 10 minutos a 450 g desechando el sobrenadante y se lava tres veces en medio Grace+SBF o en medio MEM centrifugando cada vez. Tras contar en hemocitómetro y ajustar la cantidad, se siembra finalmente en el medio Grace y se incuba en estufa a 28°C.

A partir de los 9 días pueden recuperarse las formas metacíclicas, manteniéndose un nivel aprovechable de éstas hasta los 30 días de cultivo.

El control de crecimiento y transformación se realiza mediante recuento en hemocitómetro del cultivo y determinación de la proporción de metacíclicos

tras tinción con Giemsa.

5.3. INFECCION DE CULTIVOS CELULARES. FORMAS AMASTIGOTES.

Se realizan los cultivos previos de células Vero bajo control microscópico de células viables mediante tinción con azul tripan. Posteriormente estos cultivos son infectados con la adición de las formas tripomastigotes obtenidas "in vitro", en proporción 10 tripomastigotes / 1 célula, en medio de cultivo MEM sin suero bovino fetal.

Pasadas 24 horas se retira el medio con los tripanosomas que no han infectado y se repone medio fresco con suero. El tiempo de replicación de amastigotes es de unas 9 horas. La primera infección celular y aparición de nuevos tripomastigotes se completa en 6-7 días.

6. TECNICAS DE CRIBADO.

6.1. MODELOS EN USO.

6.1.1. RECUENTO MICROSCÓPICO DE EPIMASTIGOTES EN MEDIO LIT.

La actividad "in vitro" contra la forma extracelular epimastigote es ensayada sobre cultivos axénicos durante la fase de crecimiento exponencial con anotación de la inhibición del crecimiento tras 2-6 días de incubación en presencia del fármaco.

Obtención de epimastigotes en crecimiento:

El cultivo se realiza en medio LIT suplementado con 10% de SBF. El inóculo para cada ensayo se inicia con 500.000 epimastigotes/ml procedentes de otro cultivo, incubando a 28°C.

Una vez comenzado el crecimiento exponencial, a los 3-6 días, en los

cultivos destinados al ensayo, se recuenta con hemocitómetro y se reparte a continuación en placas Nunclon de 24 pocillos a razón de 2 ml/pocillo.

Adición de los productos a ensayar:

Cada fármaco se disuelve previamente en dimetilsulfóxido puro (DMSO) con lo que se consigue su esterilización. Las diluciones posteriores se realizan en PBS estéril.

Mediante una micropipeta se dispensa en cada pocillo la cantidad determinada de cada dilución del producto, obteniendo siempre una concentración de DMSO igual o menor al 0.2% en el medio final.

Para cada concentración de producto probada se realiza el ensayo en tres pocillos diferentes e igualmente se hace con los controles.

Incubación y examen de actividad:

Pasados 2-6 días de incubación a 28°C, se realizan recuentos de epimastigotes por duplicado en cada pocillo con un hemocitómetro normalizado diluyendo la muestra en tintura de yodo. Se anota el crecimiento en cada pocillo de los productos, fármacos de referencia y controles.

Expresión de resultados:

Con los datos del recuento se calculan para cada producto y dosis:

Índice de crecimiento:

$$IC = (N^{\circ} \text{ de parásitos al final} / N^{\circ} \text{ parásitos al inicio})$$

Expresa la multiplicación de los epimastigotes en presencia de cada una de las concentraciones ensayadas.

Porcentaje de crecimiento:

$$\text{Si } IC_{\text{fármaco}} < 1 : \%C = 0$$

$$\text{Si } IC_{\text{fármaco}} > 1 : \%C = (IC_{\text{fármaco}} / IC_{\text{control}}) \times 100$$

Expresa el crecimiento con respecto al control y su posible inhibición.

Porcentaje de reducción: (Cuando no hay crecimiento; $IC_{\text{fármaco}} < 1$)

$$\%C = 100 - (IC_{\text{fármaco}} / IC_{\text{control}}) \times 100$$

Expresa la reducción del inóculo por la acción del fármaco cuando, además de inhibir el crecimiento, existe efecto tripanocida.

Actividad citostática (% inhibición del crecimiento):

Si $IC_{\text{fármaco}} < 1$: Act. citostática = 100

Si $IC_{\text{fármaco}} > 1$: Act. citostática = $100 - (IC_{\text{fármaco}} / IC_{\text{cont}} \times 100)$

Actividad citocida: cuando $IC < 1$

Si $IC_{\text{fármaco}} > 1$: Act. citocida = 0

Si $IC_{\text{fármaco}} < 1$: Act. citocida = $100 - (IC_{\text{fármaco}} \times 100)$

Eficacia = Porcentaje de reducción con respecto al control (en cualquier caso).

6.1.2. RECuento MICROSCOPICO DE CELULAS INFECTADAS CON AMASTIGOTES.

Se estudia la acción de los fármacos y productos de síntesis sobre células infectadas "in vitro" con amastigotes intracelulares en fase de replicación.

Preparación de los cultivos celulares infectados.

Los cultivos previos de células Vero en frascos de cultivo se lavan con una solución de EDTA en PBS para eliminar en lo posible las células muertas.

Se incuban de nuevo, con una cantidad suficiente de PBS-EDTA para cubrir la monocapa, durante 5-10 minutos a 37°C para despegar las células del fondo y se resuspenden con medio MEM fresco. Se puede conseguir una mejor dispersión de las células haciendo pasar la suspensión a presión a través de una jeringuilla de insulina con una aguja de 0,5 x 16 mm.

Se realiza control microscópico de células viables mediante tinción con azul tripan y se ajusta su concentración en el medio de cultivo.

Se mezclan la suspensión de células y parásitos en proporciones adecuadas para sembrar 15.000 células viables junto con 150.000 tripomastigotes en un volumen de 2 ml de medio sin suero bovino fetal, que se añadirá a cada pocillo.

Para los ensayos de fármacos se utilizan placas Nunclon de 24 pocillos con un cubreobjetos de cristal circular de 12 mm de diámetro en el fondo de cada pocillo. Se incuban células y tripanosomas en contacto durante 24 horas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Las células Vero se adhieren al fondo y se infectan durante este periodo.

Pasadas 24 horas se retira el medio con los tripanosomas que no han infectado y se repone medio fresco con suero. El tiempo de replicación de amastigotes es de unas 9 horas. La primera infección celular y aparición de nuevos tripomastigotes se completa en 6-7 días.

Adición de fármacos y análisis de actividad.

Los productos se disuelven previamente en dimetilsulfóxido puro (DMSO) con lo que se consigue su esterilización, efectuándose posteriores diluciones en PBS estéril. A las 24 horas p.i. se añade cada fármaco a la concentración determinada para el ensayo en cada pocillo con una micropipeta (por duplicado) resultando la concentración final de DMSO siempre inferior al 0,2%. De esta forma el medicamento actúa sobre la replicación de amastigotes intracelulares.

Se incuba en las mismas condiciones 48 horas más y se retira el medio finalmente. El cubreobjetos de cada pocillo, con las células adheridas, se procesa para tinción Giemsa y se realiza el recuento de células infectadas (se cuentan al menos 200 células por pocillo).

Tinción Giemsa:

- Secar al aire
- Fijar con metanol 100% durante 10 minutos.
- Teñir con Giemsa diluido 10% durante 25-30 min.

- Lavar, secar y montar con DPX.

Se calcula la proporción de células infectadas en cada pocillo y se compara con los controles tratados con el vehículo solamente. Se anota el índice de infección respecto a los controles (Índice de infección del control sin tratamiento = 1).

6.1.3. ENSAYO COLORIMETRICO DE CITOTOXICIDAD (MACROENSAYO).

Se utiliza un método colorimétrico para determinar el posible efecto citotóxico de los fármacos sobre las células Vero.

Se disponen placas Nunclon de 24 pocillos. Se añaden 50.000 células viables en cada pocillo y se incuban 4-6 horas (tiempo necesario para su adhesión al fondo) a 37°C en atmósfera enriquecida con 5% de CO₂.

Transcurrido este tiempo se añade con micropipeta un volumen de la disolución de cada producto en DMSO obteniendo concentraciones finales de 100, 10 y 1 µg/ml de cada fármaco junto con un 0.2% de DMSO que es inocuo para las células. Se realiza cada ensayo por triplicado.

Se incuba en las mismas condiciones durante 24 horas y se retira el medio (con pipeta) para procesar las células en cada pocillo:

- Fijar y teñir:

Añadir 1 ml/pocillo de solución fijadora-colorante (azul de metileno, 5g; etanol/agua 50% v/v, 1 l.).

Esperar 30 minutos a temperatura ambiente.

- Eliminar la solución anterior.
- Lavar 3-4 veces por inmersión de la placa en agua, con cuidado de no despegar las células del fondo.
- Escurrir y secar al aire.
- Guardar secas hasta procesar para colorimetría.

Colorimetría:

- Solubilizar las células teñidas de cada pocillo con sarkosil 1% en PBS (1 ml/pocillo durante toda la noche).

- Leer la absorbancia en espectrofotómetro a 620 nm.

Los porcentajes de toxicidad se determinan de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Absorbancia del control} - \text{Absorbancia del problema}}{\text{Absorbancia del control}} \times 100$$

La dosis citotóxica 50 (DC50) se define como la concentración de fármaco a la que decrece la absorbancia media de los tres pocillos un 50% con respecto a los pocillos de control libres de medicamento.

Consideraremos tóxicas aquellas concentraciones superiores a la DC50.

6.2. MODELOS PROPUESTOS.

6.2.1. RECUENTO COLORIMETRICO DE EPIMASTIGOTES.

Con el fin de simplificar y agilizar el proceso de cribado primario sobre formas epimastigotes en medio LIT, se procedió a modificar el método fundamentalmente en cuanto a la forma de recuento se refiere. Los pasos previos son similares a los del método ya descrito, pero el cambio del material utilizado como soporte conlleva algunas variaciones. En este caso utilizamos placas de microtitulación de 96 pocillos para cultivo, en las que depositamos 200 µl del cultivo origen de la prueba, lo que ya de por sí supone un considerable ahorro económico.

Obtención de epimastigotes en crecimiento.

El cultivo, al igual que en el caso anterior, se realiza en medio LIT suplementado con un 10% de SBF y el inóculo inicial para cada ensayo vuelve a ser de 500.000 epimastigotes/ml procedente de otro cultivo, incubando a 28°C.

Una vez comenzado el crecimiento exponencial (3-6 días) se realiza un recuento con hemocitómetro de este cultivo origen y se reparte a continuación en placas de 96 pocillos a razón de 200 µl/pocillo.

Adición de los productos a ensayar.

En este caso se hace obligatorio el cambio de vehículo o disolvente empleado ya que para evitar superar concentraciones tóxicas de DMSO deberíamos emplear volúmenes impracticables, en algunas ocasiones, de este reactivo (la concentración máxima de DMSO tolerable en las experiencias es del 0,2% en el medio final, lo que nos haría movernos en volúmenes del orden de los 0,4 μ l).

Las alternativas empleadas fueron, en primer lugar, realizar una primera disolución controlada en DMSO y de aquí realizar posteriores diluciones en PBS estéril hasta conseguir las concentraciones deseadas, y en segundo lugar, cuando la naturaleza de los compuestos lo permite, utilizar otro tipo de vehículos entre los cuales el más versátil y práctico resulta ser el etanol a concentraciones inferiores al 2% en el medio final.

Para cada concentración de producto probada se realiza el ensayo en seis pocillos diferentes e igualmente se hace con los controles.

Incubación y análisis de actividad.

Pasados de 4 a 8 días (en función del crecimiento de los controles) se procede a sedimentar los parásitos presentes en los pocillos empleando una centrífuga con soporte para placas, centrifugando a 2.200 rpm durante 10 minutos. Se vacía cuidadosamente el sobrenadante de los pocillos y se deja secar al aire la placa. Una vez secos, se fija con metanol y se tiñe el contenido de cada pocillo con eosina acuosa al 5% durante 30 minutos. Una vez transcurrido este tiempo, se elimina el colorante y se lava la placa varias veces por inmersión.

Una vez teñido y seco, se solubiliza el contenido de cada pocillo añadiendo 200 μ l de una solución de hidróxido sódico 0,1N.

Finalmente, se realiza la lectura espectrofotométrica a 490 nm de las absorbancias del contenido de cada pocillo. Se anotan las absorbancias correspondientes a los pocillos con productos, fármacos de referencia y controles.

Expresión de resultados.

A partir de la lectura espectrofotométrica de las absorbancias de problemas y controles se calculan los siguientes parámetros para cada producto y concentración:

Indice de crecimiento = Absorbacia problema / Absorbancia control

Porcentaje de reducción = $100 - (IC \times 100)$.

(Equivalente a la Actividad Citocida del modelo anterior, por lo que será designado de esta manera en las tablas de resultados).

6.2.2. VALORACION INMUNOENZIMATICA (ELISA) DE CELULAS INFECTADAS CON AMASTIGOTES.

Básicamente se pretende reemplazar el recuento microscópico de células infectadas por un método inmunoenzimático que agilice el proceso.

Obtención de sueros:

Con tal finalidad se inmunizaron conejos con antígeno de *T. cruzi* para la obtención de suero que será aplicado a la determinación cuantitativa de los parásitos que sobreviven al tratamiento *in vitro* con los productos objeto de ensayo.

El antígeno empleado para esta inmunización procede de cultivos axénicos de epimastigotes en medio LIT, y para su obtención se centrifugan estos cultivos a 2.200 rpm durante 10 minutos a 4°C y se lavan tres veces en PBS. Una vez efectuados los lavados, se resuspende en PBS a la concentración de 10^8 epimastigotes/ml. A continuación, mediante congelaciones y descongelaciones sucesivas, se rompen los parásitos y se conserva finalmente la suspensión en congelador a -20°C.

La pauta de inmunización fué la siguiente:

Se realizan tres inoculaciones intramusculares de un volumen de 1 ml conteniendo 0,5 ml de antígeno + 0,5 ml de adyuvante de Freund de acuerdo con el siguiente protocolo:

- 1ª inyección: Antígeno + Adyuvante completo
- 2ª inyección: 30 días después
Antígeno + Adyuvante incompleto
- 3ª inyección: 30 días después
Antígeno + Adyuvante incompleto

Después del último inóculo se espera una semana antes del sangrado para la obtención del suero, que posteriormente será titulado mediante inmunofluorescencia indirecta (IFI) y conservado a -20°C.

Protocolo de IFI con epimastigotes para titulación de sueros.

La titulación se realiza mediante IFI empleando como antígeno epimastigotes procedentes de cultivo, según indica el siguiente proceso:

Preparación de antígeno para IFI:

- Centrifugar cultivo de epimastigotes en LIT a 2.200 rpm durante 10' a 4°C.
- Centrifugar y lavar con PBS tres veces más.
- Resuspender en PBS a la proporción 10^8 microorganismos / ml PBS.
- Conservación: Añadir a la suspensión anterior un 1% de formol, o bien congelar directamente (-20°C) sin formolar.

Realización de la prueba:

- Diluir la suspensión de antígeno con PBS hasta que aparezcan pocas formas parasitarias (aprox. 10) por campo microscópico (40x). (Si la muestra había sido formolada, es necesario centrifugar para eliminar el formol antes de resuspender).
- Añadir 10 µl del antígeno diluido en todos los pocillos del porta. (Los portas con el antígeno añadido también pueden conservarse congelados a -20°C).
- Secar al aire.
- Añadir el suero problema partiendo de una dilución 1/10 y posteriores 1/2.

- Incubar 30' - 1 hora, a 37°C en cámara húmeda.
- Lavar dos veces (5-10') en PBS.
- Añadir 10 µl/pocillo de conjugado marcado con fluoresceína (diluído en PBS) y con azul de Evans (50 µl / 5 ml).
- Incubar 30' - 1 hora, a 37°C en cámara húmeda.
- Lavar dos veces en (5-10') en PBS.
- Enjuagar con agua destilada.
- Secar, montar con Fluoprep (glicerina) y titular en microscopio con luz ultravioleta.

Preparación de los cultivos celulares infectados.

El desarrollo del cribado en sus primeras etapas es similar al descrito previamente sustituyendo las placas de 24 pocillos con cubreobjetos redondos, por placas de microensayo para cultivo con 96 pocillos.

Los cultivos previos de células Vero son despegados con PBS-EDTA según se describe en el apartado 6.1.2. Se realiza control de células viables mediante tinción con azul tripan y se ajusta su concentración en el medio de cultivo. Al mismo tiempo, se realiza el recuento de formas tripomastigote metacíclicas en el cultivo de tripanosomas, y se mezcla la suspensión de células y parásitos en proporciones adecuadas para sembrar entre 2000 y 5000 células viables junto con formas tripomastigotes en la proporción 1:10, en un volumen de 200 µl de medio sin suero bovino fetal, volumen que se añadirá a cada pocillo.

Se incuban células y tripanosomas en contacto durante 24 horas a 37°C en atmósfera con un 5% de CO₂, periodo durante el cual las células Vero se adhieren al fondo y son invadidas. Transcurridas estas 24 horas, se retira el medio con los tripanosomas que no han infectado y se repone medio fresco con suero.

Como ya ha sido indicado, el tiempo medio de replicación de amastigotes es de unas nueve horas. La primera infección celular y aparición de nuevos tripomastigotes se completa en 6-7 días. Las determinaciones inmunoenzimáticas sobre células infectadas presentan evidentes diferencias a las 48 horas post infección con respecto a las no infectadas.

Adición de fármacos:

En este caso no es posible el empleo de dimetil sulfóxido por las mismas razones que indicamos en el apartado 6.2.1. Por ello, los productos se disolvieron previamente en pequeños volúmenes de DMSO (con lo que se obtiene su esterilización) y posteriores diluciones se realizaron con PBS estéril. En caso de aparecer problemas de solubilidad o precipitación, se empleará como vehículo alguno alternativo de menor toxicidad como puede ser el etanol.

A las 24 horas post infección se añade cada fármaco a la concentración determinada para el ensayo en cada pocillo con una micropipeta (por sextuplicado), obteniendo siempre menos del 0,2% de DMSO en el medio. De esta forma, el medicamento actúa sobre la replicación de los amastigotes intracelulares.

Revelado, análisis de actividad y expresión de resultados.

Se incuba en las mismas condiciones 48-72 horas más, se retira definitivamente el medio y se procede a la realización del ELISA cumpliendo el siguiente protocolo:

1. Retirar el medio de las placas y lavar tres veces con PBS (pH 7,2)- Tween 20 (0,05%).
2. Fijar con 250 μ l/pocillo de metanol. Lavar tres veces.
3. Postapizado de las placas:
 - Añadir 250 μ l/pocillo de BSA (solución albúmina bovina) al 0,1% en PBS.
 - Incubar 1 hora a 37°C.
 - Lavar tres veces.
4. Añadir 100 μ l de suero (dilución según título) a todos los pocillos.
 - Incubar 2 horas a 37°C.
 - Lavar tres veces.
5. Añadir 100 μ l de conjugado (1/1500-1/3000) a cada pocillo.
 - Incubar 1 hora a 37°C.
 - Lavar tres veces.
6. Añadir 100 μ l del sustrato.

- Incubar 5 minutos a temperatura ambiente y oscuridad.
- 7. Añadir 50 μ l de la solución de frenado.
- 8. Leer en espectrofotómetro a 490 nm.

Reactivos:

- Suero: Titulado mediante IFI y diluido según título en PBS (pH 7,2) + 0,1% BSA + 0,05% Tween 20.
 - Conjugado: Anticuerpo anticonejo marcado con peroxidasa diluido en PBS (pH7,2) + 0,1% BSA + 0,05% Tween 20.
 - Sustrato enzimático (solución reveladora):
 - 10 μ l tampón citrato-fosfato pH 5
 - 4,8 μ g ortofenil diamina (OPD)
 - 4,8 μ l H₂O₂
- Esta solución se prepara en el momento y en ausencia de luz.
- Solución de frenado: Acido sulfúrico 3N.

Se realiza lectura de absorbancias en espectrofotómetro a 490 nm y se anotan las medias de los valores de los pocillos con producto, fármacos de referencia y controles.

Se determinan los índices de infección respecto a los controles (índice de infección del control = 1).

$$\text{Índice de infección} = (\text{Abs problema}) / (\text{Abs cont+})$$

6.2.3. ENSAYO COLORIMETRICO DE CITOTOXICIDAD (MICROENSAYO).

El establecimiento de la toxicidad de las moléculas que superan el cribado se realiza a través de una modificación del método descrito en el apartado 6.1.3. Consiste en el empleo de placas de microensayo de 96 pocillos y la sustitución del colorante azul de metileno por eosina, utilizando el mismo espectrofotómetro y filtro que en la prueba de actividad sobre epimastigotes.

En las placas de microensayo de 96 pocillos se siembran las células (despegadas y controlada su viabilidad según se indica en el apartado 6.1.2)

a razón de 30.000-50.000 células/pocillo, incubando posteriormente a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ durante 4-6 horas, que es el tiempo necesario para su adhesión al fondo.

Transcurrido este tiempo, se añade con micropipeta el producto a ensayar en las mismas diluciones y condiciones empleadas en el apartado 6.2.2. Se realiza el ensayo por sextuplicado.

Se vuelve a incubar en las mismas condiciones durante 24 horas, transcurridas las cuales se retira el medio para procesar las placas aplicando el siguiente protocolo:

- Secar al aire.
- Fijar con 200 µl/pocillo de metanol durante 5 minutos.
- Teñir con eosina acuosa al 5% durante 30 minutos.
- Lavar varias veces por inmersión de la placa en agua destilada.
- Escurrir y secar al aire.
- Guardar secas hasta procesar para colorimetría.

Colorimetría:

- Solubilizar las células teñidas de cada pocillo con hidróxido sódico 0,1N (200 µl/pocillo).
- Leer absorbancias en espectrofotómetro a 490 nm.

Los porcentajes de citotoxicidad se determinan de la siguiente manera:

$$\frac{\text{Absorbancia control} - \text{Absorbancia problema}}{\text{Absorbancia control}} \times 100$$

Así mismo, igual que en el apartado 6.1.3, se definen la DC 50 y las concentraciones citotóxicas.

7. OTRAS TECNICAS.

7.1. EXTRACCION Y VALORACIÓN DE PROTEINAS.

Con el fin de detectar posibles diferencias a nivel de patrones de bandas correspondientes a proteínas totales en las distintas cepas, fueron obtenidos extractos a partir de cultivos en masa de epimastigotes en medio LIT del modo que se indica a continuación.

Se hicieron crecer cultivos de epimastigotes en frascos de 80 ml según se describe en el apartado 5.1, y en el momento de máximo crecimiento (aprox. 2×10^7 /ml) se procedió a su recolección centrifugando a 2.200 rpm durante 10 minutos a 4°C realizando una serie de lavados sucesivos con PBS y resuspendiendo el botón en un volumen final de 1 ml de un tampón constituido de la siguiente manera:

- Tris ClH 1N
- SDS 1-2%
pH = 5,5

Una vez resuspendida la muestra en este tampón, se ayuda a la rotura de membranas y a la dispersión del material, mediante una serie de congelaciones y descongelaciones sucesivas.

Finalmente, la muestra es sometida a centrifugación durante 15 minutos a 4°C y 13.000 rpm, y una vez transcurrida ésta se procede a recuperar el sobrenadante, que será sometido a valoración y congelado inmediatamente a -20°C para su conservación hasta el momento de su uso.

Valoración de proteínas.

La valoración de la cantidad de proteína obtenida tras el proceso de extracción se realiza mediante la técnica de Bradford (1976). Para ello es necesaria la elaboración de una curva de calibrado realizada con concentraciones controladas y crecientes de albúmina, diluidas en PBS más ácido fosfórico y metanol y leídas en espectrofotómetro a 595 nm.

La muestra problema se diluye de la misma manera en las concentraciones adecuadas y los valores que resulten de su lectura espectrofotométrica serán confrontados con la curva patrón, obteniéndose la concentración en $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de proteína obtenida en cada caso.

7.2. ELECTROFORESIS SDS-PAGE DE PROTEINAS TOTALES.

Las muestras resultantes de la extracción de proteínas son sometidas a electroforesis en geles de acrilamida-bisacrilamida en gradiente 5-20% cuya composición se detalla en el apartado 3.

Para realizar la separación por electroforesis, una cantidad de 20 μg de muestra, disuelta en tampón con azul bromofenol, es reducida mediante calentamiento durante 5-10 minutos en baño de agua hirviendo, en presencia de β mercaptoetanol.

Un vez realizada la separación, los geles son teñidos con azul Coomasie pudiendo ser posteriormente eliminado el exceso de colorante con una mezcla de metanol y acético en agua destilada, según se indica en el apartado 3. Los geles, una vez teñidos, son secados (en un secador de geles Gel Dryer 583, BIO-RAD) para su conservación indefinida.

7.3. EXTRACCION Y VALORACION DE ADN.

Para la extracción de ADN, todas las cepas fueron cultivadas en medio LIT durante 7-9 días (hasta la mitad de la fase de crecimiento logarítmico) en frascos de 80 ml a 28°C. Los cultivos fueron centrifugados a 2.200 rpm durante 10 minutos a 4°C y lavados tres veces en PBS a pH 7.4 por sucesivas centrifugaciones. El botón resultante es resuspendido en cinco volúmenes de un tampón de extracción constituido de la siguiente manera:

Tris-ClH.....	50 mM
EDTA.....	50 mM
CINa.....	100 mM
SDS.....	0,5 %

pH 7.6

Cada muestra se incuba junto con 20 µg/ml de Proteinasa K durante dos horas a 55°C. A continuación se realizan dos extracciones con la mezcla fenol:cloroformo:isoamil-alcohol en las proporciones 25:24:1 centrifugando a 3.000 rpm durante 5 minutos a 4°C. Tras concluir las extracciones se procede a precipitar los ácidos nucleicos añadiendo a cada muestra 0,1 volúmenes de acetato sódico 3M y 2 volúmenes de etanol absoluto a -20°C.

Una vez precipitado el ADN se centrifuga durante 15 minutos a 13.000 rpm y se recupera el botón, que vuelve a ser resuspendido en etanol al 70% a -20°C. Se vuelve a centrifugar, eliminando el sobrenadante y dejando secar al aire los restos de etanol para finalmente suspender el ADN obtenido en 100 µl de TE (Tris-EDTA, apartado 3).

Valoración de ADN.

La concentración de ADN en solución se estima en espectrofotómetro a 260 nm, sabiendo que 1 unidad de densidad óptica de ADN de doble cadena equivale a 50 µg/ml.

Para valorar se disuelven 5 µl de ADN con 995 µl de TE y se efectúa la lectura espectrofotométrica a 260 y 280 nm. La relación de pureza se obtiene mediante el cociente de las lecturas a 260 y a 280 nm. Dicha relación debe ser mayor de 1,8 ($A_{260} / A_{280} > 1,8$). En caso contrario, será necesario repetir la extracción protéica con fenol-cloroformo.

El ADN resultante es almacenado a -20°C hasta su utilización.

7.4. AMPLIFICACION AP-PCR.

Con el fin de detectar posibles diferencias en las secuencias de ADN de las distintas cepas, se procede a someter las muestras a una amplificación mediante la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa utilizando "primers" o iniciadores elegidos arbitrariamente, al azar (AP-PCR).

Cada reacción de amplificación se hace en un volumen final de 10 µl conteniendo 0,5 unidades (0,1 µl de 5 u/µl) de Replitherm DNA Polimerasa

(Epicentre Technologies); 1,7 μ l de una solución 2,5 mM de cada dNTP; 1,2 μ l de tampón Tris-ClH 200 mM (pH 8.3), ClK 1M, 0,1% Tween 20 y 0,1% NP-40 con 1,44 μ l de Cl_2Mg 25 mM en 3,23 μ l de agua destilada, junto con 1,33 μ l de iniciador y 1 μ l (0,01 μ g) de ADN molde para cada una de las muestras con cada uno de los iniciadores correspondientes.

Los iniciadores, B1: CTTTCGCTCC; B2: CTGCTGGGAC y Z3:CAG-CACCGCA (de Operon Technologies), fueron seleccionados de forma arbitraria.

La mezcla de reacción es completada con 20 μ l de aceite mineral y sometida en un termociclador (Genetic Thermal Cycler GTC-2, Precision Scientific) al siguiente protocolo de amplificación: en primer lugar, una desnaturalización inicial a 95°C durante 5', seguida de dos ciclos de 30°C durante 2' para la hibridación; 72°C durante 1' para elongación y 95°C durante 30" para desnaturalizar, y a continuación 33 ciclos iguales a los anteriores salvo la primera fase (hibridación) que se hace a 40°C. En el ciclo final, la elongación es de 5' (Steindel y col., 1993).

7.5. ELECTROFORESIS DE ADN AMPLIFICADO.

Finalizada la amplificación, a cada muestra resultante le fueron añadidos 4 μ l de tampón de muestra con azul de bromofenol, y volúmenes de 5 μ l de la mezcla fueron posteriormente sometidos a electroforesis en geles de poliacrilamida al 4%, cuya composición se detalla en el apartado 3.

Una vez realizada la separación por electroforesis, los geles fueron fijados con una solución de etanol 10% y ácido acético 0,5% durante un mínimo de 5 minutos y teñidos durante 10-20 minutos con nitrato de plata 0,2% para, tras lavar dos veces durante 5 y 30 segundos respectivamente, revelar finalmente con hidróxido sódico y formaldehído hasta la aparición de bandas.

Los geles, una vez teñidos, se dejan secar a temperatura ambiente (24 horas) para su conservación indefinida.

8. TRATAMIENTO ESTADISTICO.

Las pruebas estadísticas aplicadas en este trabajo están encaminadas a la validación de los estudios de variabilidad y a la búsqueda de posibles relaciones y diferencias entre las cepas estudiadas. Con este fin, y para el proceso y tratamiento de los datos obtenidos mediante dichas pruebas, se ha utilizado la versión 6.1 del programa informático NTSYS (Applied Biostatistics Inc., Setauket, NY). Este programa nos permitirá establecer posibles agrupamientos entre cepas en función de las similitudes y diferencias observadas, o bien nos delatará comportamientos independientes que desechen cualquier tipo de relación.

Básicamente, se trata de la construcción de matrices de similitud-disimilitud a partir de la asignación de valores de 0 ó 1 a los caracteres derivados de los resultados obtenidos en las pruebas realizadas. El procesamiento de estas matrices se realiza aplicando el Coeficiente de Similitud Simple **SM** (Simple Matching Coefficient; Sneath y Sokal, 1973) y posteriormente el Método Sencillo de Emparejamiento Utilizando Medias Aritméticas **UPGMA** (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages; Sneath y Sokal, 1973).

El fundamento de estos parámetros y su desarrollo se comentará más detalladamente, durante su aplicación sobre los datos a procesar, en el apartado 1.3 de "resultados".

**EXPERIENCIAS REALIZADAS
Y RESULTADOS**

IV. EXPERIENCIAS REALIZADAS Y RESULTADOS.

1. ESTUDIOS DE VARIABILIDAD ENTRE CEPAS.

1.1. PRUEBAS BIOLÓGICAS.

1.1.1. CURVAS DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES EN LIT.

El comportamiento en cultivo de las formas epimastigotes de las distintas cepas es evaluado mediante la realización de las correspondientes curvas de crecimiento en medio LIT.

La procedencia del material biológico es en todos los casos la misma y cumpliendo las mismas condiciones. Se parte de sangre obtenida por punción cardíaca de ratones infectados experimentalmente. Esta sangre infectada con formas tripomastigotes es sembrada en tubos que contienen medio LIT y que son incubados a 28°C. Una vez producida la transformación y crecimiento de epimastigotes en estos hemocultivos originales, se realizan subcultivos en medio fresco dándose dos pases en medio LIT antes de la siembra que dé comienzo al desarrollo de las curvas de crecimiento. Se parte de 500.000 epimastigotes / ml en tubos con 5 ml de medio, formas procedentes de los cultivos en las condiciones citadas anteriormente, cuando ya se hallan en fase estacionaria.

Una vez realizada la siembra se procederá a hacer recuentos periódicos (cada 2-3 días) en cámara de Neubauer, utilizando tintura de yodo para fijar y dar contraste a los parásitos. Los recuentos se prolongan durante aproximadamente un mes, realizándose el conteo de al menos tres tubos por cepa para hacer la media entre los mismos.

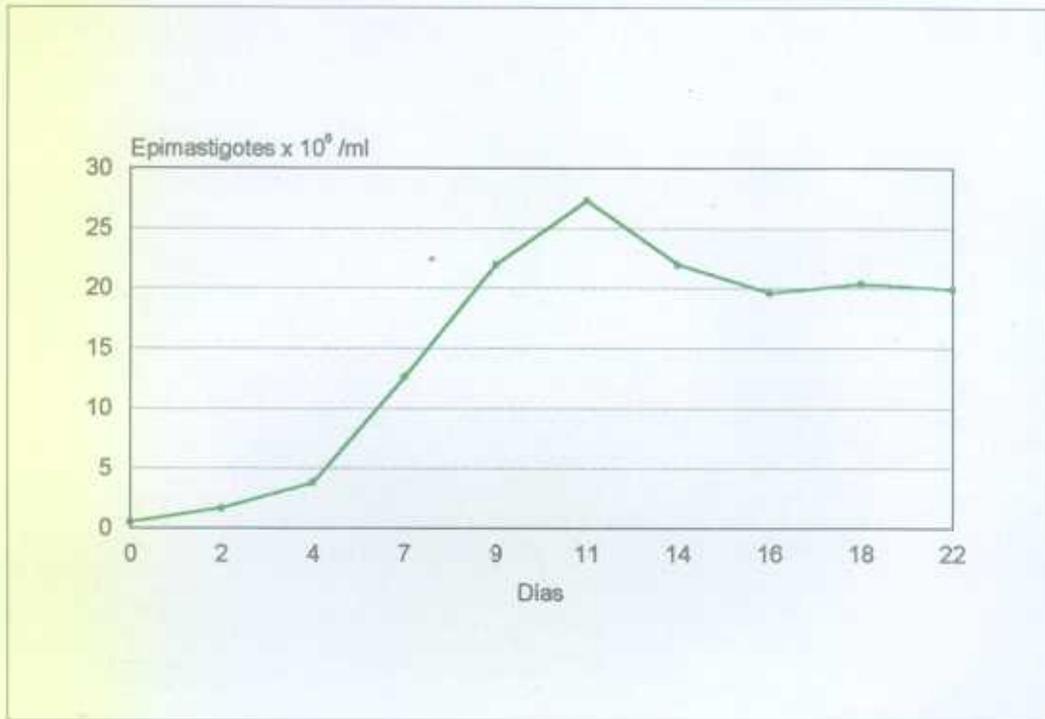
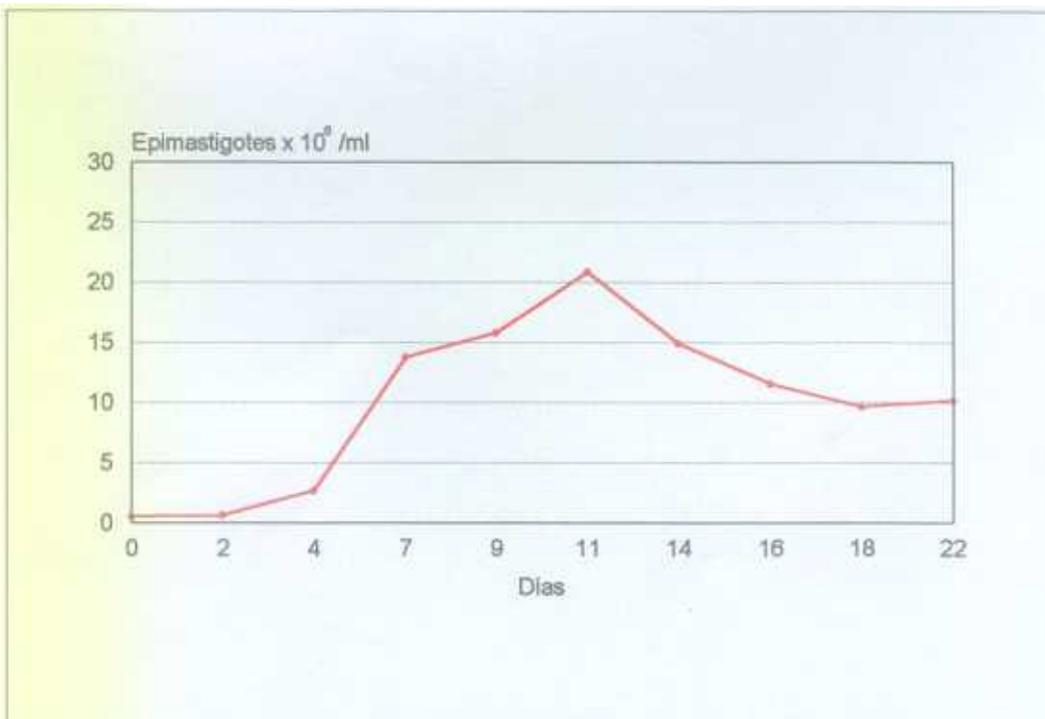
Los resultados finales obtenidos para cada una de las cepas son los que se detallan a continuación (tabla 3), y aparecen representados en las gráficas 1 a 6.

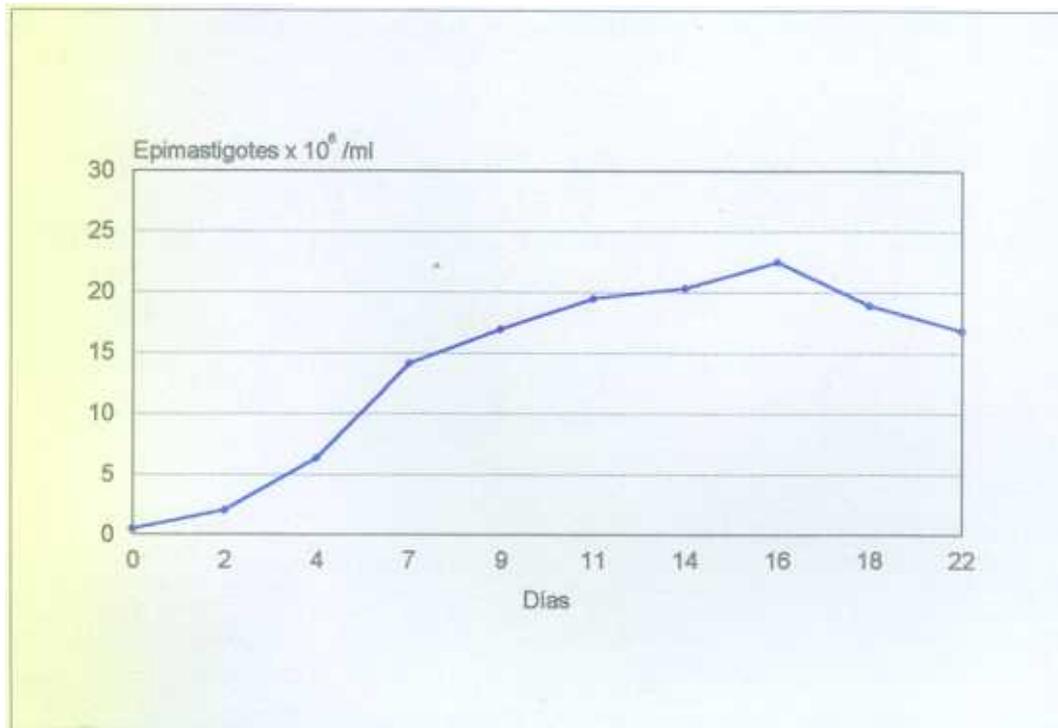
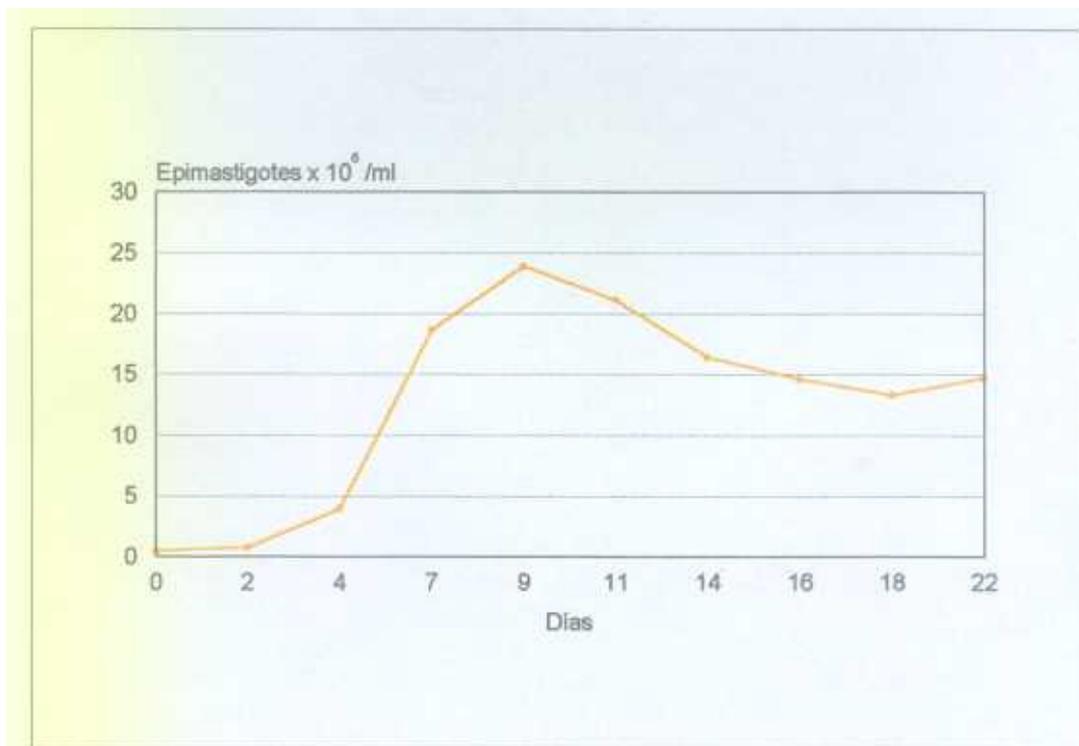
Tabla 3. CURVAS DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES EN MEDIO LIT.

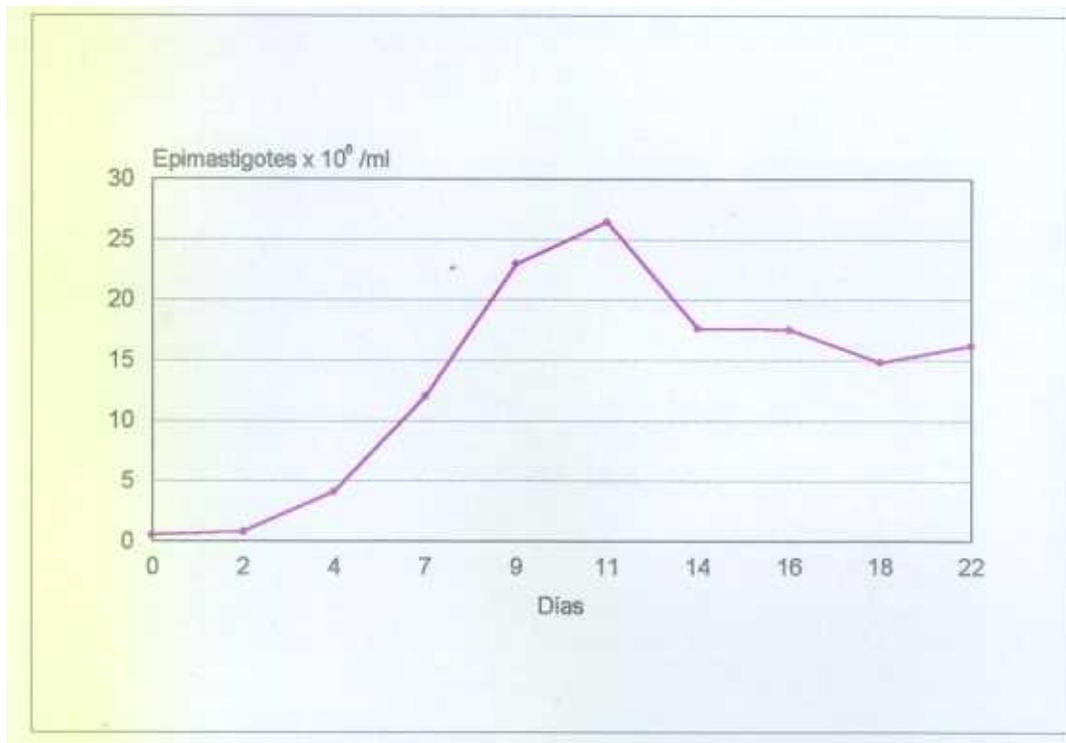
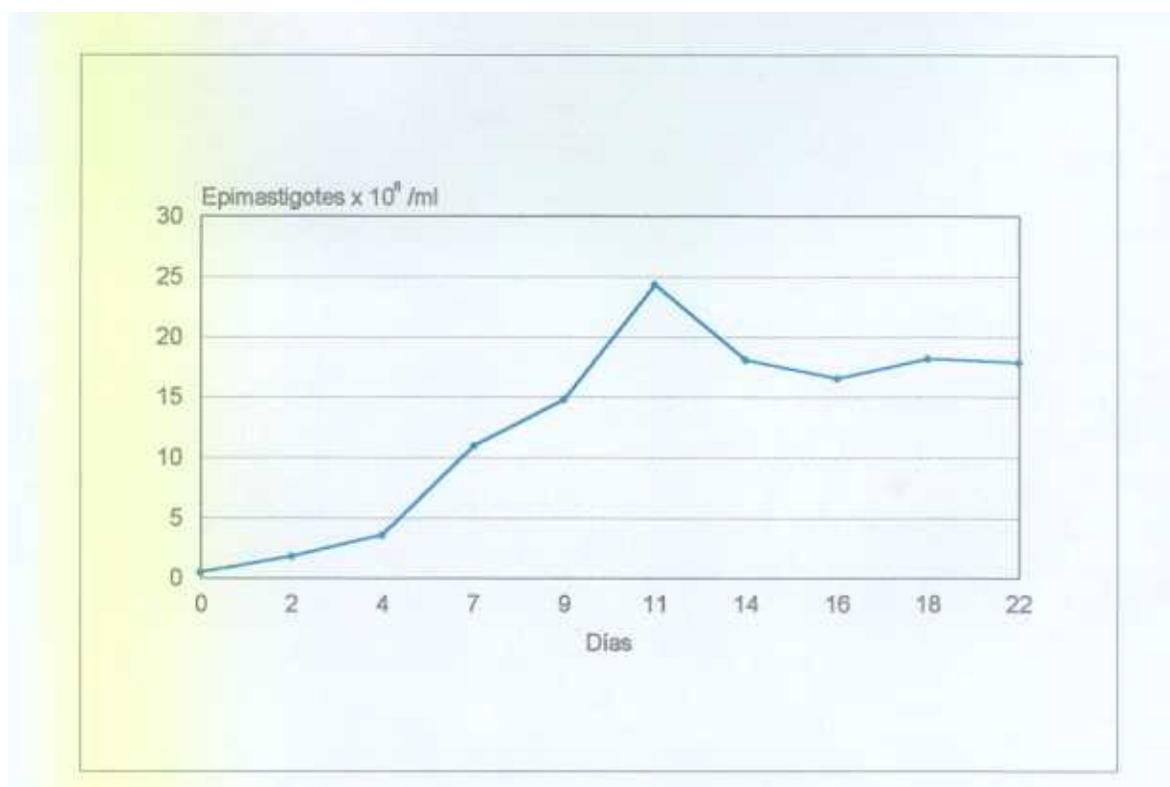
CEPAS			
Día	Bolivia	RAL	GM
0	500.000	500.000	500.000
2	1.657.500	632.500	2.025.000
4	3.812.500	2.700.000	6.375.000
7	12.600.000	13.800.000	14.150.000
9	21.900.000	15.800.000	16.950.000
11	27.300.000	20.850.000	19.450.000
14	21.950.000	14.900.000	20.300.000
16	19.600.000	11.550.000	22.500.000
18	20.350.000	9.650.000	18.900.000
22	19.900.000	10.160.000	16.850.000

CEPAS			
Día	MC	Y	Tulahuén
0	500.000	500.000	500.000
2	750.000	766.250	1.840.000
4	3.950.000	4.100.000	3.600.000
7	18.650.000	12.050.000	11.000.000
9	23.900.000	22.950.000	14.825.000
11	21.110.000	26.450.000	24.375.000
14	16.400.000	17.650.000	18.100.000
16	14.600.000	17.550.000	16.550.000
18	13.300.000	14.800.000	18.200.000
22	14.700.000	16.200.000	17.900.000

Se muestra el número de tripanosomas /ml a lo largo de los días de seguimiento del cultivo (hasta que este se estabiliza).

Gráfica 1. CURVA DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES. CEPA Bolivia.**Gráfica 2. CURVA DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES. CEPA RAL.**

Gráfica 3. CURVA DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES. CEPA GM.**Gráfica 4. CURVA DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES. CEPA MC.**

Gráfica 5. CURVA DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES. CEPA Y.**Gráfica 6. CURVA DE CRECIMIENTO DE EPIMASTIGOTES. CEPA Tulahuen**

1.1.2. METACICLOGENESIS.

Para evaluar la capacidad de transformación que presentan las distintas cepas, se utilizó un medio de cultivo diseñado a partir de componentes presentes en los insectos con el fin de producir formas tripomastigote metacíclicas; se trata del medio Grace ya descrito en el capítulo de Material y Métodos.

Partimos de cultivos axénicos de epimastigotes en medio LIT ya en fase estacionaria. Se recogen las formas vivas, suspendidas en el sobrenadante, mediante centrifugación y tras varios lavados se realiza recuento en hemocitómetro y se siembran 9×10^6 epimastigotes/ml en tubos con 5 ml de medio Grace, que pasan a incubarse en estufa a 28°C.

A continuación, durante el siguiente mes y con una periodicidad de 2-3 días, se determinó el número total de flagelados mediante recuento en hemocitómetro y la proporción de las distintas formas presentes en el cultivo, mediante análisis de muestras de éstos teñidas con Giemsa.

1.1.2.1. CAPACIDAD DE TRANSFORMACION.

En este caso, consideramos el número total de formas tripomastigote metacíclicas que aparecen en los cultivos a lo largo de los días de seguimiento de la experiencia (hasta que este número se estabiliza y empieza a decrecer) y su relación con el número total de flagelados que aparecen en los mismos. Estos valores numéricos se muestran en las tablas 4, 5, 6, 7 y 8 y aparecen representados en las gráficas 7, 8, 9, 10 y 11.

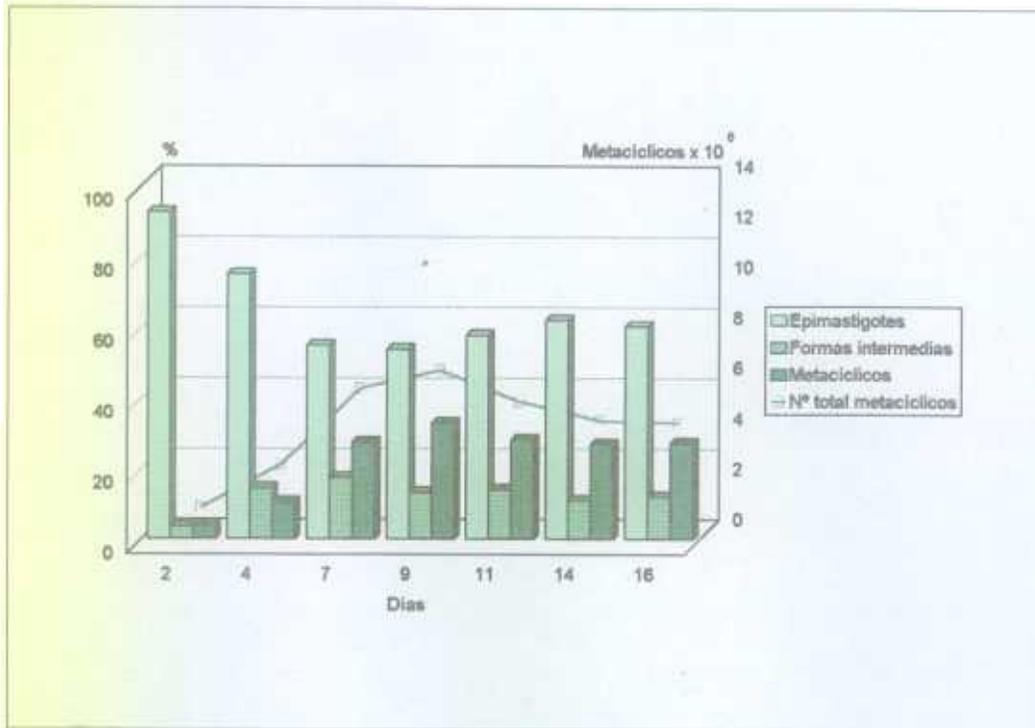
Tabla 4. CAPACIDAD DE TRANSFORMACIÓN. CEPA BOLIVIA.

Días	Nº total flagelados	Nº total formas metacíclicas	% metacíclicos
0	9.000.000	-	-
2	11.575.000	463.000	4
4	20.550.000	2.157.750	10.5
7	18.900.000	5.197.500	27.5
9	17.900.000	5.907.000	33
11	16.500.000	4.661.250	28.25
14	14.500.000	3.915.000	27
16	13.700.000	3.801.750	21.75

Tabla 5. CAPACIDAD DE TRANSFORMACIÓN. CEPA RAL.

Días	Nº total flagelados	Nº total formas metacíclicas	% metacíclicos
0	9.000.000	-	-
2	11.900.000	238.000	2
4	14.900.000	782.500	5.25
7	14.800.000	1.295.000	8.75
9	24.400.000	3.050.000	12.5
11	27.500.000	3.781.250	13.75
14	30.700.000	3.530.500	11.5
16	29.200.000	3.723.000	12.75

Gráfica 7. CAPACIDAD DE TRANSFORMACION. CEPA BOLIVIA.



Gráfica 8. CAPACIDAD DE TRANSFORMACION. CEPA RAL.

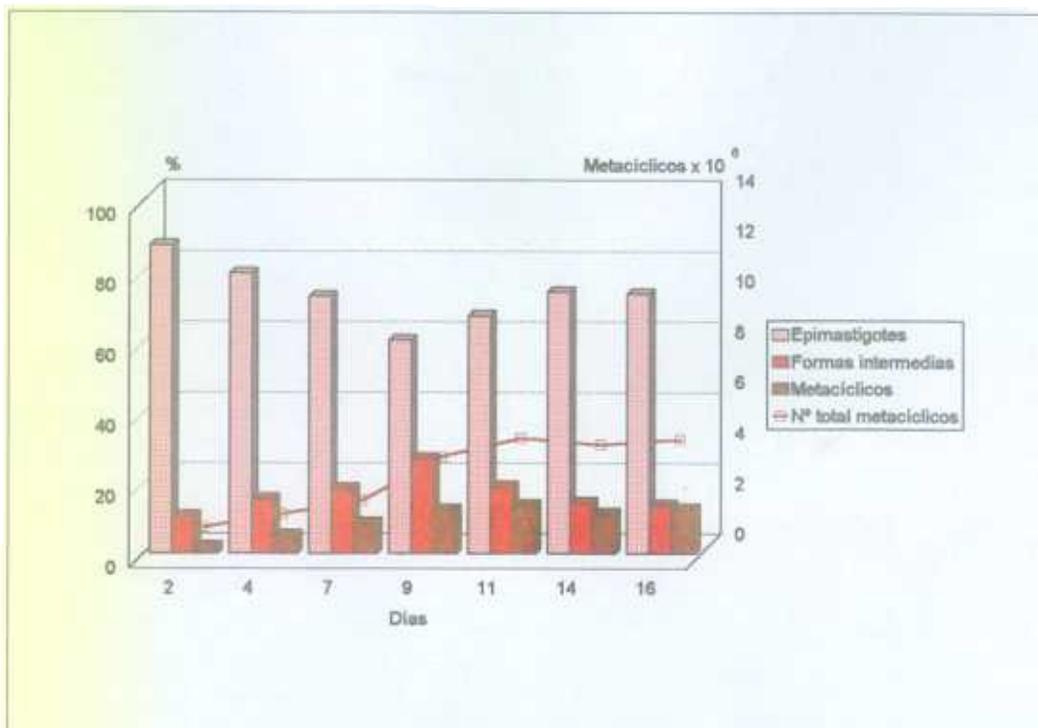


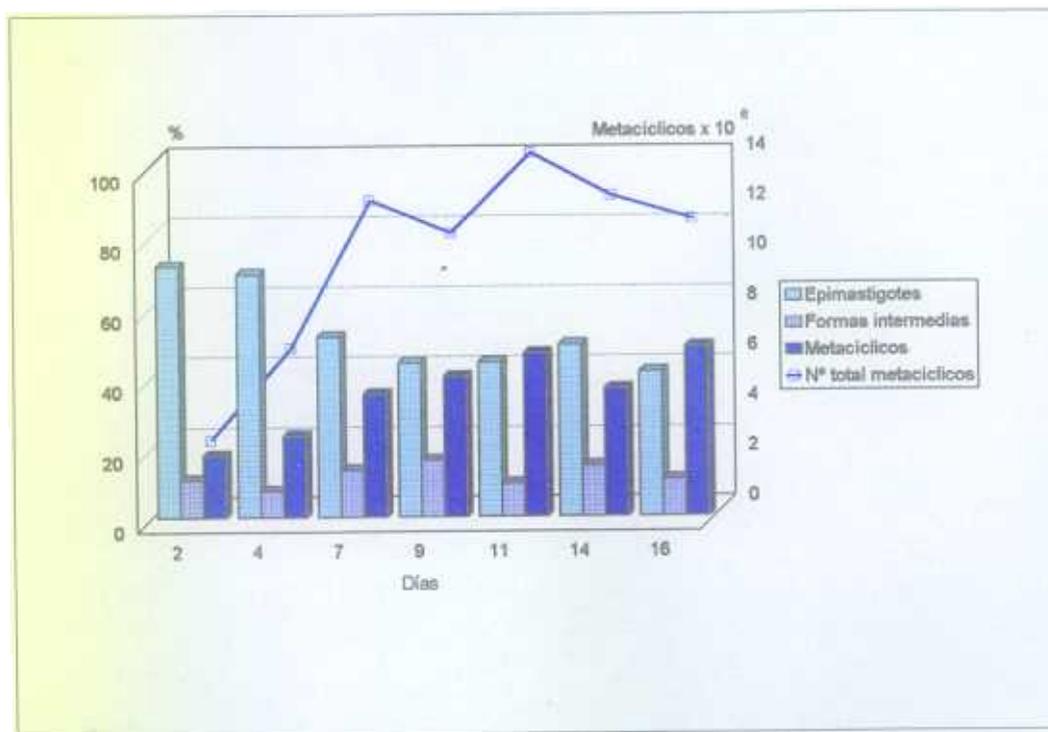
Tabla 6. CAPACIDAD DE TRANSFORMACIÓN. CEPA GM.

Días	Nº total flagelados	Nº total formas metacíclicas	% metacíclicos
0	9.000.000	-	-
2	12.950.000	2.298.625	17.75
4	25.550.000	5.940.375	23.25
7	33.750.000	11.812.500	35
9	26.300.000	10.520.000	40
11	29.500.000	13.717.500	46.5
14	32.900.000	12.008.500	36.5
16	22.900.000	11.049.250	48.25

Tabla 7. CAPACIDAD DE TRANSFORMACION. CEPA MC.

Días	Nº total flagelados	Nº total formas metacíclicas	% metacíclicos
0	9.000.000	-	-
2	11.400.000	199.000	1.75
4	17.300.000	432.000	2.5
7	34.000.000	1.190.000	3.5
9	29.700.000	1.856.000	6.25
11	29.500.000	1.770.000	6
14	31.400.000	2.590.000	8.25
16	26.800.000	2.010.000	7.5

Gráfica 9. CAPACIDAD DE TRANSFORMACION. CEPA GM.



Gráfica 10. CAPACIDAD DE TRANSFORMACION. CEPA MC.

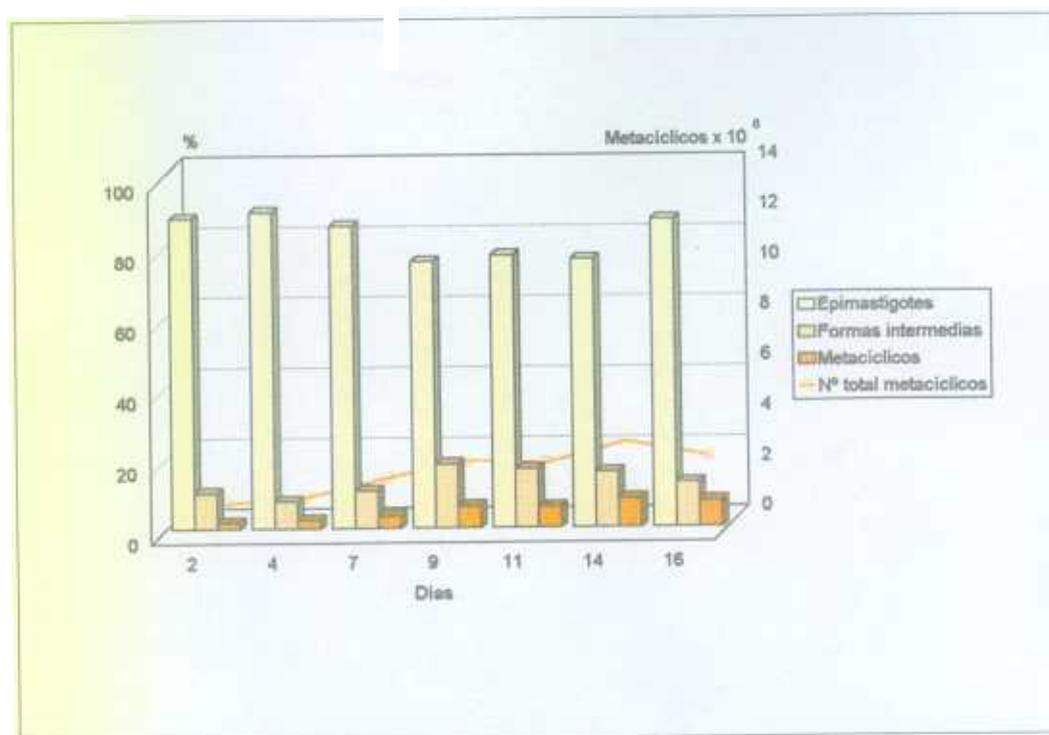
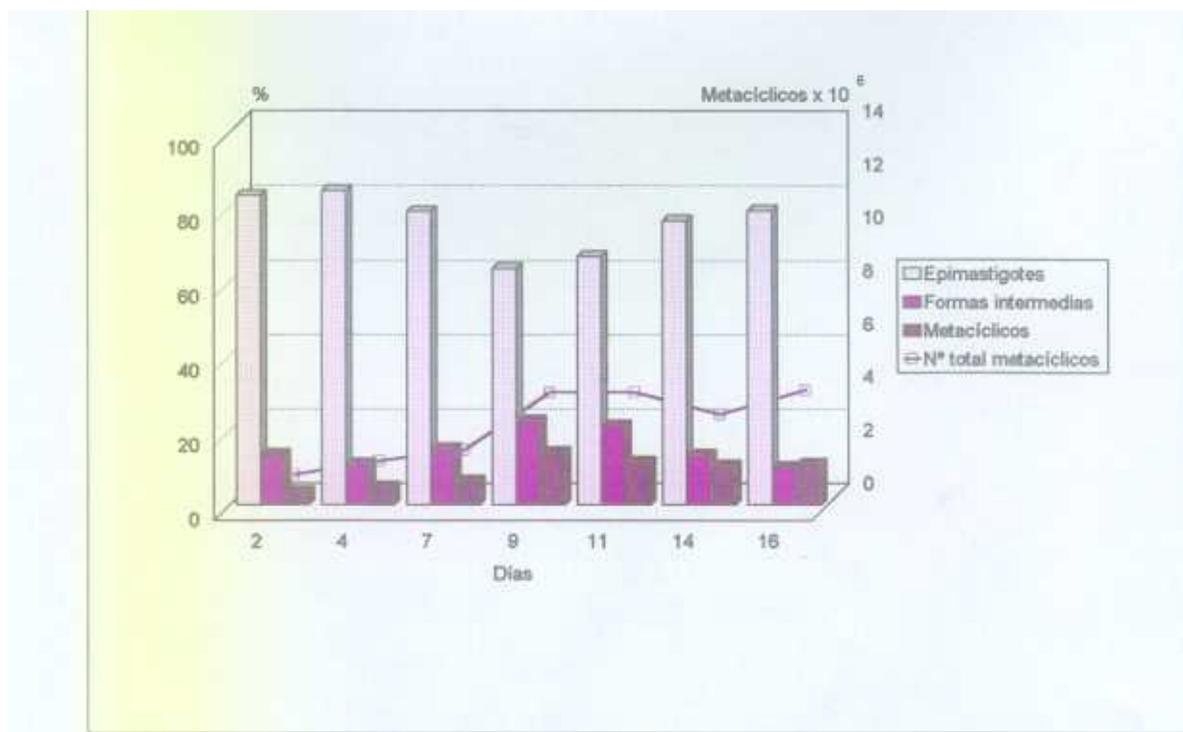


Tabla 8. CAPACIDAD DE TRANSFORMACION. CEPA Y.

Días	Nº total flagelados	Nº total formas metacíclicas	% metacíclicos
0	9.000.000	-	-
2	9.200.000	322.000	3.5
4	17.900.000	850.000	4.75
7	20.000.000	1.250.000	6.25
9	24.400.000	3.416.000	14
11	29.800.000	3.427.000	11.5
14	24.600.000	2.583.000	10.5
16	31.900.000	3.509.000	11

Gráfica 11. CAPACIDAD DE TRANSFORMACION. CEPA Y.



1.1.2.2. ESTUDIO DE LA DISTRIBUCION DE TIPOS MORFOLOGICOS EN MEDIO GRACE.

En este caso, utilizando los mismos cultivos de la experiencia anterior, nos centramos únicamente en el porcentaje de los distintos tipos morfológicos que aparecen en los cultivos de cada cepa a lo largo de los días de seguimiento de la experiencia, hasta que estas proporciones se estabilizan. Los resultados obtenidos son los que se muestran en la tabla 9 y aparecen representados en las gráficas 12 a 16.

Tabla 9. PORCENTAJES DE LAS DISTINTAS FORMAS EN CULTIVO.

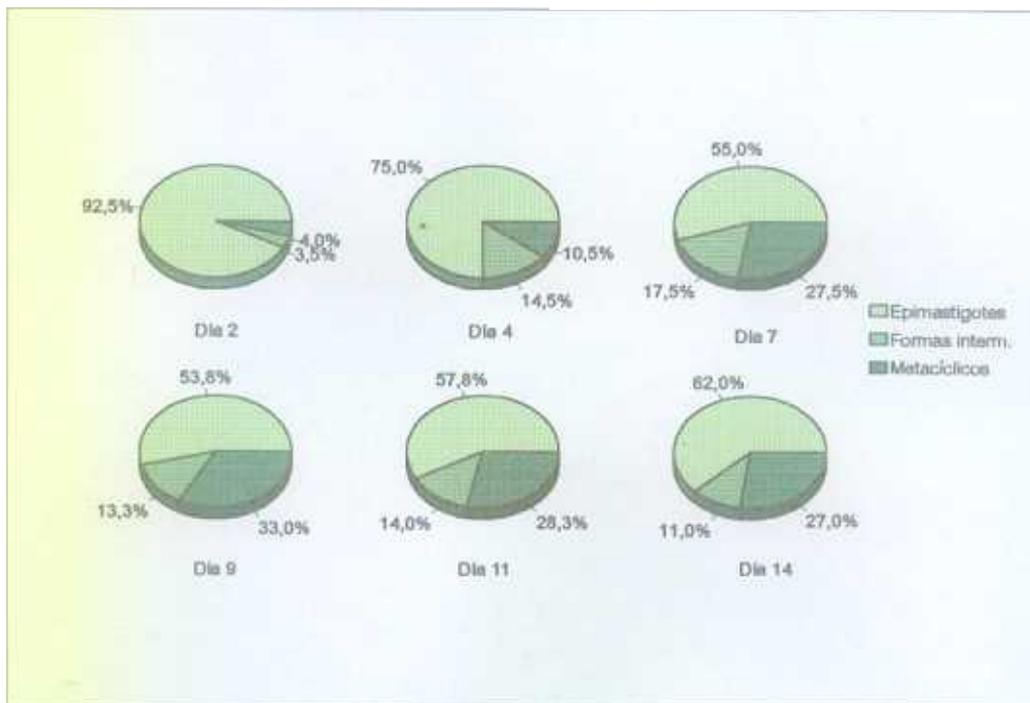
Día	Bolivia			RAL		
	EPI	INT	MET	EPI	INT	MET
2	92.5	3.5	4	87.25	10.75	2
4	75	14.5	10.5	79.25	15.5	8.75
7	55	17.5	27.5	72.75	18.5	8.75
9	53.75	13.25	33	60.5	27	12.5
11	57.75	14	28.25	67.25	19	13.75
14	62	11	27	74	14.5	11.5
16	60.25	12	27.75	73.5	13.75	12.75

Día	GM			MC		
	EPI	INT	MET	EPI	INT	MET
2	71.5	10.75	17.75	88	10.25	1.75
4	69.25	7.5	23.25	89.75	7.75	2.5
7	51.5	13.5	35	85.75	10.75	3.5
9	43.75	16.25	40	75.5	18.25	6.25
11	44	9.5	46.5	77.25	16.75	6
14	49	14.5	36.5	76	15.75	8.25
16	41.25	10.5	48.25	87.25	12.75	7.5

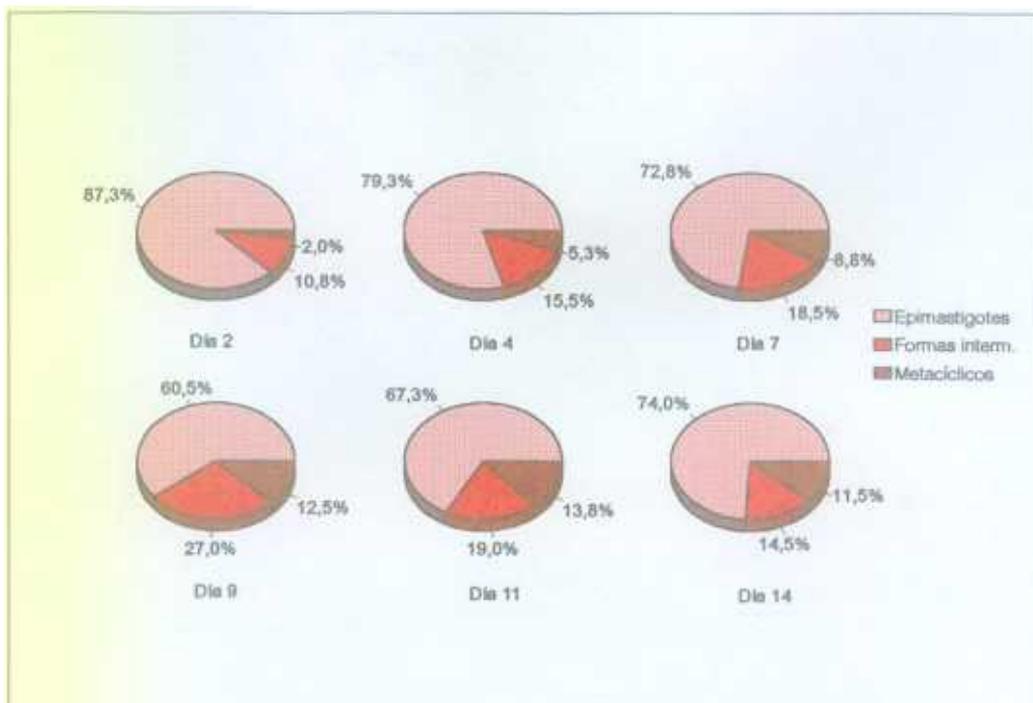
Día	Y		
	EPI	INT	MET
2	83	13.5	3.5
4	84.25	11	4.75
7	78.75	15	6.25
9	63.5	22.5	14
11	66.75	21.2	11.5
14	76.25	13.25	10.5
16	79	10	11

EPI: Epimastigotes. INT: Formas intermedias. MET: Tripomastigotes metacíclicos.

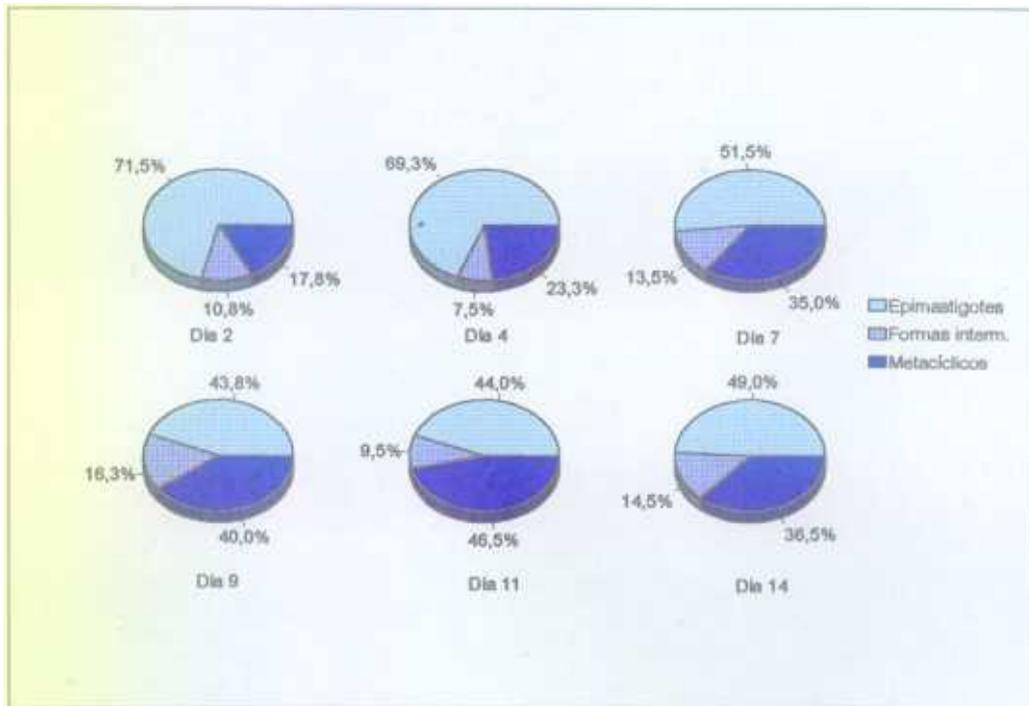
Gráfica 12. PORCENTAJES DE LAS DISTINTAS FORMAS EN CULTIVO. CEPA BOLIVIA.



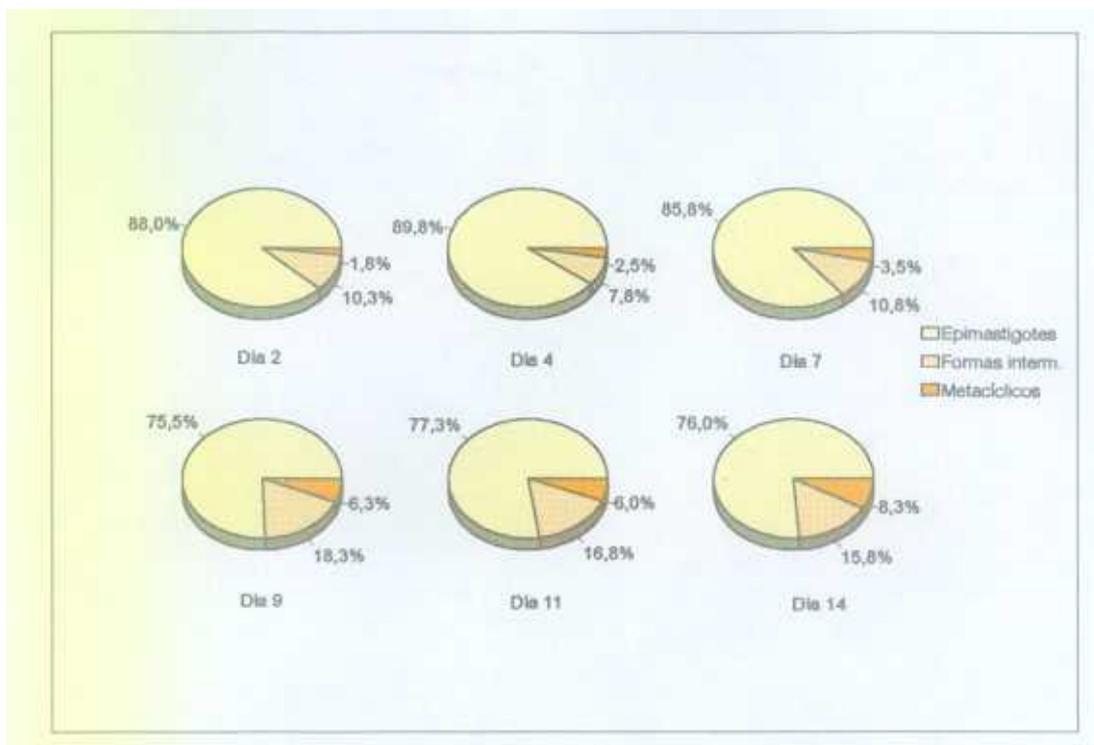
Gráfica 13. PORCENTAJE DE LAS DISTINTAS FORMAS EN CULTIVO. CEPA RAL.



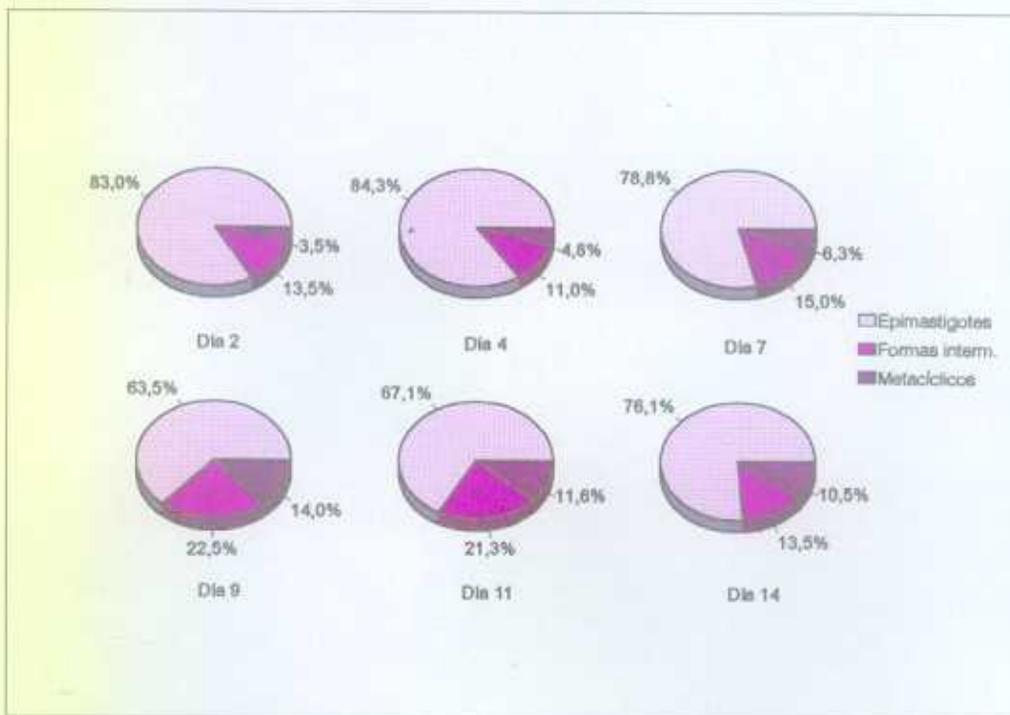
Gráfica 14. PORCENTAJES DE LAS DISTINTAS FORMAS EN CULTIVO. CEPA GM.



Gráfica 15. PORCENTAJE DE LAS DISTINTAS FORMAS EN CULTIVO. CEPA MC.



Gráfica 16. PORCENTAJES DE LAS DISTINTAS FORMAS EN CULTIVO. CEPA Y.



**CAPACIDAD DE INVASION Y DINAMICA DE LA INFECCION CELULAR.
CEPA BOLIVIA.**

Tabla 10. FIBROBLASTOS. Línea Vero

Porcentaje de células infectadas 24 horas p.i.: 29,7%

Días p.i.	Número de amastigotes por célula			X
	<5	5<X<50	>50	
1	100%	-	-	1,5
2	96,5%	3,5%	-	1,8
3	75,7%	24,3%	-	4,3
4	47,1%	47,1%	5,8%	11,8
5	8,8%	61,8%	29,4%	43,3
6	38,9%	13,9%	47,2%	82,5

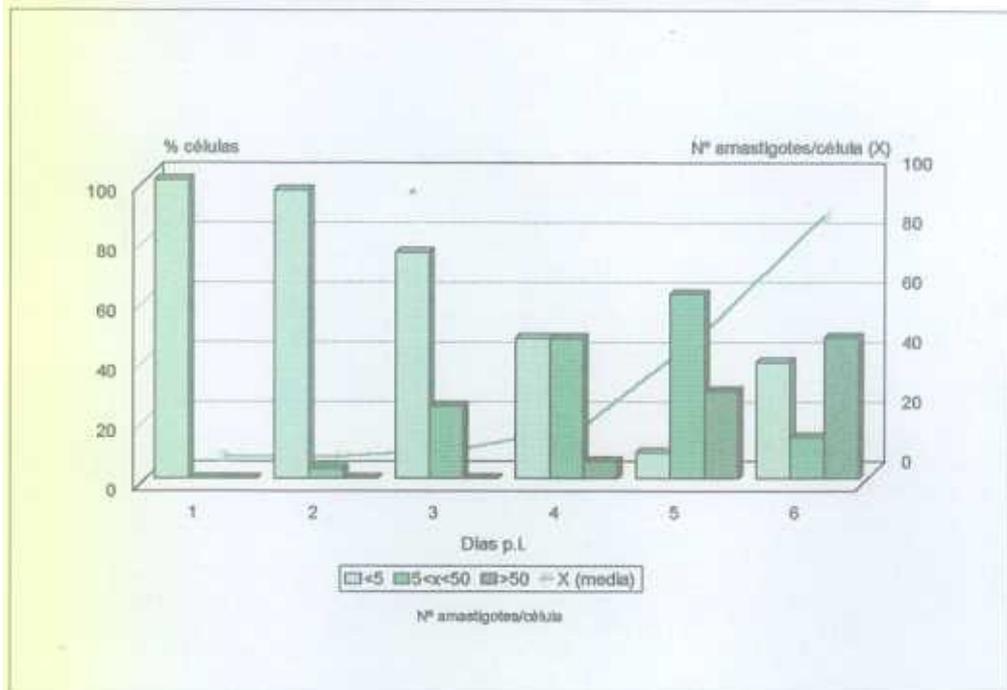
Tabla 11. MACROFAGOS. Línea J774.

Porcentaje de células infectadas 24 horas p.i.: 25,9%

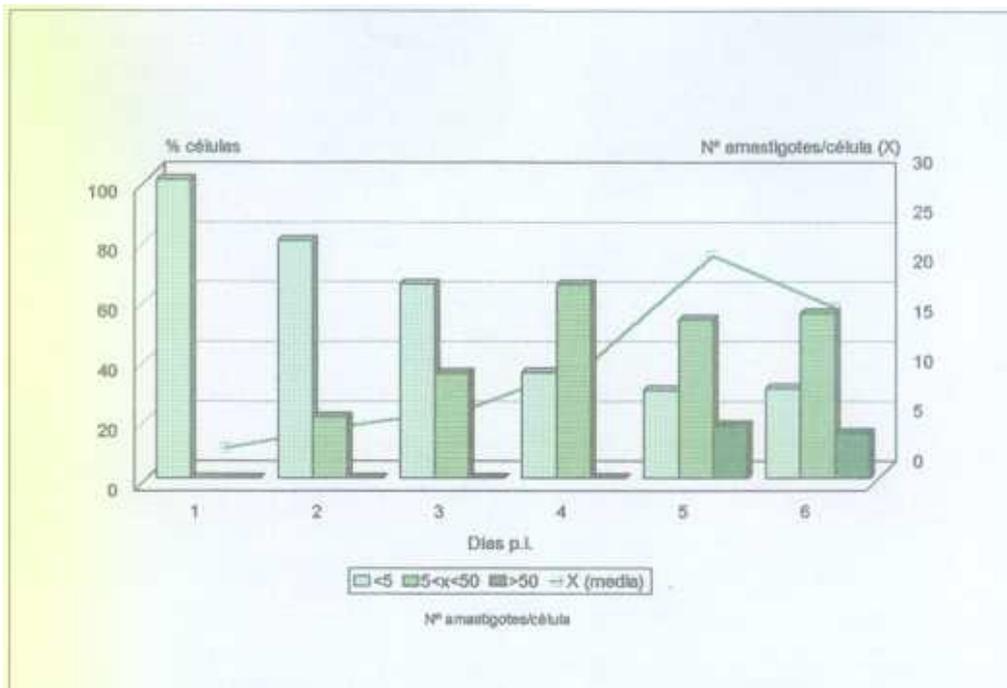
Días p.i.	Número de amastigotes por célula			X
	<5	5<X<50	>50	
1	100%	-	-	1,3
2	79,5%	20,5%	-	3,5
3	64,9%	35,1%	-	5,2
4	35,3%	64,7%	-	9,8
5	29,4%	52,9%	17,7%	20,6
6	30%	55%	15%	15,4

DINAMICA DE LA INFECCION CELULAR *IN VITRO*. CEPA BOLIVIA.

Gráfica 17. INFECCION SOBRE FIBROBLASTOS (LINEA VERO).



Gráfica 18. INFECCION SOBRE MACROFAGOS (LINEA J774).



**CAPACIDAD DE INVASION Y DINAMICA DE LA INFECCION CELULAR.
CEPA RAL.**

Tabla 12. FIBROBLASTOS. Línea Vero

Porcentaje de células infectadas 24 horas p.i.: 16,4%

Días p.i.	Número de amastigotes por célula			X
	<5	5<X<50	>50	
1	100%	-	-	1,2
2	95,4%	4,5%	-	2,1
3	75%	25%	-	3,5
4	34,8%	65,2%	-	7,1
5	13,8%	86,2%	-	12,2
6	61,5%	7,7%	30,8%	60,8

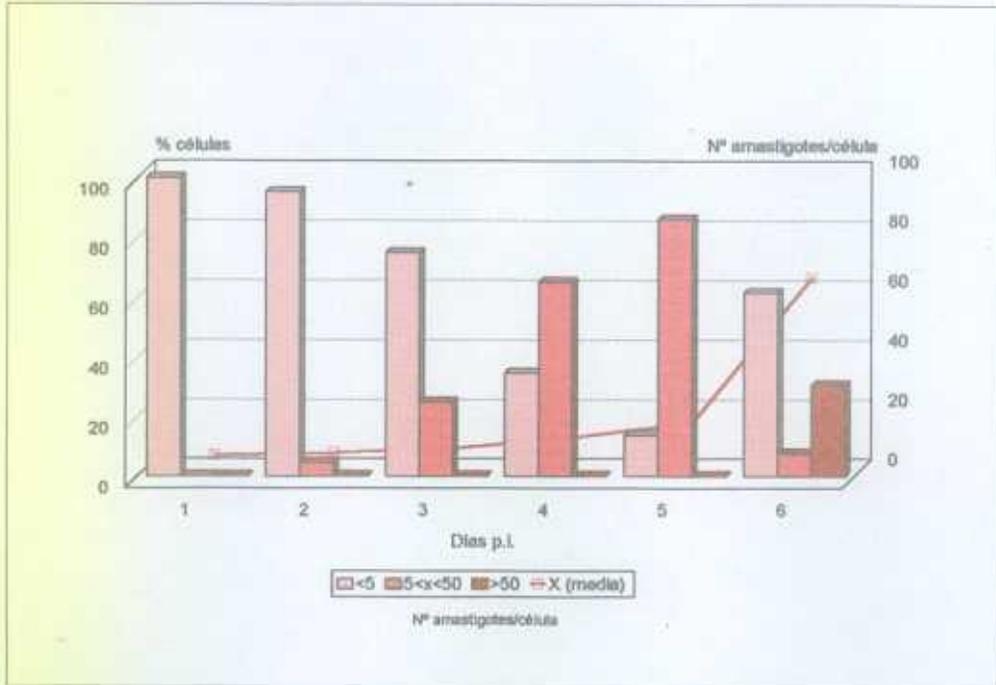
Tabla 13. MACROFAGOS. Línea J774.

Porcentaje de células infectadas 24 horas p.i.: 26.2%

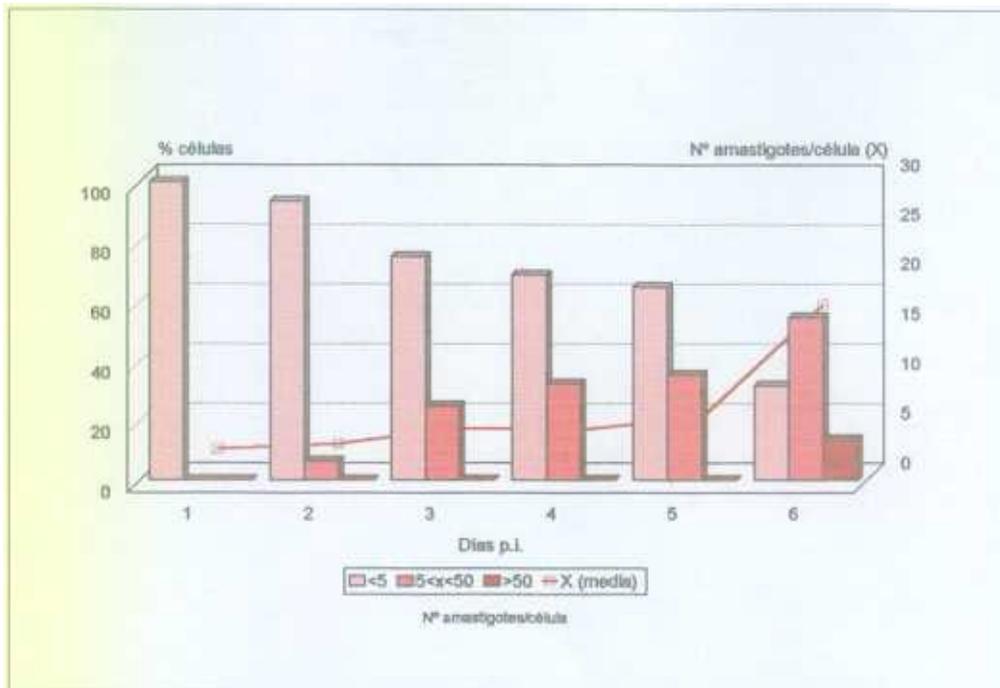
Días p.i.	Número de amastigotes por célula			X
	<5	5<X<50	>50	
1	100%	-	-	1,4
2	93,7%	6,3%	-	1,9
3	75%	25%	-	3,5
4	68,7%	31,3%	-	3,3
5	64,7%	35,3%	-	4,6
6	31,8%	54,5%	13,6%	15,9

DINAMICA DE LA INFECCION CELULAR *IN VITRO*. CEPA RAL

Gráfica 19. INFECCION SOBRE FIBROBLASTOS (LINEA VERO).



Gráfica 20. INFECCION SOBRE MACROFAGOS (LINEA J774).



**CAPACIDAD DE INVASION Y DINAMICA DE LA INFECCION CELULAR.
CEPA GM.**

Tabla 14. FIBROBLASTOS. Línea Vero

Porcentaje de células infectadas 24 horas p.i.: 28,6%

Días p.i.	Número de amastigotes por célula			X
	<5	5<X<50	>50	
1	100%	-	-	1,3
2	97,1%	2,9%	-	1,5
3	77,1%	22,9%	-	4,6
4	31,4%	62,9%	5,7%	11,7
5	12,5%	65,6%	21,9%	32,1
6	35,3%	17,6%	47,1%	70,1

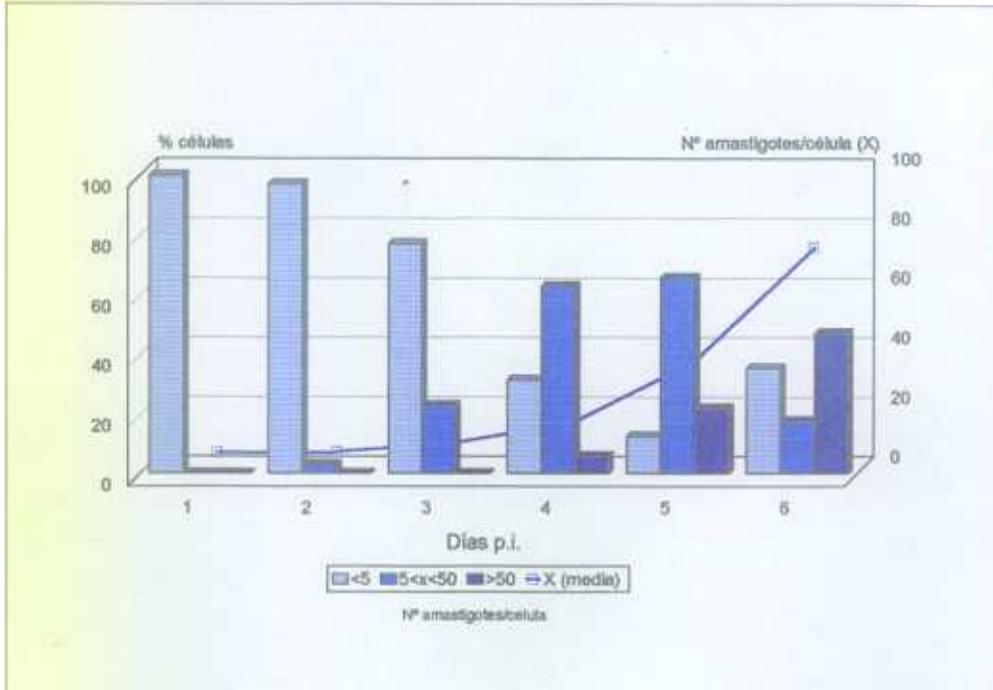
Tabla 15. MACROFAGOS. Línea J774.

Porcentaje de células infectadas 24 horas p.i.: 44,1%

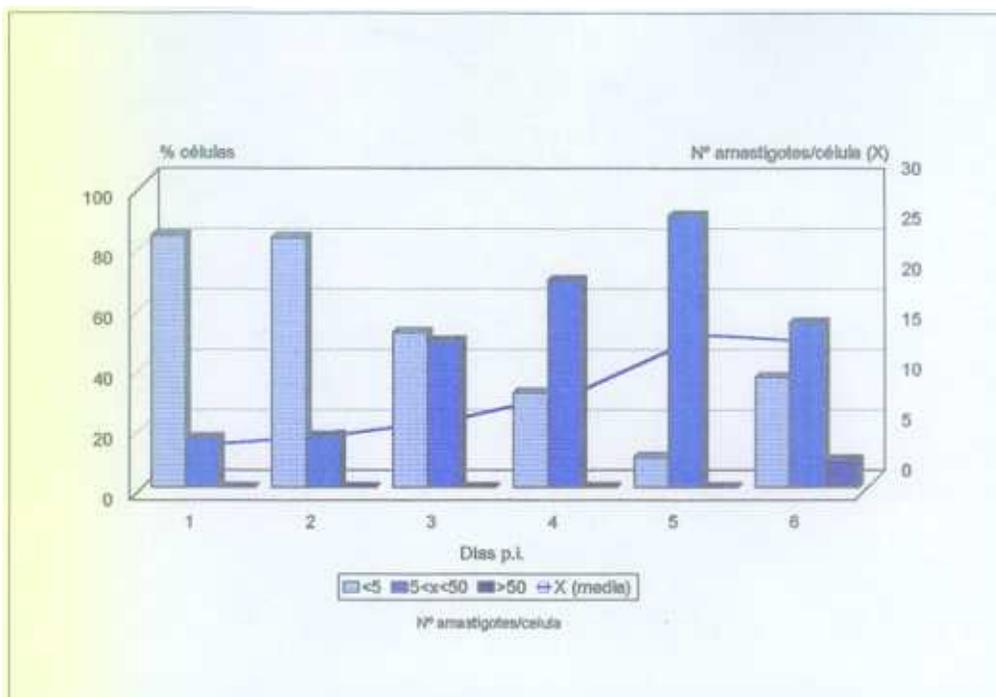
Días p.i.	Número de amastigotes por célula			X
	<5	5<X<50	>50	
1	83,5%	16,4%	-	2,6
2	82,9%	17,1%	-	3,5
3	51,4%	48,6%	-	5,2
4	31,4%	68,6%	-	7,9
5	10%	90%	-	13,4
6	34,4%	54,5%	9,1%	12,7

DINAMICA DE LA INFECCION CELULAR *IN VITRO*. CEPA GM.

Gráfica 21. INFECCION SOBRE FIBROBLASTOS (LINEA VERO).



Gráfica 22. INFECCION SOBRE MACROFAGOS (LINEA J774).



**CAPACIDAD DE INVASION Y DINAMICA DE LA INFECCION CELULAR.
CEPA MC.**

Tabla 16. FIBROBLASTOS. Línea Vero

Porcentaje de células infectadas 24 horas p.i.: 15%

Días p.i.	Número de amastigotes por célula			
	<5	5<X<50	>50	X
1	100%	-	-	1,4
2	90,6%	9,4%	-	1,9
3	34,4%	64,6%	-	6,6
4	23,3%	73,3%	3,4%	6,9
5	27,8%	55,5%	16,7%	25,1
6	52,9%	11,8%	35,3%	28,4

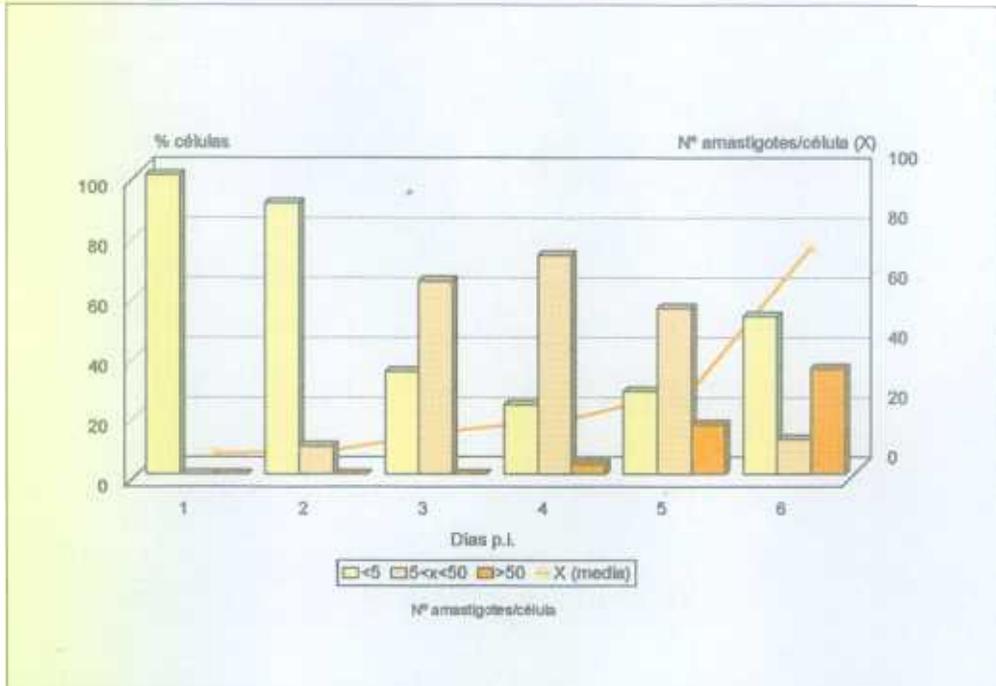
Tabla 17. MACROFAGOS. Línea J774.

Porcentaje de células infectadas 24 horas p.i.: 12,5%

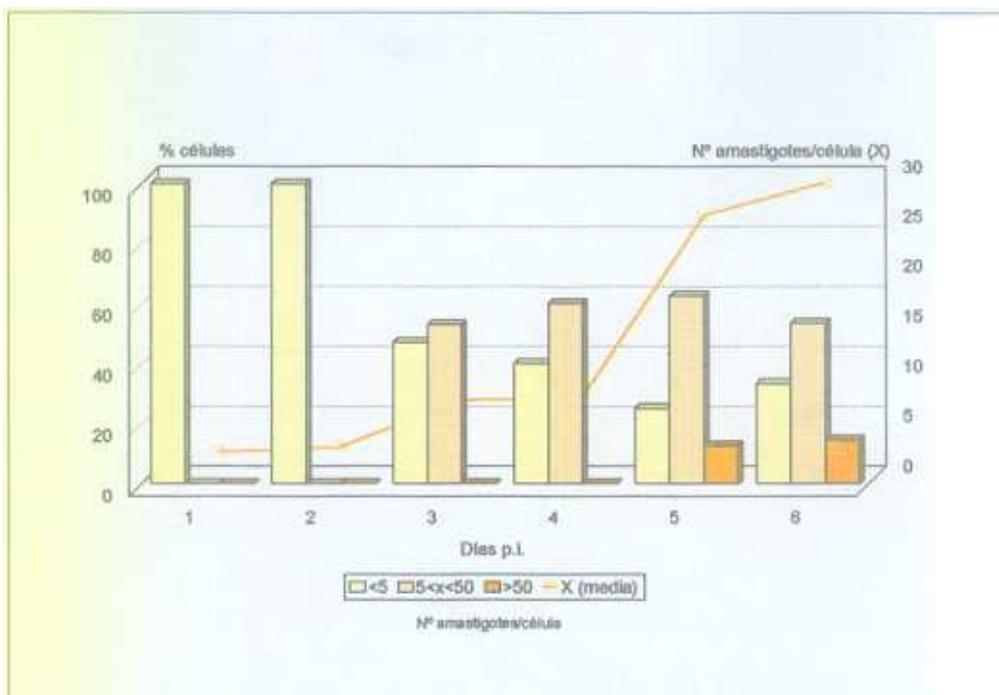
Días p.i.	Número de amastigotes por célula			
	<5	5<X<50	>50	X
1	100%	-	-	1,4
2	100%	-	-	1,9
3	47,1%	52,9%	-	6,6
4	40%	60%	-	6,9
5	25%	62,5%	12,5%	25,1
6	33,3%	53,4%	9,1%	28,4

DINAMICA DE LA INFECCION CELULAR *IN VITRO*. CEPA MC.

Gráfica 23. INFECCION SOBRE FIBROBLASTOS (LINEA VERO).



Gráfica 24. INFECCION SOBRE MACROFAGOS (LINEA J774).



**CAPACIDAD DE INVASION Y DINAMICA DE LA INFECCION CELULAR.
CEPA Y.**

Tabla 18. FIBROBLASTOS. Línea Vero

Porcentaje de células infectadas 24 horas p.i.: 16,7%

Días p.i.	Número de amastigotes por célula			
	<5	5<X<50	>50	X
1	100%	-	-	1,3
2	100%	-	-	1,7
3	71,4%	28,6%	-	4,2
4	40%	60%	-	6,8
5	4,5%	77,3%	18,2%	25,3
6	55,6%	12,2%	32,2%	40

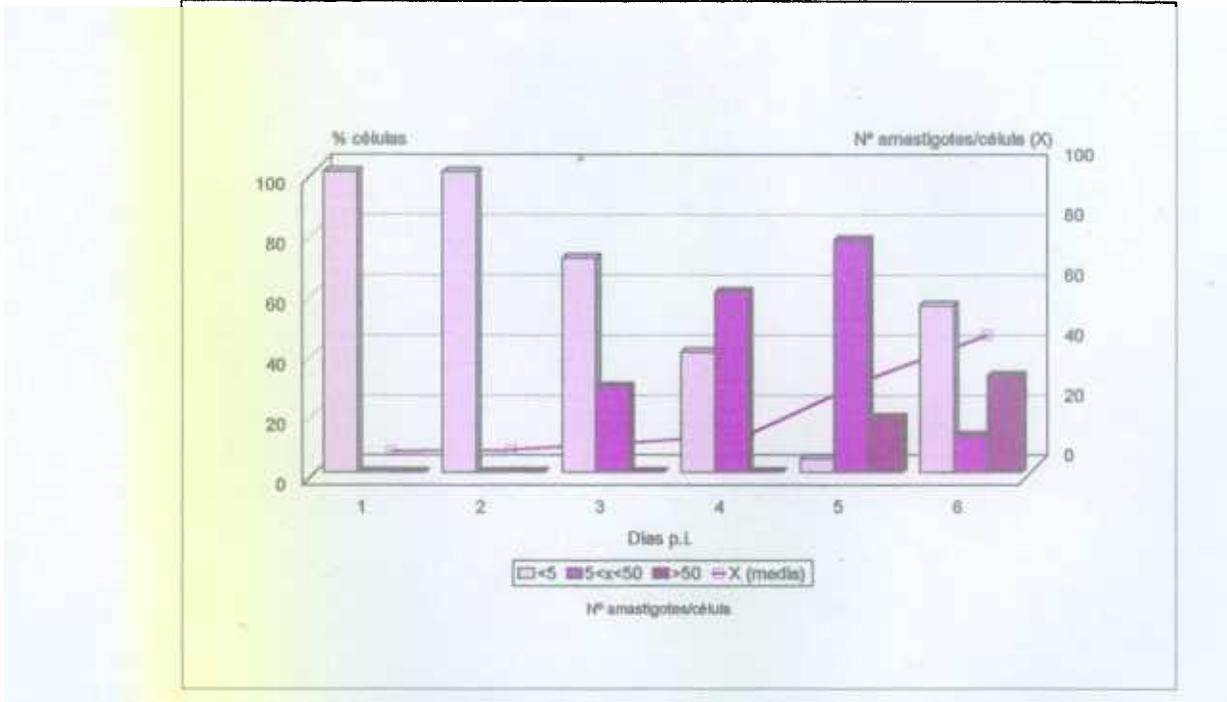
Tabla 19. MACROFAGOS. Línea J774.

Porcentaje de células infectadas 24 horas p.i.: 14,7%

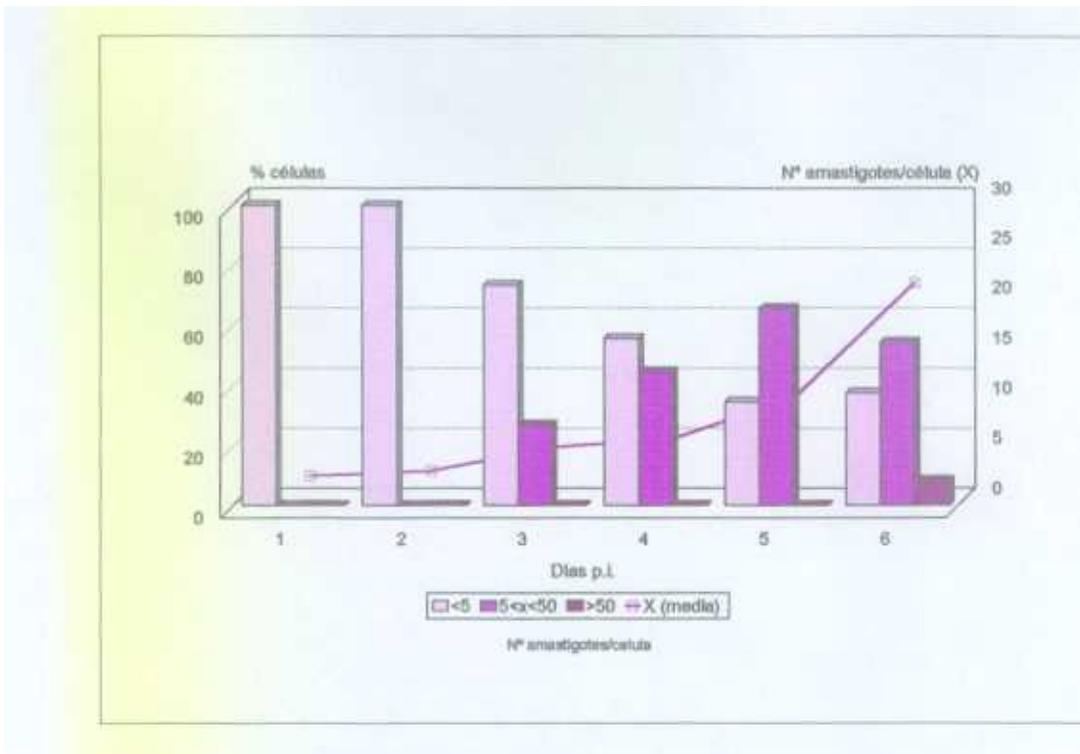
Días p.i.	Número de amastigotes por célula			
	<5	5<X<50	>50	X
1	100%	-	-	1,2
2	100%	-	-	1,7
3	73,1%	26,9%	-	4,1
4	55,6%	44,4%	-	4,9
5	34,5%	65,5%	-	9
6	37,5%	54,2%	8,3%	20,5

DINAMICA DE LA INFECCION CELULAR *IN VITRO*. CEPA Y.

Gráfica 25. INFECCION SOBRE FIBROBLASTOS (LINEA VERO).



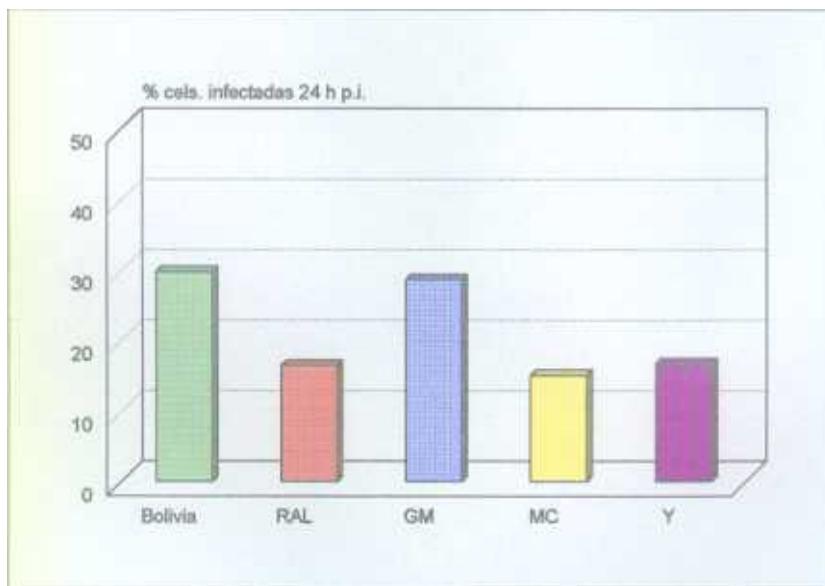
Gráfica 26. INFECCION SOBRE MACROFAGOS (LINEA J774).



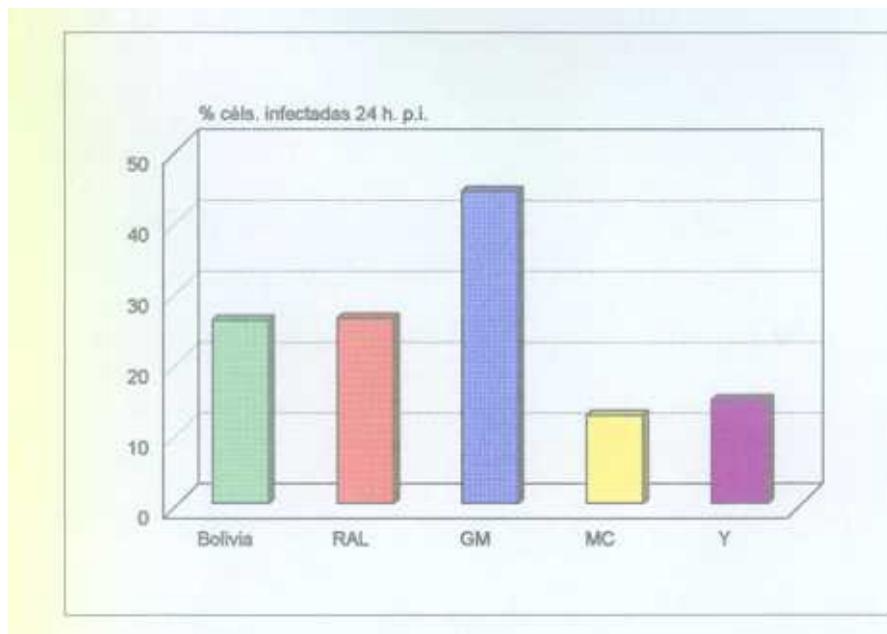
1.1.3.2. INFECCION DIFERENCIAL EN DISTINTOS TIPOS CELULARES (FIBROBLASTOS Y MACROFAGOS) DE LAS DISTINTAS CEPAS.

En este caso, se representa el porcentaje de células parasitadas (fibroblastos en gráfica 27 y macrófagos en gráfica 28) al día siguiente de la infección para cada una de las cepas sometidas a estudio.

Gráfica 27. FIBROBLASTOS. LINEA VERO.



Gráfica 28. MACROFAGOS. LINEA J774.



1.1.4. SENSIBILIDAD A LOS FARMACOS DE REFERENCIA DE LAS DISTINTAS CEPAS.

Para averiguar si existen diferencias en la sensibilidad que presentan las cepas sometidas a estudio frente a los fármacos utilizados como referencia, se empleó la técnica de cribado contra epimastigotes descrita en el apartado 6.1.1 del capítulo de material y métodos.

Fueron ensayadas 5 concentraciones de cada producto; desde 100 $\mu\text{g/ml}$ y posteriores diluciones 1/10 hasta 0,01 $\mu\text{g/ml}$. Los resultados se expresan en forma de porcentaje de crecimiento y porcentaje de reducción, ya que lo que se pretende es detectar diferencias entre las cepas en su crecimiento en presencia de los fármacos.

Estos resultados aparecen reflejados, para cada cepa, en las tablas 20 a 37.

1.1.4.1. SENSIBILIDAD A NIFURTIMOX.

Tabla 20. SENSIBILIDAD A NIFURTIMOX DE LA CEPA BOLIVIA.

<u>Conc. $\mu\text{g/ml}$</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	1950	2.74		
100	37.5	0.05	0	98.18
10	175	0.25	0	90.88
1	1612.5	2.26	82.48	0
0.1	1825	2.56	93.43	0
0.01	1950	2.74	100	0

Tabla 21. SENSIBILIDAD A NIFURTIMOX DE LA CEPA RAL.

<u>Conc. $\mu\text{g/ml}$</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	5600	2.80		
100	0	0	0	100
10	975	0.49	0	82.5
1	4600	2.30	82.14	0
0.1	5800	2.90	103.57	0
0.01	6650	3.32	118.57	0

Tabla 22. SENSIBILIDAD A NIFURTIMOX DE LA CEPA GM.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	2100	2.56		
100	41	0.05	0	98.05
10	220	0.27	0	89.45
1	1700	2.07	80.86	0
0.1	1925	2.35	91.79	0
0.01	2100	2.56	100	0

Tabla 23. SENSIBILIDAD A NIFURTIMOX DE LA CEPA MC.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	11875	5.65		
100	100	0.05	0	99.12
10	1425	0.68	0	87.96
1	10352	4.93	87.26	0
0.1	10900	5.19	91.86	0
0.01	12275	5.84	103.36	0

Tabla 24. SENSIBILIDAD A NIFURTIMOX DE LA CEPA Y.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	4500	1.98		
100	0	0	0	100
10	325	0.14	0	92.93
1	2625	1.15	58.08	0
0.1	3700	1.63	82.32	0
0.01	4350	1.91	96.46	0

Tabla 25. SENSIBILIDAD A NIFURTIMOX DE LA CEPA TULAHUEN.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	2350	1.57		
100	50	0.03	0	98.09
10	100	0.06	0	96.18
1	1750	1.17	74.52	0
0.1	2375	1.58	100.64	0
0.01	2200	1.47	93.63	0

1.1.4.2. SENSIBILIDAD A BENZONIDAZOL.**Tabla 26. SENSIBILIDAD A BENZONIDAZOL DE LA CEPA BOLIVIA.**

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	2050	2.88		
100	312.5	0.44	0	84.72
10	1250	1.75	60.74	0
1	1587.5	2.23	77.43	0
0.1	1725	2.42	84.03	0
0.01	1875	2.63	91.32	0

Tabla 27. SENSIBILIDAD A BENZONIDAZOL DE LA CEPA RAL.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	6150	3.07		
100	0	0	0	100
10	3875	1.94	63.19	0
1	6225	3.11	101.30	0
0.1	7400	3.70	120.52	0
0.01	6900	3.45	112.38	0

Tabla 28. SENSIBILIDAD A BENZONIDAZOL DE LA CEPA GM.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	2300	2.80		
100	420	0.51	0	81.78
10	1500	1.83	65.36	0
1	1725	2.10	75	0
0.1	1975	2.40	85.71	0
0.01	2200	2.68	95.71	0

Tabla 29. SENSIBILIDAD A BENZONIDAZOL DE LA CEPA MC.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	11250	5.36		
100	325	0.15	0	97.20
10	4750	2.26	42.16	0
1	7925	3.77	70.34	0
0.1	9675	4.61	80.01	0
0.01	10650	5.07	94.59	0

Tabla 30. SENSIBILIDAD A BENZONIDAZOL DE LA CEPA Y.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	4050	1.78		
100	0	0	0	100
10	2100	0.92	0	48.31
1	3600	1.58	88.76	0
0.1	4950	2.18	122.47	0
0.01	4875	2.14	120.22	0

Tabla 31. SENSIBILIDAD A BENZONIDAZOL DE LA CEPA TULAHUEN.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	2200	1.47		
100	50	0.03	0	97.96
10	550	0.36	0	75.51
1	1625	1.08	73.47	0
0.1	2062.5	1.37	93.19	0
0.01	3050	2.03	138.09	0

1.1.4.3. SENSIBILIDAD A VIOLETA DE GENCIANA.**Tabla 32. SENSIBILIDAD A VIOLETA DE GENCIANA DE LA CEPA BOLIVIA.**

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	2225	3.12		
100	0	0	0	100
10	625	0.88	0	71.79
1	900	1.26	40.38	0
0.1	2162.5	3.04	97.44	0
0.01	2262.5	3.17	101.6	0

Tabla 33. SENSIBILIDAD A VIOLETA DE GENCIANA DE LA CEPA RAL.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	7400	3.70		
100	0	0	0	100
10	1825	0.91	0	75.41
1	2400	1.20	32.43	0
0.1	3975	1.99	53.78	0
0.01	6450	3.22	87.03	0

Tabla 34. SENSIBILIDAD A VIOLETA DE GENCIANA DE LA CEPA GM.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	2450	2.99		
100	0	0	0	100
10	810	0.98	0	67.22
1	980	1.19	39.79	0
0.1	2260	2.76	92.30	0
0.01	2500	3.05	102.01	0

Tabla 35. SENSIBILIDAD A VIOLETA DE GENCIANA DE LA CEPA MC.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	9625	4.58		
100	0	0	0	100
10	1125	0.54	0	88.21
1	3075	1.46	31.88	0
0.1	5450	2.60	56.77	0
0.01	7825	3.73	81.44	0

Tabla 36. SENSIBILIDAD A VIOLETA DE GENCIANA DE LA CEPA Y.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crec.</u>	<u>% Reducción</u>
Control	4150	1.82		
100	0	0	0	100
10	725	0.32	0	82.42
1	1000	0.44	0	75.82
0.1	2950	1.30	71.43	0
0.01	3600	1.58	86.81	0

Tabla 37. SENSIBILIDAD A VIOLETA DE GENCIANA DE LA CEPA TULAHUEN.

<u>Conc. µg/ml</u>	<u>Crec. x 1000</u>	<u>Indice de crec.</u>	<u>% Crecimiento</u>	<u>% Reduc.</u>
Control	2200	1.47		
100	0	0	0	100
10	537.5	0.36	0	75.51
1	850	0.57	0	61.22
0.1	1525	1.02	69.39	0
0.01	2450	1.63	110.88	0

1.2. PRUEBAS BIOQUIMICAS.

1.2.1. COMPARACION DE PATRONES PROTEICOS.

Para determinar posibles diferencias en los patrones de proteínas totales de las distintas cepas, las muestras procedentes de la extracción fueron sometidas a electroforésis en gel de acrilamida-bisacrilamida en gradiente 5-20%, tal y como se describe en los apartados 7.1 y 7.2 de Material y Métodos.

Además de las muestras de *T. cruzi*, se procesó otra de *Leishmania infantum* en las mismas condiciones para tener constancia de las posibles diferencias interespecíficas.

Los resultados obtenidos aparecen reflejados en la figura XVI y, más elaborados, en el apartado 1.3 dedicado al tratamiento estadístico.

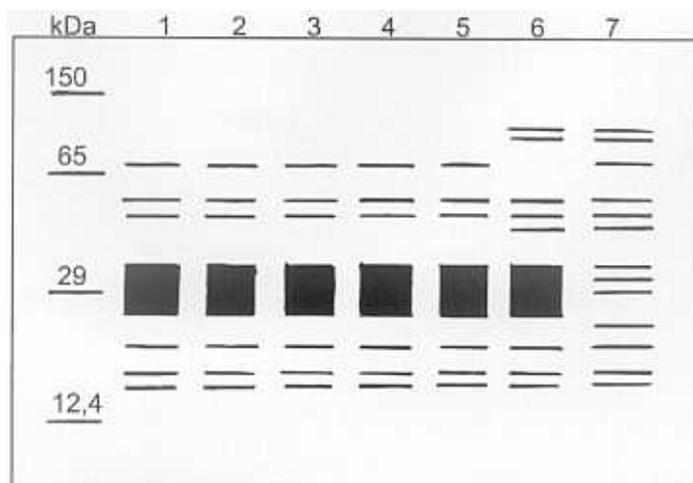
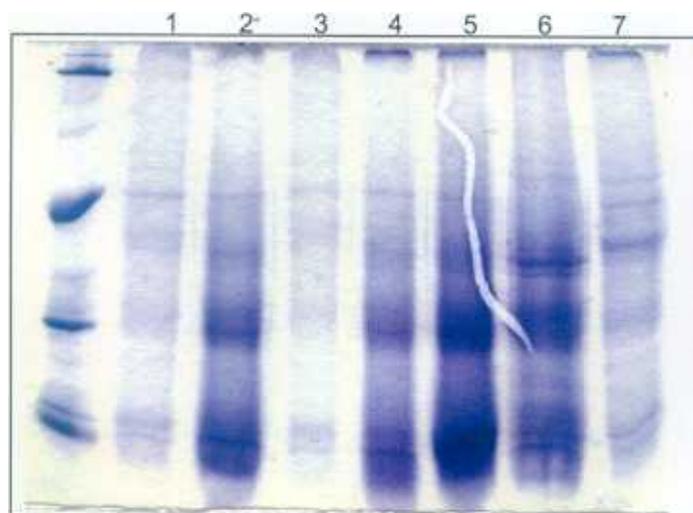
1.2.2. ESTUDIOS DE ADN. COMPARACION DE PATRONES DE AMPLIFICACION.

Con el fin de estudiar los patrones de amplificación de las distintas cepas, fueron realizadas las correspondientes reacciones empleando 3 iniciadores distintos elegidos de forma arbitraria.

Para disponer de algún patrón de referencia, muestras de organismos distintos aunque cercanos a *Trypanosoma (Leishmania infantum)*, y sin aparente proximidad (*Trichinella spiralis*), fueron sometidas a los mismos ensayos siguiendo los protocolos descritos en los apartados 7.3, 7.4 y 7.5 de Material y Métodos.

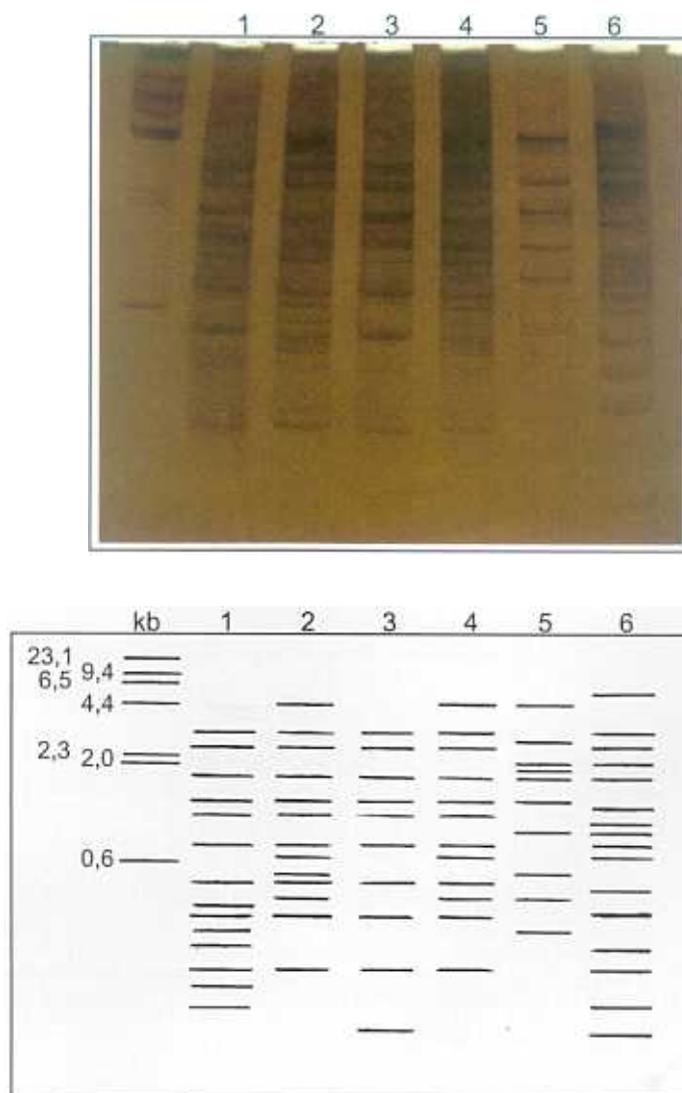
Los resultados obtenidos aparecen reflejados en las figuras XVII, XVIII y XIX y, más elaborados, en el apartado 1.3 dedicado al tratamiento estadístico.

Fig. XVI. Gel de poliacrilamida en gradiente 5-20%, teñido con azul de Coomasie, de extractos de proteínas totales de las distintas cepas sometidas a estudio.



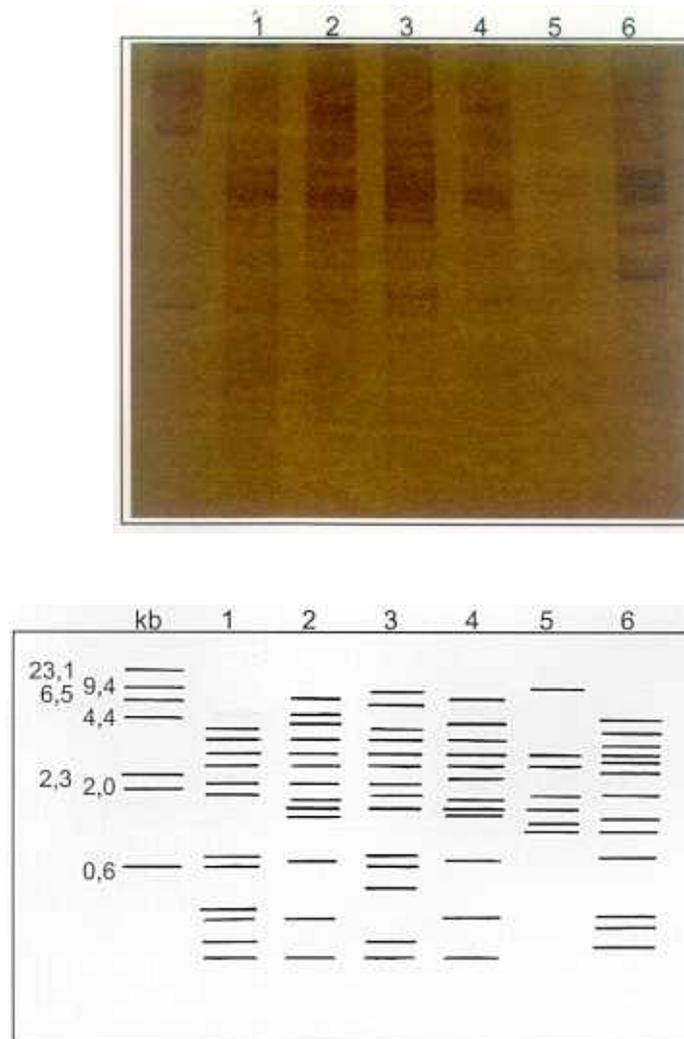
Carriles: 1- cepa Bolivia; 2- cepa RAL; 3- cepa GM;
4- cepa MC; 5- cepa Y; 6- cepa Tulahuen;
7- *Leishmania infantum*.

Fig. XVII. Gel de poliacrilamida teñido con plata, de los productos de amplificación obtenidos empleando el iniciador Z3.



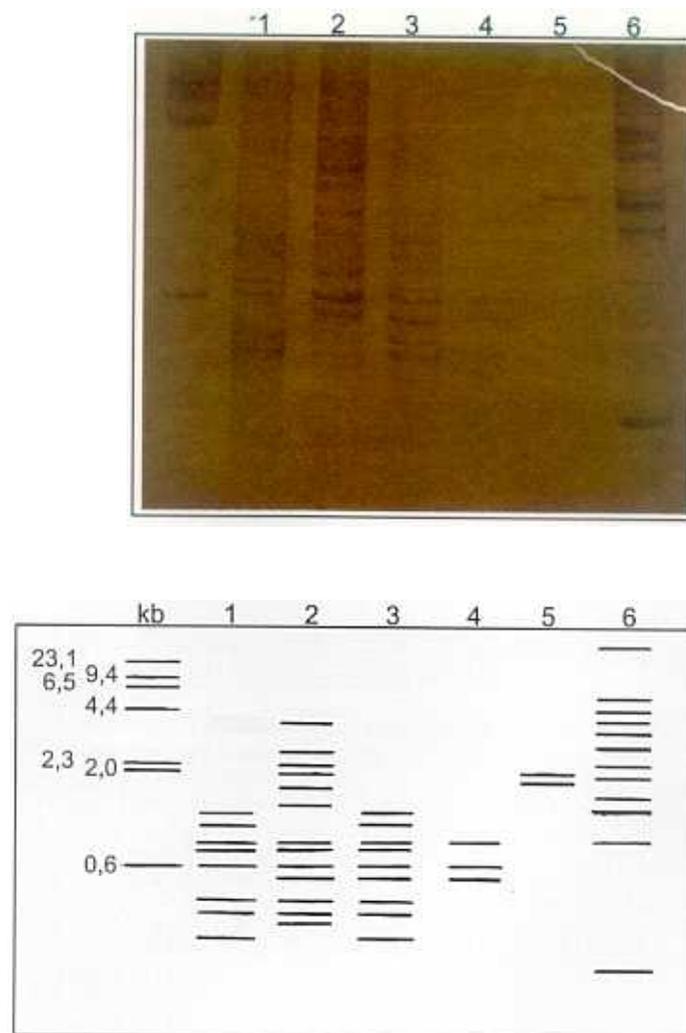
Carriles: 1- cepa Bolivia; 2- cepa RAL; 3- cepa GM;
4- cepa MC; 5- *Leishmania infantum*
6- *Trichinella spiralis*.

Fig. XVIII. Gel de poliacrilamida teñido con plata, de los productos de amplificación obtenidos empleando el iniciador B10.



Carriles: 1- cepa Bolivia; 2- cepa RAL; 3- cepa GM;
4- cepa MC; 5- *Leishmania infantum*
6- *Trichinella spiralis*.

Fig. XIX. Gel de poliacrilamida teñido con plata, de los productos de amplificación obtenidos empleando el iniciador B1.



Carriles: 1- cepa Bolivia; 2- cepa RAL; 3- cepa GM;
4- cepa MC; 5- *Leishmania infantum*
6- *Trichinella spiralis*.

1.3. TRATAMIENTO ESTADISTICO DE LAS PRUEBAS DE VARIABILIDAD.

Los resultados de las pruebas de variabilidad, tanto biológicas como bioquímicas, fueron sometidos a un proceso de tratamiento de datos, para lo que se empleó como herramienta el programa informático NTSYS versión 1.6 (Applied Biostatistics Inc., Setauket, NY). La finalidad es determinar si las similitudes y diferencias demostradas en las experiencias presentan una correlación que permita el establecimiento de agrupamientos entre cepas, o bien si cada una responde a patrones independientes o también que las diferencias se deban únicamente a factores de naturaleza aleatoria.

En primer lugar, es necesario interpretar los datos referentes a los distintos caracteres con el fin de establecer los criterios oportunos para poder asignarles valores de 0 ó 1, con los que elaborar las correspondientes matrices de similitud-disimilitud.

Para el procesamiento de estas matrices se utilizó el Coeficiente de Similitud Simple **SM** (Simple Matching Coefficient; Sneath y Sokal, 1973), que es uno de los coeficientes más sencillos y más antiguos. Fué introducido en la taxonomía numérica por Sokal y Michener en 1958, y desde entonces se viene utilizando con asiduidad. Responde a la fórmula $SM = m/m+u = m/n$, donde **m** representa los caracteres concordantes o concordancias, **u** los caracteres discordantes o discordancias, y **n** el número total de caracteres considerados, siendo $m+u = n$.

Una vez construidas las matrices diagonales intermedias, se procede al tratamiento de agrupamiento según el Método Sencillo de Emparejamiento Utilizando Medias Aritméticas **UPGMA** (Unweighted Pair-Group Method Using Arithmetic Averages; Sneath y Sokal, 1973). Probablemente se trata del método de agrupamiento más frecuentemente utilizado. Su desarrollo se debe a Sokal y Michener (1958), pero fué empleado por primera vez por Rohlf en 1963 en una clasificación de mosquitos. Según este método, la similitud $U_{j,k}$ entre dos grupos cualquiera **j** y **k**, puede ser calculada como $(1/t_j t_k) \sum_{i \in j, k} U_{j,k}$; siendo t_j y t_k unidades taxonómicas operativas (OTUs) o caracteres en estudio pertenecientes a los grupos **j** y **k**.

Este procedimiento se utiliza hoy día de forma rutinaria en estudios de

7. N° total de metacíclicos al alcanzar el pico: $\leq 10 \times 10^6 - 0$
 $> 10 \times 10^6 - 1$
8. Momento del registro del mayor n° de metacíclicos ≤ 11 días - 0
 > 11 días - 1
9. Capacidad de infección en fibroblastos: $\leq 17\% - 0$ ($\leq 1/2\%$ máx. - 0)
 (% células infectadas 24 horas p.i.) $> 17\% - 1$ ($> 1/2\%$ máx. - 1)
10. Capacidad de infección en macrófagos: $\leq 17\% - 0$ ($\leq 1/2\%$ máx. - 0)
 (% células infectadas 24 horas p.i.) $> 17\% - 1$ ($> 1/2\%$ máx. - 1)
11. Duración del ciclo intracelular en fibroblastos: < 6 días - 0
 > 6 días - 1
12. Duración del ciclo intracelular en macrófagos: 6 días - 0
 > 6 días - 1
13. Sensibilidad a nifurtimox: $< 100\% - 0$
 (% reducción a 100 $\mu\text{g/ml}$) 100% - 1
14. Sensibilidad a nifurtimox: $\leq 10\mu\text{g/ml} - 0$
 (mínima concentración con actividad citocida) $> 10\mu\text{g/ml} - 1$
15. Sensibilidad a benzonidazol: $< 100 - 0$
 (% reducción a 100 $\mu\text{g/ml}$) 100 - 1
16. Sensibilidad a benzonidazol: $\leq 10\mu\text{g/ml} - 0$
 (mínima concentración con actividad citocida) $> 10\mu\text{g/ml} - 1$
17. Sensibilidad a violeta de genciana: $< 100\% - 0$
 (% reducción a 100 $\mu\text{g/ml}$) 100% - 1
18. Sensibilidad a violeta de genciana: $\leq 1\mu\text{g/ml} - 0$
 (mínima concentración con actividad citocida) $> 1\mu\text{g/ml} - 1$

Siguiendo dichos criterios, la matriz de datos queda constituida de la siguiente manera.

	Bol	RAL	GM	MC	Y	Tul
1	0	-	1	0	1	1
2	1	-	1	1	0	-
3	1	0	0	-	0	1
4	1	0	0	0	1	0
5	0	0	1	0	0	0
6	1	0	1	0	0	-
7	0	0	1	0	0	-
8	0	0	0	1	0	-
9	1	0	1	0	0	-
10	1	1	1	0	0	-
11	0	0	0	0	0	-
12	0	1	0	0	0	-
13	0	1	0	0	1	0
14	0	0	0	0	0	0
15	0	1	0	0	1	0
16	1	1	1	1	0	0
17	1	1	1	1	1	1
18	1	1	1	1	0	0

Utilizando el coeficiente **SM**, se obtiene la correspondiente matriz diagonal intermedia:

	Bol	RAL	GM	MC	Y	Tul
Bol	1.000					
RAL	0.556	1.000				
GM	0.722	0.500	1.000			
MC	0.667	0.667	0.611	1.000		
Y	.0444	0.667	0.389	0.556	1.000	
Tul	0.556	0.556	0.500	0.667	0.778	1.000

A partir de esta matriz, empleando el método UPGMA de agrupamiento, se construye el árbol de distancias entre las distintas cepas (figura XX).

COMPARACION DE PATRONES PROTEICOS

El parámetro considerado en este caso es la existencia de bandas comunes y distintas en los geles obtenidos a partir de la electroforésis de las muestras procesadas de cada cepa (figura XVI). A partir de estos geles, se trasladan las bandas presentes a una plantilla desde la que se determina la localización concreta de unas bandas respecto a otras, aplicando, en función de esta localización, el criterio:

Ausencia de banda - 0

Presencia de banda - 1

Siguiendo este criterio, la matriz de datos queda constituida de la siguiente manera:

	Bol	RAL	GM	MC	Y	Tul	Leishmania
1	0	0	0	0	0	1	1
2	0	0	0	0	0	1	1
3	1	1	1	1	1	0	1
4	1	1	1	1	1	1	1
5	1	1	1	1	1	1	1
6	0	0	0	0	0	1	1
7	-	-	-	-	-	-	1
8	-	-	-	-	-	-	1
9	-	-	-	-	-	-	1
10	1	1	1	1	1	1	0
11	0	0	0	0	0	0	1
12	1	1	1	1	1	1	1
13	1	1	1	1	1	1	1
14	1	1	1	1	1	1	1

Utilizando el coeficiente **SM**, se obtiene la correspondiente matriz diagonal intermedia.

	Bol	RAL	GM	MC	Tul	Y	Leishmania
Bol	1.000						
RAL	1.000	1.000					
GM	1.000	1.000	1.000				
MC	1.000	1.000	1.000	1.000			
Tul	0.714	0.714	0.714	0.714	1.000		
Y	1.000	1.000	1.000	1.000	0.714	1.000	
Leishmania	0.429	0.429	0.429	0.429	0.571	0.429	1.000

A partir de esta matriz, empleando el método **UPGMA** de agrupamiento, se construye el árbol de distancias entre las distintas cepas (figura XXI).

COMPARACION DE PATRONES DE AMPLIFICACIÓN.

Se procede de la misma manera que en el apartado anterior, esto es, considerando la existencia de bandas comunes y distintas en los geles obtenidos a partir de electroforesis de las muestras amplificadas con cada uno de los iniciadores. Tras determinar la localización concreta de unas bandas respecto a otras, se aplica el mismo criterio descrito anteriormente:

Ausencia de banda - 0
Presencia de banda - 1

Siguiendo este criterio, se construye una única matriz de datos a partir de los tres geles obtenidos con los tres iniciadores, ya que en los tres casos (con cada iniciador) se procedió de la misma manera, con las mismas muestras y obteniéndose resultados de la misma naturaleza. La matriz única queda constituida del siguiente modo.

	BoI	RAL	GM	MC	L.i.	T.s.		BoI	RAL	GM	MC	L.i.	T.s.	
1	0	0	0	0	0	1		46	0	1	0	1	0	0
2	0	1	0	1	1	0		47	0	1	1	1	1	0
3	1	1	1	1	0	1		48	0	1	0	1	0	0
4	0	0	0	0	1	0		49	0	0	0	0	0	1
5	1	1	1	1	0	1		50	0	0	0	0	1	0
6	0	0	0	0	1	1		51	0	0	0	0	1	1
7	0	0	0	0	1	0		52	1	0	1	0	0	1
8	1	1	1	1	1	1		53	0	1	0	1	0	0
9	1	1	1	1	1	0		54	1	0	1	0	0	0
10	0	0	0	0	0	1		55	0	0	1	0	0	0
11	1	1	1	1	0	0		56	1	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	1		57	0	0	0	0	0	1
13	0	0	0	0	1	0		58	1	1	0	1	0	0
14	0	0	0	0	0	1		59	0	0	0	0	0	1
15	1	1	1	1	0	1		60	1	0	1	0	0	0
16	0	1	0	1	0	1		61	0	0	0	0	0	1
17	0	1	0	0	1	0	**	62	1	1	1	1	0	0
18	1	1	1	1	0	1		63	0	0	0	-	-	1
19	0	1	0	1	1	0		64	0	0	0	-	-	1
20	1	0	0	0	0	0		65	0	0	0	-	-	1
21	0	0	0	0	0	1		66	0	1	0	-	-	0
22	1	1	1	1	0	0		67	0	0	0	-	-	1
23	0	0	0	0	0	1		68	0	0	0	-	-	1
24	1	0	0	0	0	0		69	0	0	0	-	-	1
25	1	0	0	0	0	0		70	0	1	0	-	-	0
26	0	0	0	0	0	1		71	0	1	0	-	-	0
27	0	0	1	0	0	0		72	0	0	0	-	-	1
28	0	0	0	0	0	1		73	0	1	0	-	1	0
29	0	0	0	0	1	0		74	0	0	0	-	-	1
30	0	0	1	0	0	0		75	0	0	0	-	1	0
31	0	1	0	1	0	0		76	0	1	0	-	-	0
32	0	1	0	0	0	0		77	0	0	0	-	-	1
33	0	0	0	0	0	1		78	0	1	0	-	-	0
34	0	1	0	1	0	0		79	1	0	1	-	-	1
35	1	0	1	0	0	0		80	1	0	1	-	-	0
36	0	0	0	0	0	1		81	1	1	1	1	-	1
37	1	1	1	1	0	0		82	1	1	1	-	-	0
38	0	0	0	0	0	1		83	1	1	1	1	-	0
39	1	1	1	1	1	1		84	0	1	1	1	-	0
40	0	0	0	0	0	1		85	1	1	1	-	-	0
41	1	1	1	1	1	0		86	1	1	1	-	-	0
42	0	0	0	0	0	1		87	0	1	0	-	-	0
43	0	0	0	1	0	0		88	1	0	1	-	-	0
44	1	1	1	0	0	0	***	89	0	0	0	-	-	1
45	1	0	1	0	1	1								

- * Datos correspondientes al iniciador Z3.
- ** Datos correspondientes al iniciador B10.
- *** Datos correspondientes al iniciador B1.

Utilizando el coeficiente **SM** se construye la correspondiente matriz diagonal intermedia.

	Bol	RAL	GM	MC	<i>L.infantum</i>	<i>T.spiralis</i>
Bol	1.000					
RAL	0.652	1.000				
GM	0.888	0.674	1.000			
MC	0.697	0.843	0.719	1.000		
<i>L.infantum</i>	0.551	0.584	0.573	0.674	1.000	
<i>T.spiralis</i>	0.427	0.303	0.427	0.438	0.449	1.000

A partir de esta matriz, empleando el método **UPGMA** de agrupamiento, se construye el árbol de distancias entre las distintas cepas (figura XXII).

Figura XX. Dendrograma, basado en el método UPGMA, construido a partir de los resultados de las pruebas biológicas realizadas sobre las distintas cepas de *T. cruzi* sometidas a estudio.

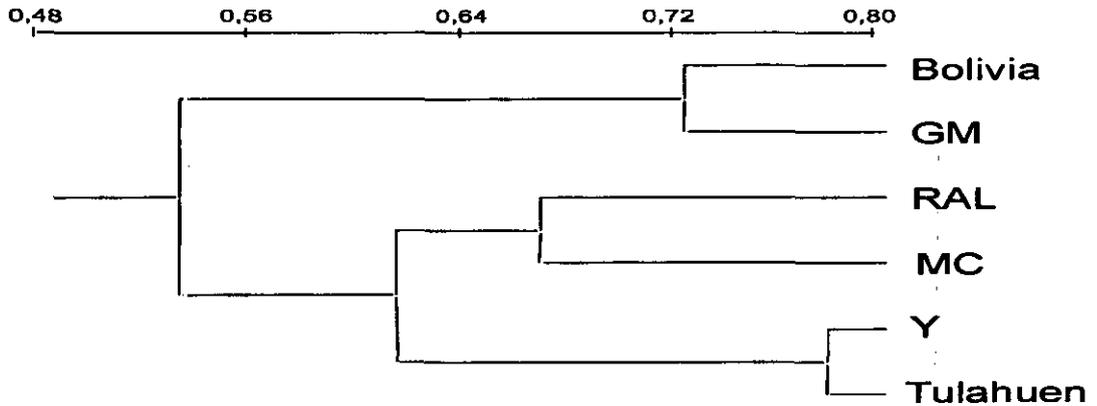


Figura XXI. Dendrograma, basado en el método UPGMA, construido a partir de los patrones protéicos obtenidos de las distintas cepas de *T. cruzi* sometidas a estudio, y comparadas con una muestra de *Leishmania infantum* procesada en las mismas condiciones.

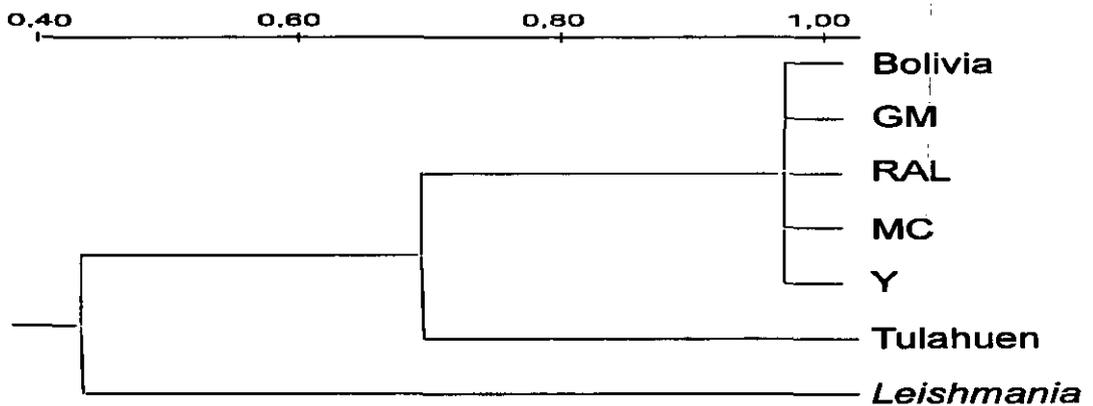
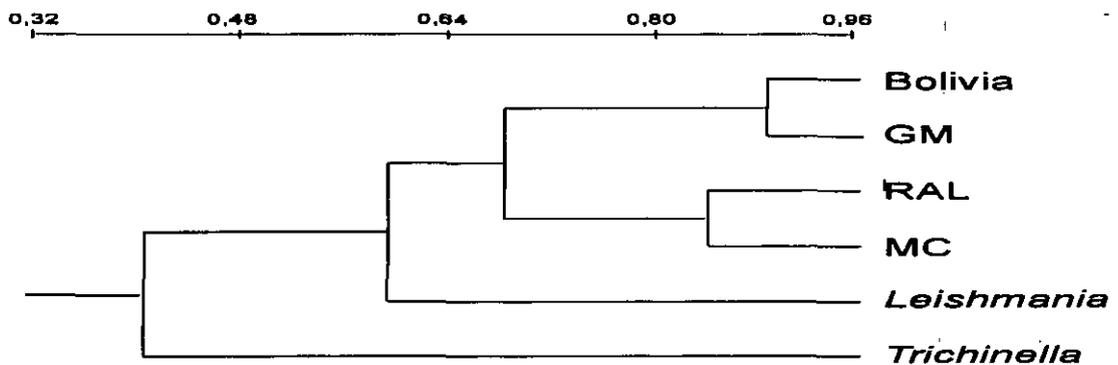


Figura XXII. Dendrograma, basado en el método UPGMA, construido a partir de los patrones de ADN amplificado obtenidos de las distintas cepas de *T. cruzi* sometidas a estudio, y comparados con una muestra de *Leishmania infantum* y otra de *Trichinella spiralis* procesadas en condiciones similares.



2. DESARROLLO Y COMPARACION DE TECNICAS DE CRIBADO.

Como ya hemos citado previamente, nuestros objetivos se centran en la actualización y mejora de técnicas que nos permitan avanzar en el terreno del cribado farmacológico sobre *T. cruzi*. En este apartado vamos a exponer una serie de modificaciones sobre métodos ya empleados y en algunos casos la inclusión de técnicas que pueden aportar importantes mejoras en este campo.

En primer lugar describiremos el proceso de puesta a punto de estas nuevas técnicas y las ventajas que pueden reportar, para realizar a continuación un estudio comparado del rendimiento de estas frente a las que se vienen utilizando de rutina.

En todos los casos se ha empleado la cepa Y, ya que demuestra cumplir todos los requerimientos en cuanto a sensibilidad, comportamiento en cultivo, transformación e infección celular, exigidos para el buen desarrollo de las pruebas.

2.2. DESARROLLO DE LOS MODELOS EXPERIMENTALES.

2.1.1. TECNICA DE CRIBADO SOBRE EPIMASTIGOTES.

Para poner a punto esta técnica, descrita en el apartado 6.2.1 de "material y métodos", se procedió a la realización de un estudio de la relación entre la densidad de los cultivos de epimastigotes y las absorbancias que a partir de ellos se registran en espectrofotómetro a 495 nm tras ser teñidos con eosina. Utilizando el material ya descrito en el apartado citado, se sembraron cantidades crecientes de tripanosomas para determinar cuál es el número adecuado de estos que ofrece una lectura que permite después detectar variaciones de absorbancia, que correspondan a variaciones en el número de parásitos.

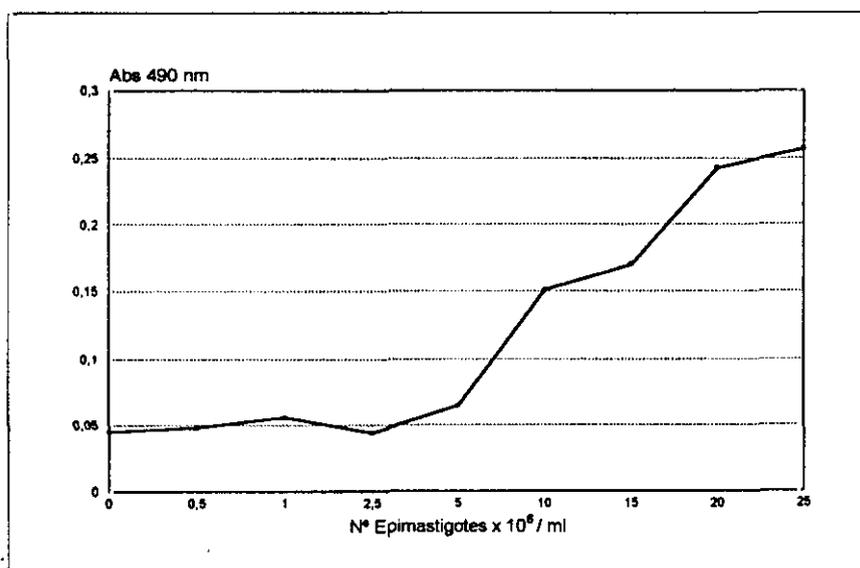
Fueron sembradas 8 concentraciones crecientes, desde 0,5 hasta 25 x 10⁶ epimastigotes/ml, que son aproximadamente, el número mínimo y máximo

dé microorganismos que aparecen en nuestras curvas de crecimiento en medio LIT. Se siembran 8 pocillos por concentración, y tras tinción con eosina 5%, se efectúa la media de los valores de las absorbancias de los ocho, habiéndose obtenido los siguientes resultados (tabla 38 y gráfica 29).

Tabla 38. RELACION ENTRE LA DENSIDAD DEL CULTIVO Y LA ABSORBANCIA A 490 nm PARA RECuento COLORIMETRICO DE EPIMASTIGOTES.

Epimastigotes / ml	Absorbancia (490)
0	0.045
500.000	0.048
1.000.000	0.056
2.500.000	0.044
5.000.000	0.065
10.000.000	0.151
15.000.000	0.170
20.000.000	0.243
25.000.000	0.257

Gráfica 29. CURVA DE ABSORBANCIAS A 490 nm PARA RECuento COLORIMETRICO DE EPIMASTIGOTES.



2.1.2. TECNICA DE CRIBADO SOBRE AMASTIGOTES.

Para desarrollar una técnica inmunoenzimática de aplicación al cribado que nos permita una valoración de la infección celular es necesario conocer, en primer lugar, en qué momento estas determinaciones inmunoenzimáticas sobre células infectadas presentan diferencias evidentes con respecto a las no infectadas, y en segundo lugar, si es posible discriminar entre distintos niveles de infección.

La bibliografía existente respecto al primer punto indica que a las 48 horas las diferencias ya son evidentes, pero en nuestras experiencias hemos podido comprobar que ya es posible detectar esta variación a las 24 horas postinfección.

Considerando ésto, procedimos al desarrollo de una experiencia previa que nos permitiese determinar el momento adecuado de siembra, infección, adición de fármacos y lectura de resultados. Esta experiencia consiste en la siembra e infección de dos cultivos iguales en la misma placa de microtitulación con un desfase de cuatro días, que nos permita ver si hay diferencias apreciables entre el día 1 y el día 4 postinfección. Si esto es así, significará que este método de valoración discrimina entre distintos niveles de infección con distinta carga parasitaria.

Para ello procedimos a la siembra (en media placa) de 24 pocillos con 2.000 células Vero y 20.000 tripomastigotes / pocillo, 18 pocillos solo con 2.000 células Vero (sin tripanosomas) y 6 pocillos sin células ni tripanosomas. A las 24 horas es retirado el medio y son lavados los pocillos infectados, reponiendo medio fresco en todos ellos. A los tres días de esta primera infección y en la media placa reservada para ello, se realiza una siembra idéntica a la descrita anteriormente; 24 pocillos con células Vero y tripanosomas, 18 solo con células Vero y 6 sin células ni tripanosomas.

Transcurridas 24 horas de esta segunda siembra, se lava la placa y se somete al proceso de lectura inmunoenzimática (ELISA) descrito en el apartado 6.2.2 de "material y métodos". Los resultados nos indicarán si este tipo de determinación revela las diferencias en carga parasitaria entre el día 1 y 4 post-infección, y con las células sin infectar.

Realizando la media de las absorbancias correspondientes a los pocillos de cada apartado de la experiencia, los resultados obtenidos son los que se muestran a continuación (tabla 39).

Tabla 39. RELACION ENTRE EL NIVEL DE INFECCION CELULAR Y LA ABSORBANCIA A 490 nm PARA VALORACION INMUNOENZIMATICA DE CULTIVOS DE CELULAS VERO INFECTADOS CON AMASTIGOTES.

	Absorbancias	
	4 días postinfección	1 día postinfección
Blanco (control sin células Vero ni tripanosomas)	0.271	0.286
Control - (solo células Vero)	0.394	0.338
Control + (células + tripanosomas)	1.132	0.611

A la vista de estos resultados y su tendencia a la discriminación, decidimos proceder a realizar directamente los ensayos con fármacos elevando el número de células sembradas y el número de tripanosomas infectantes a 5.000 y 50.000 respectivamente con el fin de aumentar la señal de lectura (apartado 2.2.2 de resultados).

2.1.3. PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD.

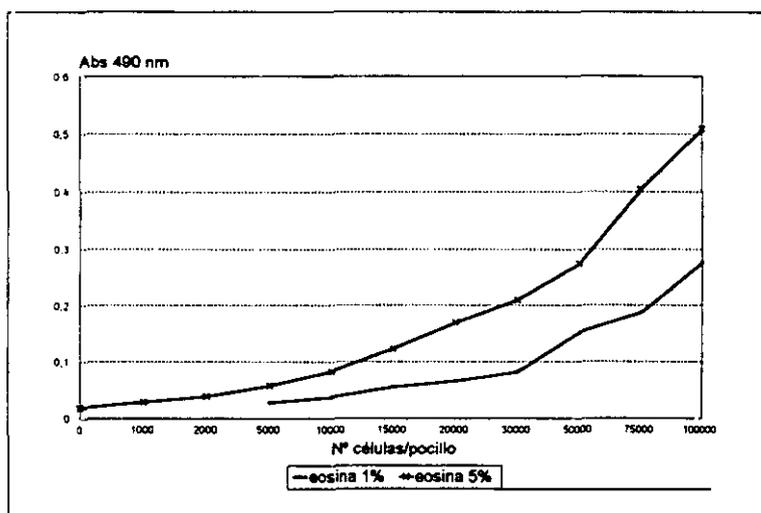
Para realizar las modificaciones señaladas en los ensayos de citotoxicidad (apartado 6.2.3 de "material y métodos"), las pruebas preparatorias fueron las mismas que en el caso de los epimastigotes. Consistieron en la realización de una curva de absorbancias sobre cantidades crecientes de células Vero cultivadas en pocillos de placas de microtitulación y ensayando distintas concentraciones de colorante, con el fin de determinar el número adecuado de éstas y la concentración de colorante que permitan una valoración del efecto citotóxico que sobre los cultivos ejerzan los productos a ensayar.

Fueron sembradas diez cantidades crecientes de células, desde 1.000 hasta 100.000 células/pocillo, repitiendo 10 pocillos por concentración. Al final de la prueba, la mitad de ellos fueron teñidos con eosina acuosa al 1% y la otra mitad con el mismo colorante al 5%. Efectuando la media de los valores de las absorbancias correspondientes a cada apartado de la experiencia, los resultados obtenidos fueron los siguientes (tabla 40 y gráfica 30).

Tabla 40. RELACION DE LA DENSIDAD CELULAR CON LA ABSORBANCIA A 490 nm PARA PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD.

Nº células sembradas	Absorbancias	
	Tinción eosina 1%	Tinción eosina 5%
0		0.019
1.000		0.029
2.000		0.039
5.000	0.028	0.058
10.000	0.038	0.083
15.000	0.056	0.123
20.000	0.066	0.169
30.000	0.082	0.210
50.000	0.152	0.274
75.000	0.187	0.404
100.000	0.276	0.509

Gráfica 30. CURVA DE ABSORBANCIAS A 490 nm PARA PRUEBAS DE CITOTOXICIDAD.



2.2. ENSAYOS DE ACTIVIDAD Y COMPARACION DE RESULTADOS.

Con los resultados de las pruebas preparatorias señaladas en el apartado anterior, fueron diseñadas las nuevas técnicas a evaluar (descritas ya en el apartado 6 de "material y métodos"); procediéndose a realizar el ensayo comparativo de las mismas con las series de productos de síntesis y de referencia también descritos anteriormente en el capítulo citado.

2.2.1. ACTIVIDAD SOBRE EPIMASTIGOTES.

Los resultados de la actividad de las series T, JDA, SM, nifurtimox, benzonidazol y violeta de genciana sobre epimastigotes, por la técnica de rutina (descrita en el apartado 6.1.1 de "material y métodos") y la modificada (descrita en el apartado 6.2.1 del mismo capítulo) se indican en las tablas 41 a 48.

2.2.1.1. ENSAYOS "IN VITRO" CONTRA EPIMASTIGOTES. ACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA SERIE T.

Tabla 41. MODELO EN USO.

PRODUCT.	CONC.µg/ml	I.C.	% CREC.	ACTIVIDAD CITOSTAT.	ACTIVIDAD CITOCIDA	EFICACIA
T7A	100	0.00	0.00	100	100	100
T7A	10	0.00	0.00	100	100	100
T7B	100	0.00	0.00	100	100	100
T7B	10	0.00	0.00	100	100	100
T10B	100	0.00	0.00	100	100	100
T10B	10	0.00	0.00	100	100	100
T15B	100	0.39	0.00	100	61	86.3
T15B	10	2.99	105.3	0	0	0
T28B	100	0.00	0.00	100	100	100
T28B	10	0.00	0.00	100	100	100

I.C.control = 2.84

Tabla 42. MODELO EN PRUEBA.

PRODUCTO	CONCENTRAC. µg/ml	INDICE DE CREC.	ACTIVIDAD CITOCIDA
T7B	100	0.28	72
T7B	10	0.54	46
T10B	100	0.21	79
T10B	10	0.27	73
T15B	100	0.28	72
T15B	10	0.89	11
T28B	100	0.46	54
T28B	10	0.50	50

2.2.1.2. ENSAYOS "IN VITRO" CONTRA EPIMASTIGOTES. ACTIVIDAD DE PRODUCTOS DE LA SERIE JDA.

Tabla 43. MODELO EN USO.

PRODUCT.	CONC.µg/ml	I.C.	% CREC.	ACTIVIDAD CITOSTAT.	ACTIVIDAD CITOCIDA	EFICACIA
JDA1 *	100	0.01	0.00	100	99	99.8
JDA1 *	10	1.71	37	63	0	0
JDA2 *	100	0.00	0.00	100	100	100
JDA2 *	10	5.35	115.8	0	0	0
JDA3 *	100	1.09	23.6	76.4	0	76.4
JDA3 *	10	4.73	102.4	0	0	0
JDA4 **	100	0.09	0.00	100	91	95.7
JDA4 **	10	1.80	85.3	14.7	0	14.7
JDA6 **	100	3.01	142.6	0	0	0
JDA6 **	10	3.08	146	0	0	0
JDA7a **	100	0.42	0.00	100	58	80.1
JDA7a **	10	1.36	64.4	35.6	0	35.6
JDA7b **	100	0.92	0.00	100	8	56.4
JDA7b **	10	1.19	56.4	43.6	0	43.6

* I.C.control = 4.62; ** I.C.control = 2.11

Tabla 44. MODELO EN PRUEBA.

PRODUCTO	CONCENTRAC. µg/ml	INDICE DE CREC.	ACTIVIDAD CITOCIDA
JDA1	100	0.29	71
JDA1	10	0.51	49
JDA2	100	0.49	51
JDA2	10	0.71	29
JDA4	100	0.61	39
JDA4	10	0.84	16
JDA6	100	1.03	0
JDA6	10	0.99	1
JDA7a	100	0.27	73
JDA7a	10	0.46	54
JDA7b	100	0.51	49
JDA7b	10	0.77	23

2.2.1.3. ENSAYOS "IN VITRO" CONTRA EPIMASTIGOTES. ACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA SERIE SM

Tabla 45. MODELO EN USO.

PRODUCT.	CONC.µg/ml	I.C.	% CREC.	ACTIVIDAD CITOSTAT.	ACTIVIDAD CITOCIDA	EFICACIA
SM1	100	0.00	0.00	100	100	100
SM1	10	0.00	0.00	100	100	100
SN2	100	0.05	0.00	100	95	99.3
SM2	10	3.50	46	54	0	54
SM3	100	0.65	0.00	100	35	91.5
SM3	10	2.04	26.8	73.2	0	73.2
SM4	100	4.23	55.6	44.4	0	44.4
SM4	10	7.24	95.1	4.9	0	4.9
SM6	100	0.00	0.00	100	100	100
SM6	10	0.01	0.00	100	99	99.9
SM7	100	3.95	51.9	48.1	0	48.1
SM7	10	6.12	80.4	19.6	0	19.6
SM8	100	3.60	47.3	52.7	0	52.7
SM8	10	5.96	78.3	21.7	0	21.7
SM9	100	0.00	0.00	100	100	100
SM9	10	0.00	0.00	100	100	100
SM11	100	0.00	0.00	100	100	100
SM11	10	0.025	0.00	100	97.5	99.7

I.C.control = 7.61

Tabla 46. MODELO EN PRUEBA.

PRODUCTO	CNCENTRAC. µg/ml	INDICE DE CREC.	ACTIVIDAD CITOCIDA
SM1	100	0.24	76
SM1	10	0.49	51
SM2	100	0.43	57
SM2	10	0.84	16
SM3	100	0.50	50
SM3	10	0.72	28
SM6	100	0.34	66
SM6	10	0.46	54
SM7	100	0.98	2
SM7	10	1.08	0
SM8	100	0.93	7
SM8	10	0.96	4
SM9	100	0.44	56
SM9	10	0.48	52
SM11	100	0.27	73
SM11	10	0.55	45

2.2.1.4. ENSAYOS "IN VITRO" CONTRA EPIMASTIGOTES. ACTIVIDAD DE NIFURTIMOX, BENZONIDAZOL Y VIOLETA DE GENCIANA.

Tabla 47. MODELO EN USO.

PRODUCT.	CONC.µg/ml	I.C.	% CREC.	ACTIVIDAD CITOSTAT.	ACTIVIDAD CITOCIDA	EFICACIA
NIFURT.	100	0.00	0.00	100	100	100
NIFURT.	10	0.00	0.00	100	100	100
BENZ.	100	0.002	0.00	100	99.8	99.9
BENZ.	10	0.76	0.00	100	24	73.2
V. GENC.	100	0.00	0.00	100	100	100
V. GENC.	10	0.13	0.00	100	87	95.4

I.C.control = 2.84

Tabla 48. MODELO EN PRUEBA.

PRODUCTO	CONCENTRAC. µg/ml	INDICE DE CREC.	ACTIVIDAD CITOCIDA
NIFURTIMOX	100	0.38	62
NIFURTIMOX	10	0.45	55
BENZONIDAZOL	100	0.41	59
BENZONIDAZOL	10	0.52	48
VIOL. GENCIANA	100	0.33	67
VIOL. GENCIANA	10	0.41	59

2.2.2. ACTIVIDAD SOBRE AMASTIGOTES.

Fueron aplicadas sobre las series T, JDA y SM, nifurtimox, benzonidazol y violeta de genciana, tanto la técnica en uso (descrita en el apartado 6.1.2 de "material y métodos") como la técnica propuesta (descrita en el apartado 6.2.2 del mismo capítulo) obteniéndose los siguientes resultados (tablas 49 a 56).

2.2.2.1. ENSAYOS "IN VITRO" CONTRA AMASTIGOTES. ACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA SERIE T.

Tabla 49. MODELO EN USO.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
T7B	*	*	0.57
T10B	*	*	0.47
T15B	*	0.85	0.75
T28B	*	0.83	1.08

Tabla 50. MODELO EN PRUEBA.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
T7B	*	*	0.51
T10B	*	*	0.59
T15B	*	0.73	0.78
T28B	*	0.75	0.80

Se representan los índices de infección respecto a los controles. Control de crecimiento sin producto = 1.

* Dosis tóxicas para las células Vero.

2.2.2.2. ENSAYOS "IN VITRO" CONTRA AMASTIGOTES. ACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA SERIE JDA.

Tabla 51. MODELO EN USO.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
JDA1	*	*	0.57
JDA2	0.57	0.53	0.75
JDA4	0.84	1.20	0.88
JDA6	1.65	0.96	0.93
JDA7a	-	0.75	1.13
JDA7b	0.91	0.96	0.78

Tabla 52. MODELO EN PRUEBA.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
JDA1	*	*	0.52
JDA2	0.52	0.59	0.62
JDA4	0.66	0.72	0.75
JDA6	0.80	0.83	0.82
JDA7a	0.71	0.84	0.85
JDA7b	0.67	0.84	0.84

Se representan los índices de infección respecto a los controles. Control de crecimiento sin producto = 1.

* Dosis tóxicas para las células Vero.

2.2.2.3. ENSAYOS "IN VITRO" CONTRA AMASTIGOTES. ACTIVIDAD DE PRODUCTOS DE LA SERIE SM.

Tabla 53. MODELO EN USO.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
SM1	*	0.44	0.61
SM2	-	0.35	0.57
SM3	0.60	0.72	0.84
SM6	0.31	0.38	0.69
SM7	0.96	1.12	0.97
SM8	0.73	0.67	0.77
SM9	-	-	0.92
SM11	0.64	0.77	0.95

Tabla 54. MODELO EN PRUEBA.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
SM1	*	0.55	0.71
SM2	0.44	0.56	0.74
SM3	0.71	0.75	0.83
SM6	0.58	0.68	0.78
SM7	0.75	0.83	0.84
SM8	0.73	0.78	0.76
SM9	0.75	0.78	0.83
SM11	0.71	0.73	0.83

Se representan los índices de infección respecto a los controles. Control de crecimiento sin producto = 1.

* Dosis tóxicas para las células Vero.

2.2.2.4. ENSAYOS "IN VITRO" CONTRA AMASTIGOTES. ACTIVIDAD DE NIFURTIMOX, BENZONIDAZOL Y VIOLETA DE GENCIANA.

Tabla 55. MODELO EN USO.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
Nifurtimox	0.08	0.24	0.48
Benzonidazol	0.40	0.50	0.65
V. Genciana	*	*	0.20

Tabla 56. MODELO EN PRUEBA.

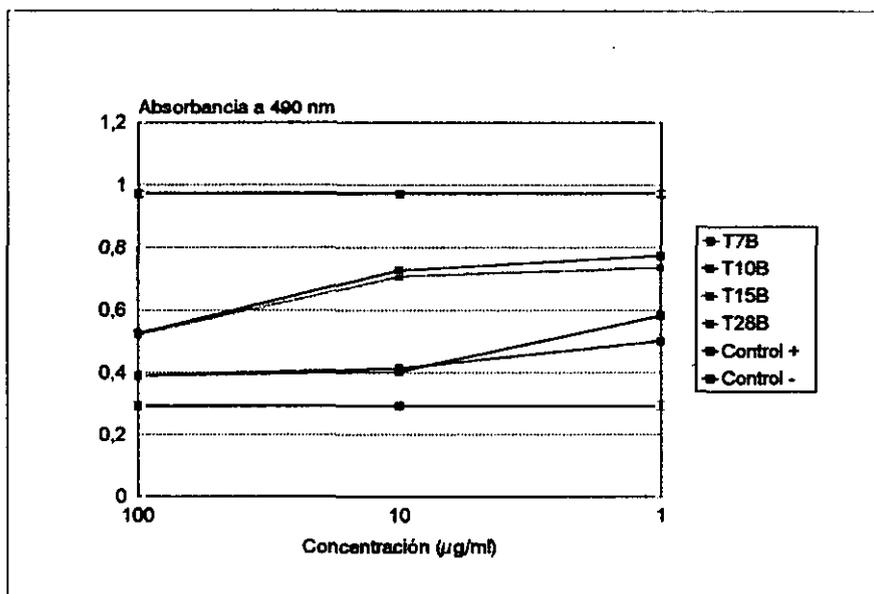
Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
Nifurtimox	0.34	0.38	0.36
Benzonidazol	0.44	0.50	0.63
V. Genciana	*	*	0.42

Se representan los índices de infección respecto a los controles. Control de crecimiento sin producto = 1.
 * Dosis tóxicas para las células Vero.

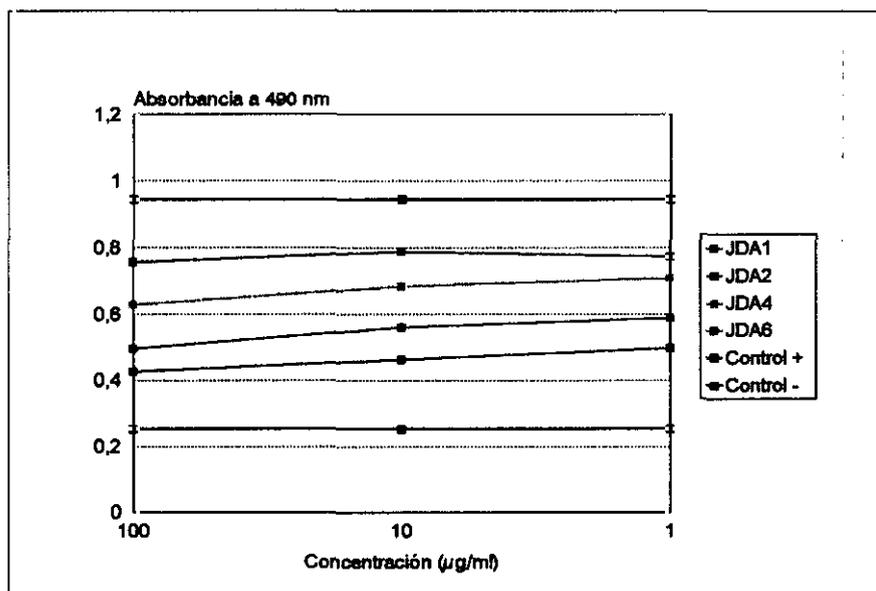
ENSAYOS "IN VITRO" CONTRA AMASTIGOTES.

Representación gráfica de los resultados obtenidos con el segundo procedimiento por los productos más interesantes de cada serie.

Gráfica 31. ACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA SERIE T.

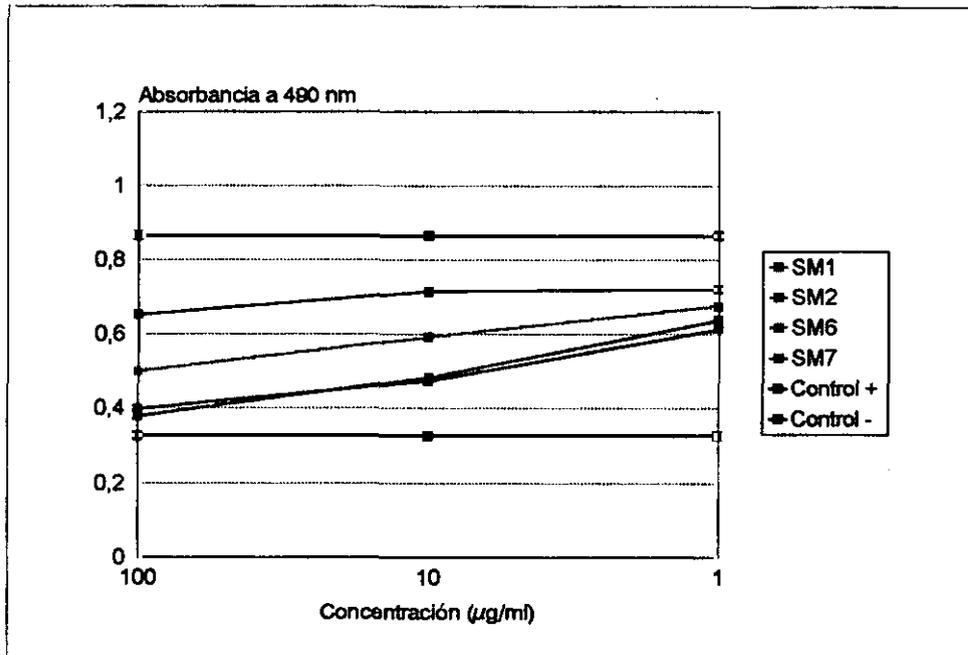


Gráfica 32. ACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA SERIE JDA.

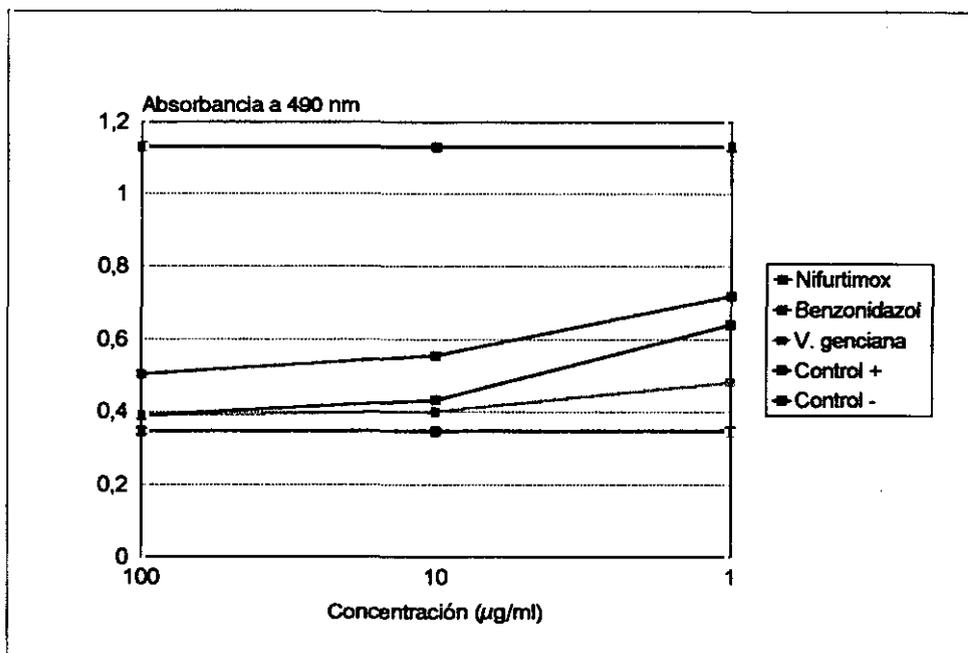


Se muestra el valor de la absorbancia de cada problema con respecto a los controles positivos (con células infectadas sin tratar) y negativos (con células sin infectar).

Gráfica 33. ACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA SERIE SM.



Gráfica 34. ACTIVIDAD DE LOS PRODUCTOS DE REFERENCIA.



Se muestra el valor de la absorbancia de cada problema respecto a los controles positivos (con células infectadas sin tratar) y negativos (con células sin infectar).

2.2.3. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD.

Fueron aplicadas sobre las series T, JDA y SM, nifurtimox, benzonidazol y violeta de genciana, tanto la técnica en uso (descrita en el apartado 6.1.3 de "material y métodos") como la técnica propuesta (descrita en el apartado 6.2.3 del mismo capítulo) obteniéndose los siguientes resultados (tablas 57 a 64).

2.2.3.1 ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA SERIE T.

Tabla 57. MODELO EN USO.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
T7B	65	65	22
T10B	-	78	40
T15B	69	9	0
T28B	67	11	0

Tabla 58. MODELO EN PRUEBA.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
T7B	90.3	76.7	27.5
T10B	88.8	87.1	6.1
T15B	54.4	22.1	16
T28B	55.1	8.9	0

Se expresan los porcentajes de toxicidad.

2.2.3.2. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA SERIE JDA.

Tabla 59. MODELO EN USO.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
JDA1	66	55	9
JDA2	20	13.9	6.5
JDA4	44	1.9	0
JDA5	72	58.7	3.7
JDA6	3.2	11.2	6.3
JDA7a	3.2	7.9	11.7
JDA7b	10.6	14.2	11.2

Tabla 60. MODELO EN PRUEBA.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
JDA1	52.9	51.8	32.1
JDA2	6.4	0.6	3.0
JDA4	49	4.3	9.9
JDA5	64	51	1.3
JDA6	7.2	6.2	1.4
JDA7a	8.8	3.3	3.4
JDA7b	21.9	3.0	1.6

Se expresan los porcentajes de toxicidad.

2.2.3.3. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD DE LOS PRODUCTOS DE LA SERIE SM.

Tabla 61. MODELO EN USO.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
SM1	57.6	40.5	10.3
SM2	56.4	32.6	0
SM3	29.2	16.7	0
SM4	13.7	8.4	4.7
SM6	36.2	37.7	12.9
SM7	18.3	19.2	17
SM8	11.1	8.8	0
SM9	35.7	22.1	0
SM11	38.8	12.1	0

Tabla 62. MODELO EN PRUEBA.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
SM1	80.2	23.8	5.4
SM2	52.2	17.1	2.4
SM3	12.9	7.3	0
SM4	16.7	9.6	9.7
SM6	12.6	5.8	0
SM7	19.7	22.5	15
SM8	7.9	7	8.3
SM9	23.7	7	2
SM11	24.3	19.7	17

Se expresan los porcentajes de toxicidad.

2.2.3.4. ENSAYOS DE CITOTOXICIDAD DE NIFURTIMOX, BENZONIDAZOL Y VIOLETA DE GENCIANA.

Tabla 63. MODELO EN USO.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
Nifurtimox	14	2	0
Benzonidazol	13	7	0
V. Genciana	-	86	22

Tabla 64. MODELO EN PRUEBA.

Producto	Concentraciones ($\mu\text{g/ml}$)		
	100	10	1
Nifurtimox	10	3.6	0
Benzonidazol	1.9	1.6	0
V. Genciana	90.2	71.5	28.9

Se expresan los porcentajes de toxicidad.

DISCUSION

VI. DISCUSION.

1. SOBRE LA VARIABILIDAD INTRAESPECIFICA.

Como se ha venido reflejando a lo largo de todo el trabajo, es bien conocida la heterogenicidad existente entre las poblaciones naturales de *Trypanosoma cruzi*; una variabilidad que se manifiesta en aspectos como su virulencia y morbilidad en modelos animales, susceptibilidad a sueros inmunes y a fármacos, histotropismo, capacidad de invasión celular, morfología o composición antigénica.

Los resultados obtenidos en los ensayos de comportamiento biológico realizados sobre las cepas sometidas a estudio, han confirmado en buena medida los precedentes existentes en cuanto a la variabilidad de respuesta que presentan distintos aislamientos mantenidos en unas condiciones lo más similares posibles. Con el fin de obviar en lo posible variaciones inherentes a la manipulación, se partió siempre de muestras conservadas en nitrógeno líquido. Tras su descongelación e inoculación en ratón, se realizaron hemocultivos en medio LIT, efectuándose a continuación dos resiembras. Los tripanosomas así obtenidos se destinaron a las experiencias. Estos pasos, así como todos los ensayos, fueron realizados simultáneamente con todas las cepas, por lo que los medios de cultivo, medios materiales y condiciones externas fueron idénticos para todas ellas; con la excepción de Tulahuen, que nos fué proporcionada cuando las experiencias estaban muy avanzadas por lo que no se realizaron con esta cepa algunas de las pruebas ya efectuadas con el resto. Además, procedía de un mantenimiento en unas condiciones muy diferentes, circunstancia a tener en consideración durante la interpretación de los resultados.

A fin de facilitar la discusión de los datos que aporta nuestro trabajo, se reproduce en este capítulo el cuadro resumen de resultados elaborado a partir de los valores obtenidos en las distintas pruebas de variabilidad (Tabla 65).

TABLA 65. ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS CEPAS SOMETIDAS A ESTUDIO.

	Bolivia	RAL	GM	MC	Y	Tulahuén
PROCEDENCIA BIOLÓGICA	<i>Triatoma infestans</i>	<i>Triatoma infestans</i>	<i>Felis yagouaroundi</i>	<i>Chrysocion brachyurus</i>	HUMANA	<i>Triatoma</i>
PROCEDENCIA GEGRAFICA	Vitichi (BOLIVIA)	Sao Paulo (BRASIL)	Matto Grosso (BRASIL)	Matto Grosso (BRASIL)	Sao Paulo (BRASIL)	Tulahuén (CHILE)
TASA MORTALIDAD EN RATON *	83,4%		100%	93,3%	100%	100%
PICO DE PARASITEMIA *	49.000 trip/ml		39.000 trip/ml	28.000 trip/ml	10.000 /ml	
MOMENTO MAXIMA PARASITEMIA *	día 15 p.i.	día 12 p.i.	día 10 p.i.	día 7-16 p.i.	día 11 p.i.	día 14 p.i.
PICO CRECIMIENTO EN MEDIO LIT	27.300.000	20.850.000	22.500.000	23.900.000	26.450.000	24.375.000
MOMENTO DE MAXIMO CREC. EN MEDIO LIT	día 11	día 11	día 16	día 9	día 11	día 11
% MAXIMO DE METACICLICOS EN GRACE	33%	13,8%	46,5%	8,3%	14%	
MOMENTO DEL % MAX. METAC EN GRACE	día 9	día 11	día 11	día 14	día 9	
CAPACIDAD DE INFECCION EN FIBROBLASTOS	29,7%	16,4%	28,6%	15%	16,7%	
CAPACIDAD DE INFECCION EN MACROFAGOS	25,9%	26,2%	44,1%	12,5%	14,7%	
DURACION CICLO INTRACELULAR FIBROBLASTOS	6 d.	6 d.	6 d.	6 d.	6 d.	
DURACION CICLO INTRACELULAR MACROFAGOS	6 d.	> 6 d.	6 d.	6 d.	6 d.	
SENSIBILIDAD A NIFURTIMOX. % REDDUCCION A 100, 10, 1 µg/ml	98,18 90,88 0	100 82,5 0	98,5 89,45 0	99,12 87,96 0	100 92,93 0	98,09 96,18 0
SENSIBILIDAD A BENZONIDAZOL % REDUCCION A 100, 10, 1 µg/ml	84,72 0 0	100 0 0	81,78 0 0	97,2 0 0	100 48,31 0	97,96 75,51 0
SENSIBILIDAD A VIOL. GENCIANA % REDUCCION A 100, 10, 1 µg/ml	100 71,79 0	100 75,41 0	100 67,22 0	100 88,21 0	100 82,42 75,82	100 75,51 61,22

* Datos previos de caracterización de las cepas.

La dinámica de crecimiento en cultivo de formas epimastigote en medio LIT es el apartado que cuenta con unos resultados más homogéneos. Todas las cepas alcanzan un pico de crecimiento que supera los 20×10^6 organismos por mililitro, situándose este máximo entre los días 9 y 11 de cultivo, con la excepción de GM, que lo alcanza de forma tardía el día 16. A continuación se sucede una fase estacionaria en torno a los $15-20 \times 10^6$ tripanosomas por mililitro (salvo RAL, que apenas alcanza los 10 millones) que se mantiene hasta más de tres semanas después del inicio del cultivo.

La capacidad de transformación en cultivo muestra una mayor dispersión de resultados. En un caso (GM) se superan las 10×10^6 formas metacíclicas por mililitro; en otro caso (Bolivia) se alcanzan los 5 millones y el resto apenas alcanza los 3 millones, con unos porcentajes máximos de formas metacíclicas en cultivo que varían desde el 48,25% en GM, 33% en Bolivia, 14% en Y, 13,75 % en RAL, hasta el escaso 8,25% en MC. Aunque en todos los casos la mayor proporción de formas metacíclicas se produce en el mismo periodo temporal, desde el noveno día en adelante, coincidiendo con las apreciaciones de autores como Osuna-Carrillo (1979).

En cuanto a la infección de cultivos celulares, hay que aclarar que la capacidad de metaciclogénesis no influye en los resultados, puesto que las experiencias se diseñaron controlando específicamente el número de formas metacíclicas que se añadían a los cultivos, cumpliéndose en todos los casos la citada proporción 10:1 (10 formas metacíclicas por cada célula a infectar). A este respecto, la mayoría de los autores consideran que la proporción de células infectadas está en relación directa con el número de células infectivas (Schenkman y col., 1988), por lo que resulta necesario mantener un estricto control sobre esta variable si lo que pretendemos es determinar la posible existencia de distintos niveles de infección en las pruebas.

También está sobradamente contrastado (Ley y col., 1988; Schenkman y col., 1988) que la naturaleza de la célula hospedadora afecta decisivamente al nivel de parasitación; hay tejidos y líneas celulares especialmente susceptibles a la infección por *T. cruzi* frente a otros que raramente la sufren. Por ello empleamos dos líneas celulares de distinta naturaleza para realizar esta experiencia. Además, está unánimemente reconocido que no todas las cepas del parásito se van a comportar igual frente a cada tipo celular. De

capacidad de infección celular "in vitro" no será representativa de la patogenicidad natural de la cepa, aspecto ya observado por nosotros en anteriores trabajos realizados con las cepas Y y Bolivia (Martínez Díaz, 1992; Atienza, 1994).

Con respecto a la duración del ciclo intracelular "in vitro", se vienen a confirmar todos los datos existentes (McCabe y col., 1984; Roval y col., 1990), que sitúan en 6 días el tiempo necesario para que ocurran las primeras lisis celulares con liberación de la segunda generación de tripomastigotes responsables de nuevas infecciones en células sanas. Solo la cepa RAL requiere un periodo superior en macrófagos, a pesar de la preferencia mostrada con anterioridad hacia este tipo celular.

Uno de los aspectos más extensamente reflejados en la bibliografía es el de la distinta susceptibilidad de las cepas de *T. cruzi* al tratamiento con fármacos de referencia o compuestos de diversa índole en ensayos de cribado. Se ha comprobado que en función de la procedencia geográfica de los aislamientos, se dan fluctuaciones en la eficacia de los fármacos que oscilan del 0 al 100% (Filardi y Brener, 1984; Brener, 1987). Incluso hay autores que han relacionado la resistencia de la infección experimental a nifurtimox o benzonidazol, con la preferencia miotrópica de la cepa y con el predominio de formas sanguíneas anchas, mientras que las cepas sensibles serían reticulotropas o miotropas con abundancia, en cualquier caso, de formas esbeltas (Melo y Brener, 1978; Andrade y col., 1985; Neal y van Bueren, 1988). Otros autores atribuyen tal variabilidad a la diferente incorporación de los medicamentos en los tejidos infectados, o a una distinta intervención sinérgica del sistema inmunitario (Muller y col., 1986; Toledo y col., 1990). Asimismo se han citado variaciones en la susceptibilidad a nifurtimox, benzonidazol y megazol, en función del tipo morfológico, siendo los tripomastigotes más sensibles que los amastigotes (de Castro y de Meirelles, 1987).

Pero la mayoría de los autores coincide en señalar que el éxito del tratamiento de la infección experimental con benzonidazol y nifurtimox, o con otros fármacos como el alopurinol, depende de la cepa empleada más que de otros factores, como la fase clínica de la infección (Brener y Chiari, 1967; Habekorn y Gonert, 1972; Andrade y col., 1975; Brener y col., 1976; Andrade

y Figueira, 1977; Filardi y Brener, 1990), ya sea por variaciones en la absorción y metabolismo del medicamento por parte del parásito, en la incorporación en los diversos tejidos infectados o en la participación del sistema inmunitario, variable con la cepa del parásito.

Por todo esto, para evitar posibles interferencias a nivel de hospedador, decidimos realizar nuestros ensayos de sensibilidad a fármacos directamente sobre el parásito, "in vitro", empleando cultivos axénicos de epimastigotes en medio LIT.

Los resultados de nuestras experiencias reflejan esta variabilidad en cuanto a la susceptibilidad a compuestos de eficacia reconocida. Sobre dos cepas (Y y RAL), nifurtimox y benzonidazol a la concentración de 100 µg/ml, alcanzan el 100% de actividad citocida. En otras dos (Y y Tulahuen) se detecta algún efecto tripanocida con benzonidazol a una concentración más baja, 10 µg/ml. Y estas dos últimas resultan ser también las más sensibles al violeta de genciana, apareciendo actividad citocida incluso a la concentración de 1 µg/ml.

A la vista de los resultados, la cepa más sensible, en general, de las seis estudiadas es Y, lo que la convierte en una buena candidata para el cribado primario. Esto coincide con datos aportados por parte de autores como Ribeiro (1988), que en ensayos "in vivo" con nifurtimox y benzonidazol obtiene un 35 y 57% de curaciones para la cepa Y, frente al 0 y 18% respectivamente con Bolivia.

Por otra parte, los perfiles electroforéticos realizados con extractos de proteínas totales de cada una de las cepas, no han aportado diferencias significativas entre ellas, como cabía esperar de una prueba poco específica. Aunque esta experiencia sí ha discriminado las muestras de distintas cepas de *T. cruzi* frente a la de *Leishmania infantum* utilizada como patrón de comparación. Si bien es cierto que la cepa Tulahuen presentó diferencias con respecto al resto de los aislamientos de su misma especie, es necesario tratar con precaución este resultado aislado, debido al distinto origen y mantenimiento a que ha sido sometida. El resto de las muestras de las distintas cepas daban unos patrones de bandas prácticamente idénticos.

Pruebas más específicas, como los análisis isoenzimáticos o los

estudios que utilizan endonucleasas de restricción, han aportado en los últimos tiempos clasificaciones de aislamientos acordes con distintos factores como la procedencia geográfica o la patología (Miles y col., 1978, 1980; Tibayrenc y Desjeux, 1984); más recientemente han sido incorporadas a los estudios de variabilidad en *T. cruzi* nuevas técnicas como la hibridación con sondas de ADN, anticuerpos monoclonales y la reacción en cadena de la polimerasa (Welsh y McClelland, 1990; Williams y col., 1990; Avila y col., 1991; Macedo y col., 1992). Steindel (1993) encuentra similitudes en patrones de amplificación por AP-PCR entre aislamientos de la misma procedencia geográfica y diferencias entre aislamientos de distinta localización.

Los patrones de ADN amplificado obtenidos en nuestras experiencias han aportado diferencias interesantes entre las distintas muestras, pese a que dos de ellas no pudieron ser procesadas. Las otras cuatro muestras revelan cuatro patrones, muy parecidos dos a dos, con cada uno de los iniciadores empleados, mostrando además marcadas diferencias con las dos muestras utilizadas como patrón de comparación: un protozoo flagelado próximo como *Leishmania infantum* y un helminto sin ninguna relación como *Trichinella spiralis*.

En general, hemos podido comprobar que la variabilidad de comportamiento demostrada por las distintas cepas en nuestras experiencias no se correlaciona con factores conocidos previamente como la procedencia geográfica o biológica, o la patogenicidad (aun teniendo en cuenta que el pequeño número de cepas estudiado no permitiría establecer una correlación significativa). Pero el resultado más llamativo aparece cuando, al realizar el tratamiento estadístico de los datos mediante la aplicación de un método de agrupamiento (UPGMA) sobre cada uno de los tres tipos de pruebas realizadas, comprobamos que los agrupamientos obtenidos tras la batería de pruebas biológicas coinciden con los procedentes de los distintos patrones de amplificación.

El procesamiento de los datos procedentes de los patrones proteicos da lugar a un grupo que engloba cinco cepas (Bolivia, RAL, GM, MC e Y), separando de éstas la sexta cepa sometida a estudio (Tulahuen). En una segunda rama independiente se sitúa *Leishmania*.

El árbol de clasificación resultante de las pruebas biológicas distingue dos ramas principales; la primera reúne a Bolivia y GM, y la segunda se divide a su vez dando otras dos parejas, RAL y MC por un lado y Tulahuen e Y por otro.

En el dendrograma correspondiente a los patrones de ADN amplificado hay que señalar que no aparecen las dos últimas cepas citadas, pero sí contamos con dos muestras comparativas de otros organismos apuntados anteriormente. En una primera división se establece una rama para *Trichinella* y otra para *Trypanosoma* y *Leishmania*. Esta segunda rama se divide a su vez en una para *Leishmania* y otra para las cepas de *Trypanosoma*, que tras una tercera división quedan agrupadas en dos parejas: Bolivia y GM por un lado, y RAL y MC por otro.

La tendencia inmediata sería relacionar las diferencias en el comportamiento biológico con variaciones a nivel genómico expresadas a través de la amplificación de los fragmentos de ADN procesados en idénticas condiciones, pero para establecer esta conclusión sería necesaria la realización de nuevas pruebas con técnicas más sensibles o bien aumentar considerablemente el número de cepas comparadas en un ensayo similar.

2. SOBRE LOS METODOS DE CRIBADO FARMACOLOGICO.

Trypanosoma cruzi constituye un modelo biológico experimental muy versátil, marcado por su complejo ciclo biológico y su polimorfismo especializado. Presenta formas exclusivamente infectivas (tripomastigotes), formas replicativas extracelulares específicas del insecto vector (epimastigotes) y formas replicativas intracelulares presentes solo en el hospedador vertebrado (amastigotes).

Las formas tripomastigote infectivas nunca se replican, por lo que resulta complicado su mantenimiento en cultivo, siendo por tanto difícil el establecimiento de una técnica de cribado "in vitro". Aunque es posible aplicar un método mixto con sangre almacenada procedente de ratones previamente infectados (Schlemper, 1978).

La forma que resulta más sencillo mantener en condiciones de laboratorio es, lógicamente, la replicativa extracelular. Esto hace que el cribado farmacológico sobre epimastigotes sea la modalidad más ampliamente extendida y la que cuenta con mayor número de posibilidades de aplicación, pues va a ofrecer una gran agilidad en el desarrollo de pruebas de cribado a gran escala.

Son muchas las técnicas o modelos basados en este tipo morfológico (Scott y Matthews, 1987; Avila y col., 1987; Tanowitz y col., 1987; Neal y van Bueren, 1988; Doyle y Weinbach, 1989). La utilizada de rutina en nuestro laboratorio, donde regularmente se evalúan extractos vegetales o productos de síntesis como antiprotozoósicos, cumple los requisitos de fiabilidad y rapidez exigibles a cualquier método de cribado primario. El modelo detecta cualquier actuación a nivel de la replicación de los microorganismos, además del efecto tripanocida, lo que nos aporta una valiosa información referente a porcentajes de crecimiento y de reducción en los cultivos, fácilmente extrapolables a expresiones cuantitativas tanto de actividad citostática como de actividad citocida de los productos ensayados.

El procedimiento, llevado a cabo en las correctas condiciones, ofrece una fiabilidad casi absoluta y su único inconveniente es la laboriosidad del recuento microscópico directo de microorganismos sobre cámaras de Neubauer, que ralentiza y limita considerablemente el número de productos a ensayar en cada prueba.

A la vista de estos datos, la única actuación razonable con objeto de mejorar el rendimiento de esta técnica será a nivel del método de recuento. Basándonos en trabajos realizados con otros microorganismos: cribado contra amebas (Wright y col., 1989) y ensayos de toxicidad en líneas celulares (Finlay y col., 1984), decidimos tratar de acondicionar a nuestro modelo un método de recuento colorimétrico automatizado mediante lectura espectrofotométrica de absorbancias tras tinción de las células supervivientes con agentes colorantes. La forma de crecimiento, en suspensión, de los cultivos de epimastigotes y la menor cantidad de citoplasma que, con respecto a otros tipos celulares, presentan los tripanosomas, constituían "a priori" los principales inconvenientes.

El primero tratamos de superarlo mediante el empleo de una centrífuga de placas adaptada a los soportes de nuestros cultivos, con el fin de sedimentar en el fondo de los pocillos los organismos supervivientes al tratamiento, que permanecen suspendidos en el medio. Para superar el segundo inconveniente, se ensayaron distintas concentraciones del colorante elegido para la tinción de las formas sedimentadas, obteniendo los mejores resultados con eosina acuosa al 5%.

La aplicación de un método colorimétrico de recuento está condicionada a que el rango de absorbancias, resultante de la lectura cuantitativa del colorante incorporado por los epimastigotes, sea lo suficientemente amplio y preciso como para poder discernir el número de células teñidas. Con esta finalidad, se comprobó la relación entre la densidad del cultivo, en millones de epimastigotes y la absorbancia a 490 nm, tras su tinción con eosina al 5%, construyéndose la curva recogida en el apartado 2.1.1 de "resultados".

Para validar el modelo propuesto, se ha determinado la actividad de los fármacos de referencia así como de diversas series de productos de síntesis, y comparado los resultados con los obtenidos en los ensayos previos mediante recuento hemocitométrico (Martínez Díaz, 1992; Atienza, 1994).

Los resultados de estas pruebas (tablas 41 a 48) revelan dos problemas fundamentales; uno a nivel del poder discriminante de la coloración en los rangos de densidades de cultivo existentes en el momento del procesamiento, y otro a nivel de la expresión de resultados, mucho más limitada que en el modelo usado rutinariamente.

Ambas deficiencias quedan patentes en las tablas antes citadas. Si bien en algunos casos existe una cierta tendencia de aproximación, en general los valores de las tablas de resultados correspondientes al modelo en prueba no son equiparables a los resultados, perfectamente validados, del modelo en uso de rutina. Esto se hace más patente en el caso de los productos activos, pues cuando la densidad del cultivo es baja aparece un "ruido de fondo" que hace que la lectura siempre sea superior a la real.

A esto hay que añadir, como queda perfectamente reflejado en las tablas, que la versatilidad del modelo en uso, en cuanto al tratamiento y

expresión de resultados, en ningún caso podrá alcanzarse en el segundo modelo pues con los datos obtenidos de la lectura de absorbancias a lo más que podemos llegar es a realizar una estimación de la eficacia, según se indica en el apartado 6.2.1 de "material y métodos".

Desgraciadamente, estos aspectos hacen que este modelo no solo no supere, sino que ni siquiera alcance la eficacia del anterior, por lo que, a pesar de su mejor operabilidad, no constituye una alternativa adecuada al mismo.

Otro modelo que ofrece la posibilidad de detectar actividad sobre la replicación del parásito es el cultivo de amastigotes. En este caso, al ser formas intracelulares, existe la ventaja de poder tratar al parásito en su ambiente natural (el interior de la célula) y el inconveniente que ésto conlleva en cuanto al aumento de la complejidad del modelo, al tener que manejar, además del parásito, otro sistema biológico como es la célula hospedadora.

A pesar de ésto, desde la implantación extensiva de los cultivos celulares, han sido muchos los autores (Scott y Matthews, 1987; Neal y van Bueren, 1988; Roval y col., 1990) que han desarrollado métodos para el ensayo farmacológico sobre formas intracelulares de *T. cruzi*, siendo la técnica de valoración empleada en prácticamente todos los casos, la tinción de los cultivos y el recuento microscópico de células infectadas.

El método empleado en nuestro laboratorio de forma rutinaria desde su puesta a punto (Martínez Díaz, 1992) utiliza la misma modalidad de recuento, una modalidad que resta aún más agilidad a un proceso ya de por sí muy laborioso y difícil de aplicar sobre series grandes de productos a ensayar.

El principal objetivo vuelve a ser, por tanto, la modificación del método de recuento con el fin de conseguir la automatización del mismo. El problema que encontramos en este caso, parece en principio más complejo que en el apartado de epimastigotes, pues ahora buscamos un método que permita no solo determinar la presencia o ausencia de organismos, sino discriminar la presencia de células infectadas frente a células no infectadas, así como cultivos de células con distintos grados de parasitación.

Tomando como referencia nuevamente trabajos realizados sobre otros

organismos (*Toxoplasma gondii*; Derouin y Chastang, 1989), optamos por la aplicación de un método de determinación inmunoenzimática (ELISA), específico para *T. cruzi*, que permita la detección de este organismo en mayor o menor número en los cultivos celulares infectados y tratados.

Para desarrollar una técnica de estas características, es necesario conocer en que momento las determinaciones inmunoenzimáticas sobre células infectadas evidencian diferencias significativas con respecto a las no infectadas, y además, comprobar si es posible discriminar entre distintos niveles de infección. La bibliografía existente al respecto indica que estas determinaciones inmunoenzimáticas diferencian células infectadas y no infectadas a las 48 horas del contacto, aunque en nuestras experiencias hemos podido comprobar que ya es posible detectar esta variación a las 24 horas post-infección.

Para estudiar la posible adaptación de este método de lectura a nuestra técnica, realizamos la experiencia descrita en el apartado 2.1.2 de "resultados", consistente en la determinación inmunoenzimática de cultivos idénticos expuestos a distintos tiempos de infección. Los resultados de esta prueba (tabla 39) indican una evidente discriminación entre los cultivos a las 24 horas post-infección y a los 4 días de la misma, o lo que es lo mismo, entre las células con escasa carga parasitaria correspondientes al primer caso, y las que ya albergan un considerable número de amastigotes tras 4 días de infección (ver figuras VI a XI). Además, la diferencia en ambos casos con los controles de células sin infectar resulta patente. De este modo, si la técnica discrimina entre cultivos celulares con distinta carga parasitaria, podrá distinguir aquellos cultivos sobre los que la acción de fármacos y productos ha sido efectiva, frente a sus homólogos sin tratar o con tratamientos no efectivos.

Partiendo de estas premisas, desarrollamos el modelo descrito en el apartado 6.2.2 de "material y métodos", que además del método de recuento automatizado, aporta notables simplificaciones en su desarrollo como el hecho de realizar la siembra de células y su infección directamente sobre el fondo de la placa, sin tener que recurrir a otros artificios como la instalación de cubreobjetos en cada pocillo a utilizar, con su correspondiente labor de recuperación y mayor riesgo de contaminación en la manipulación. Además, la propia naturaleza del material empleado hace que el ahorro, tanto en medios

de cultivo como en material biológico sea muy considerable con respecto al modelo en uso.

Los ensayos de actividad realizados (tablas 49 a 56) aportan similares resultados en las dos baterías de pruebas. Los valores reflejados en las tablas del modelo en prueba muestran una gran similitud con sus homólogos obtenidos aplicando el modelo de rutina. Además, tenemos que tomar en consideración que los valores expresados en ambas tablas son perfectamente equiparables; en ambos casos son denominados como índices de infección con respecto a los controles y la única diferencia estriba en que en un caso se obtiene a partir del recuento del número de células infectadas en el problema con respecto al control, y en el otro a partir de la señal inmunoenzimática (mediante lectura de absorbancias) de las células infectadas con respecto al control.

A la vista de los resultados, en este caso sí podemos considerar que el modelo propuesto constituye una alternativa válida al establecido, pues ofrece resultados equiparables y expresables en los mismos términos, simplifica considerablemente el desarrollo de la prueba sin aumentar prácticamente su duración, supone un ahorro económico en lo que respecta al material utilizado y evita posibles interpretaciones subjetivas por parte del autor de los recuentos, al automatizarse el proceso de lectura.

Los resultados de la prueba anterior han de ser debidamente complementados con un estudio del efecto tóxico que, sobre las células hospedadoras, presenten los productos ensayados, para descartar la posibilidad de falsos positivos debidos al efecto de éstos sobre la célula soporte y no directamente sobre el parásito. Esto nos aportará un dato adicional acerca de la toxicidad inespecífica de los productos ensayados.

En nuestro caso, para determinar el posible efecto citotóxico de los fármacos sobre las células Vero, venimos utilizando un método colorimétrico (Finlay y col., 1984; Martínez Díaz, 1992) basado en el tratamiento directo de las células en cultivo con los productos a ensayar, y la tinción de las supervivientes para su posterior solubilización y determinación espectrofotométrica (apartado 6.1.3 de "material y métodos"). Se trata de un procedimiento ágil, rápido, con recuento automatizado y de gran fiabilidad.

La única aportación a este modelo consiste en su transformación en un microensayo, reduciendo el gasto de medios y reactivos; a la vez se aumenta el rendimiento de la prueba, al utilizar placas de microtitulación en las que, con menos de la mitad de volumen, se multiplica por 4 el número de ensayos que se pueden efectuar. Además, con el cambio de colorante, es posible realizar la lectura con el mismo espectrofotómetro para placas y el mismo filtro utilizado en el cribado contra amastigotes con valoración inmunoenzimática.

La curva de absorbancias realizada sobre cultivos con distinta densidad celular (gráfica 30) nos indica que el empleo de eosina acuosa al 5% y su posterior solubilización con hidróxido sódico, sobre cultivos con más de 30.000 células, ofrece la suficiente sensibilidad para determinar las pérdidas ocasionadas tras el tratamiento con los productos a ensayar. La expresión de los resultados -porcentaje de citotoxicidad- es la misma que en el modelo puesto a punto con anterioridad (Martínez Díaz, 1992). Comparando los resultados de los ensayos efectuados con ambos modelos sobre las series probadas (tablas 57 a 64), en general, los dos arrojan unos valores equiparables, sin que se dé la circunstancia en ningún caso de que un producto sea considerado tóxico a una concentración determinada (>DC50) por una técnica y no por la otra.

De esta manera, al igual que en el caso anterior, podemos concluir que el modelo propuesto constituye asimismo una alternativa válida al establecido, pues las pequeñas modificaciones realizadas no afectan la efectividad y la fiabilidad, a la vez que se aumenta el rendimiento y se consigue un considerable ahorro económico.

CONCLUSIONES

VI. CONCLUSIONES.

1. Se confirma la heterogenicidad existente entre distintas poblaciones de *Trypanosoma cruzi* en aspectos como comportamiento en cultivo, infección celular y sensibilidad a fármacos.
2. La dinámica de crecimiento de epimastigotes en cultivo no es un buen parámetro para la diferenciación intraespecífica, habida cuenta de la similitud en el comportamiento de las cepas, con la única excepción de la denominada GM, que muestra un retraso en la consecución de su pico máximo.
3. La determinación de la metaciclogénesis sí permite detectar claras diferencias, destacando la mayor capacidad de transformación de GM y Bolivia, frente al resto de las cepas analizadas.
4. La capacidad de infección "in vitro" en cultivo celular no está en relación directa con la virulencia de la cepa.
5. El desarrollo intracelular en fibroblastos y en macrófagos se completa "in vitro" en 6 días, mostrando dos de las cepas (GM y RAL) preferencia por la línea de macrófagos.
6. La cepa más sensible a los productos de referencia utilizados es la denominada Y, lo que junto a factores como su comportamiento en cultivo, capacidad de transformación e infección en cultivo celular, la convierten en la mejor candidata para el cribado farmacológico primario. Siendo, no obstante, aconsejable la realización de las pruebas con otra cepa de menor sensibilidad como pueden ser Bolivia o GM.
7. La variabilidad de comportamiento demostrada por las distintas cepas en nuestras experiencias no se correlaciona con factores conocidos previamente, como la procedencia geográfica o biológica, o la patogenicidad.
8. La utilización de iniciadores arbitrarios para la amplificación de secuencias diana del ADN (AP-PCR) permite, como ocurre en otros parásitos, la caracterización diferencial de poblaciones de *Trypanosoma cruzi*.

9. El tratamiento estadístico de agrupamiento, aplicado independientemente a los resultados de las pruebas biológicas y a los patrones de amplificación de ADN ofrece los mismos emparejamientos, lo que confirma la utilidad del análisis conjunto de una serie de pruebas biológicas en estudios de variabilidad intraespecífica.

10. La técnica de recuento colorimétrico para el cribado farmacológico sobre epimastigotes muestra deficiencias en cuanto a la fiabilidad de las lecturas y expresión de resultados, lo que cierra la posibilidad del desarrollo de un modelo alternativo al basado en el recuento microscópico.

11. La valoración inmunoenzimática de cultivos celulares infectados con amastigotes detecta diferencias en los niveles de carga parasitaria equiparables a las determinadas mediante recuento microscópico, por lo que el método propuesto ofrece una alternativa válida que simplifica y agiliza el cribado.

12. Las modificaciones a los ensayos de toxicidad inespecífica no afectan a su fiabilidad y suponen un considerable ahorro económico, por lo que el microensayo propuesto resulta mucho más rentable que el modelo de referencia.

13. A pesar de la limitación en cuanto al riesgo que supone la manipulación de un agente patógeno, la versatilidad que ofrece *Trypanosoma cruzi* para el desarrollo de distintos modelos de cribado farmacológico primario, así como las posibilidades demostradas de mejora y agilización de los mismos, hacen de este protozoo una herramienta insustituible en la investigación de nuevos fármacos.

**REFERENCIAS Y
BIBLIOGRAFIA CONSULTADA**

VII. REFERENCIAS Y BIBLIOGRAFIA CONSULTADA.

- Abdo, M.C.B.; Brener, Z.; Petrillo-Peixoto, M.L. (1990): "In vitro" selected resistant lines of *Trypanosoma cruzi* to the nitroheterocyclic derivatives nifurtimox and benznidazole show cross-resistance to both drugs. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **85** (1): 101.
- Abrahamsohn, T.A.; Katzin, A.M. y Midler, R.V. (1983): A Method for Isolating *Trypanosoma cruzi* Amastigotes from Spleen and Liver Using Two-Step Discontinuous Gradient Centrifugation. J. Parasitol., **69** (2): 437-439.
- Acebedo, H.P. de; Roitman, I. (1977): Growth of the Y strain of *Trypanosoma cruzi* in an HX25-modified medium. J. Parasitol., **63**: 485.
- Acosta, A.M.; Sadigursky, M. y Santos-Buch C.A. (1983): Anti-striated muscle antibody activity produced by *Trypanosoma cruzi*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **172** (3): 364-369.
- Adams, G.E.; Stratford, I.J.; Wallace, R.G.; Wardman, P. y Watts, M.E. (1980): Toxicity of nitro compounds toward hypoxic mammalian cells "in vitro": dependence on reduction potential. J. National Cancer Inst., **64**: 555- 560.
- Adroher, F.J.; Osuna, A. y Lupiañez, J.A. (1991): Phloretin and citrate promote the differentiation rate from epimastigote to metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica, **50** (1): 79-85.
- Adroher, F.J.; Lupiañez, J.A. y Osuna, A. (1988): Influence of saccharides and sodium chloride on growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Cell Differentiation, **22**: 165-170.
- Adroher, F.J.; Osuna, A. y Lupiañez, J.A. (1987): Fructose 1,6-bisphosphatase activity in two *Trypanosoma cruzi* morphological forms. J. Parasitol., **73** (2): 438-441.
- Adroher, F.J.; Osuna, A. y Lupiañez, J.A. (1990): Differential energetic metabolism during *Trypanosoma cruzi* differentiation. II. Hexokinase, phosphofructokinase and pyruvate kinase. Mol. Cell. Biochem., **94** (1): 71-82.
- Albesa, I. y Eraso, A.J. (1983): Primary Isolation of *Trypanosoma cruzi* by Hemoculture. Influence of Glucose Concentration. Am. J. Trop. Med. Hyg., **32**: 963-967.
- Alberts, B.; Bray, D.; Lewis, J.; Raff, M.; Roberts, K. y Watson, J.D. (1983). En: Molecular Biology of the Cell. Nueva York: Garland Publishing.
- Affranchino, J.L.; Sanchez, D.O.; Engel, J.C.; Frasch, A.C.C. y Stoppani, A.O M. (1986): *Trypanosoma cruzi*: Structura and Transcription of Kinetoplast DNA Maxicircles of Cloned Stocks. J. Parasitol., **33** (4): 503-507.
- Alcalde, E.; Maños, L.; Dinares, I.; Valls, N.; Elguero, J.; Escario, J.A.; Martínez, A.R.; Igea, A.; Osuna, A.; Ruiz Perez, L.M. y Cifuentes, J. (1989): New derivatives of 5-nitroimidazole: synthesis and antiparasitic activity. Farmacol. Ed. Cient., **44** (11): 1095-1107.
- Alcina, A. y Fresno, M. (1987): Interacción de *Trypanosoma cruzi* con el sistema inmunitario. Inmunología, **6** (2): 45-55.
- Alcina, A. y Fresno, M. (1987): A colorimetric assay based on cell viability for the indirect detection of intracellular replication and killing of *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol. Methods, **105** (1): 1-8.
- Aldunate, J.; Ferreira, J.; Letelier, M.E.; Repetto, Y. y Morello, A. (1986): t-butyl-4-hydroxy anisole, a novel respiratory chain inhibitor. Effects on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes, FEBS Letters, **195** (1,2): 295-297.
- Aldunate, J.; Coloma-Torres, L.; Spencer, P.; Morello, A.; Ojeda, J.M. y Repetto, Y. (1992): Effects of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) on in situ mitochondria of *Trypanosoma cruzi*. FEBS-Lett., **303** (1): 73-6.
- Aldunate, J.; Ojeda, J.R.; Repetto, Y.; Letelier, M.E. y Spencer, P. (1994): *Trypanosoma cruzi*: trypanocidal effect of 2(3)-tert-butyl-4-hydroxyanisole (BHA) on several strains of epimastigote and trypomastigote forms. Comp. Biochem. Physiol. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol., **119** (2): 119-127.
- Alencar, A.A.; Brito, C.M.; Azevedo, B.A. (1988): The possibility of transmitting Chagas disease by semen: II) Transmission by mating. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **83** (1): 63.
- Alvar, J. (1983): Un caso agudo de Enfermedad de Chagas causado por la inoculación accidental de laboratorio. Laboratorio, **76**: 645-648.
- Alvarenga, N.J. (1977): "Evolução do *Trypanosoma cruzi* no trato digestivo de *Triatoma infestans*". Tesis Doctoral, 55 p. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Alvarez, M.; Cerisola, J.A. y Rohwedder, R.W. (1968): [Immunofluorescence test in the diagnosis of Chagas' diseases]. PBoI Chil. Parasitol., **23** (1): 4-8.
- Alves, M.J.; Aikawa, M. y Nussenzweig, R.S. (1983): Monoclonal antibodies to *Trypanosoma cruzi* inhibit motility and nucleic acid synthesis of culture forms. Infect Immunol., **39**(1): 377-382.
- Allain, D.S. y Kagan, I.J. (1974): An evaluation of the direct agglutination test for Chagas' disease. J. Parasitol., **60**: 179-184.

- Aman, R.A.; Kenyon, G.L.; Wang, C.C. (1985): Cross-linking of the enzymes in the glycosome of *Trypanosoma brucei*. J. Biol. Chem., **260**: 6966-73.
- Amaral, C.F.S.; Tafuri, W.L. y Brener, Z. (1975): Frequencia do parasitismo encefalico em camundongos experimentalmente inoculados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Bras. med. Trop., **9**: 243.
- Amato Neto, V. y Mellone, O. (1959): Estudos sobre a eficacia da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da doença de Chagas em bancos de sangue. Investigaçao em voluntario, receptor de sangue de caso agudo, ao qual foi adicionado o corante. O Hospital, **55**: 343-346.
- Amato Neto, V.; Leonhardt, H. y Souza, H.B.W.T. (1966): Liofilizaçao do plasma: medida capaz de evitar a transmissao da doença de Chagas em bancos de sangue. Revista del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, **8**: 122-124.
- Amato Neto, V.; Doles, J.; Rassi, A.; Borges, A.P.; Rezende, J.M. y Gomes, M.C.O. (1968): Relato de novos casos de transmissao da doença de Chagas por transfusao de sangue. Revista del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, **10**: 46-51.
- Amato Neto, V. y Dias, A.F. (1969): Comentarios sobre caso de transmissao da doença de Chagas por transfusao de sangue e longo periodo de incubação. Revista de la Sociedad Brasileira de Medicina Tropical, **3**: 273-275.
- Amato Neto, V. (1979): "Transmissao por transfusao de sangue", An. Cong. Intern. D. Chagas. Rio de Janeiro, págs. 20-23.
- Amato Neto V. (1988): Post-transfusion Chagas' disease. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo, **43** (3): 135-137.
- Amery, W.K.; De Coster, R. y Caers, I. (1986): Ketoconazole: from a antimycotic to a drug for prostate cancer. Drug Dev. Res., **8**: 299-307.
- Ames, J.R.; Ruyan, M.D.; Klayman, D.L. y Kovacic, P. (1985): Charge transfer and oxyradicals in antimalarial action. Quinones, dapsone metabolites, metal complexes, iminium ions, and peroxides. J. Free Rad. Biol. Med., **1**: 353-361.
- Amuchastegui, P.I.; Moretti, E.R.; Basso, B.; Sperandeo, N. y de Bertorello, M.M. (1990): Isoxazolylnaphthoquinone effects on the growth of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Argent. Microbiol., **22** (4): 199-207.
- Amunarriz, M.; Chico, M.E. y Guderian, R.H. (1991): Chagas disease in Ecuador: a sylvatic focus in the Amazon region. J. Trop. Med. Hyg., **94** (3): 145-149.
- Andrade, S.; Bittencourt, A.L. y Figueira, R.M. (1973): Estudo experimental da amostras de *Trypanosoma cruzi* isoladas de gestantes chagasicas. Rev. Patol. trop., **2**: 301.
- Andrade, S.G.; Silva, R.C. y Santiago, C.M.G. (1989): "Treatment of chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice with MK-436, a 2-substituted 5-nitroimidazole". Boletín de la Organización Mundial de la Salud, **67**: 509-514.
- Andrade, S.G. y Figueira, R.M. (1977): Estudo experimental sobre a açao terapeutica da droga Ro 7-1051 na infecçao par diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. med. Trop. Sao paulo, **19**: 335-341.
- Andrade, S.G.; Figueira, R.M.; Carcalho, M.L. y Gorini, D.F. (1975): Influencia da cepa do *Trypanosoma cruzi* na reposta a terapeutica experimetnal pelo Bay 2502. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **17**: 380-389.
- Andrade, Z.; Andrade, S. (1971): American trypanosomiasis. En: Pathology of Protozoan and Helminthic Disease. Ed. Marcial-Rojas. Williams & Wilkins, Baltimore.
- Andrade, S.G.; Magalhaes, J.B. y Pontes, A.L. (1984): Resultados da quimioterapia com benznidazol e com nifurtimox em camundongos infectados com cepas do *Trypanosoma cruzi* de diferentes tipos de diversas áreas geograficas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **17**: 35.
- Andrade Z.A. (1985): [The pathology of Chagas disease in man] Ann. Soc. Belg. Med. Trop., **65** (1): 15-30.
- Andrade, S.G.; Andrade, Z.A. y Figueira, R.M. (1977): Estudo experimental sobre a resistencia de uma cepa de *Trypanosoma cruzi* ao Bay 2502. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **9**: 124-129.
- Andrade, S.G. (1982): The influence of the strain of *Trypanosoma cruzi* in placental infections in mice. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **76** (1): 123-128.
- Andrade, S.G. y Andrade, Z.A. (1976): Aspectos anatomo-patologicos e resposta terapeutica na infecçao chagastica cronica experimental. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **18**: 268-275.
- Andrade, S.G. y Andrade, Z.A. (1966): [Comparative histopathological study of lesions produced by 2 strains of *Trypanosoma cruzi*]. Hospital (Rio J.), **70** (5): 1267-1278.
- Andrade, Z.A. (1991): Pathogenesis of Chagas' disease. Res. Immunol. Hyg. Organ., **142** (2): 126-129.
- Andrade, S.G.; Andrade, V.; Brodskyn, C.; Magalhaes, J.B. y Netto, M.B. (1985): Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Trop. Med. Parasitol., **79** (4): 397-407.
- Andrade, S.G.; Magalhaes, J.B. y Pontes, A.L. (1985): Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. Bull. World Health Organ., **63**(4):721-726.

- Andrade, S.G.; Freitas, L.A.; Peyrol, S.; Pimentel, A.R. y Sadigursky, M. (1991): Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. Bull. World Health Organ., 69 (2): 191-197.
- Andrade, S.G. (1974): Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Reconcavo Baiano. Rev. Pat. Trop., 1 (3): 65-121.
- Andrade, S.G. y Figueira, R.H. (1970): Caracterização morfo-biológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Gaz. Med., 70: 32-42.
- Andrade, V.; Barral-Netto, M. y Andrade, S.G. (1985): Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. Braz J Med Biol Res., 18 (4): 499-506.
- Andrade, S.G.G. y Figueira, R.M. (1977): Estudo experimental sobre ação terapêutica da droga Ro 7-1051 na infecção por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 19: 335-341.
- Andrade, S.G. (1990): Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., 85 (1): 17-27.
- Andrade, S.G.; Magalhaes, J.B. y Pontes, A.L. (1989): [Therapy of the chronic phase of the experimental infection by *Trypanosoma cruzi* with benzonidazole and nifurtimox]. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 22 (3): 113-118.
- Andrade, S.G.; Silva, R.C.; Santiago, C.M. (1987): Treatment of chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections in mice with MK-436, a 2-substituted 5-nitroimidazole. Bull. World Health Organ., 67 (5): 509-514.
- Andrade, S.G.; Silva, R.C.; Santiago, C.M. y Freitas, L.A. (1987): Therapeutic action of MK-436 (2,5-nitroimidazole) on *Trypanosoma cruzi* infections in mice: a parasitological, serological, histopathological, and ultrastructural study. Bull. World Health Organ., 65 (5): 625-633.
- Andrews, W. y Colli, W. (1982): Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. J. Parasitol., 29 (2): 264-269.
- Andrews, N.W.; Hong, K.; Robbins, E.S. y Nussenzweig, V. (1987): Stage-specific surface antigens expressed during the morphogenesis of vertebrate forms of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol., 64: 474-484.
- Anthony, R.L.; Johnson, C.M. y Sousa, O.E. (1979): Use of micro-ELISA for quantitating antibody of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29: 969-973.
- Apt, W. (1985): [Treatment of Chagas' disease] Rev Med Chil., 113 (2): 162-166.
- Apt, W.; Arribada, A.; Aguilera, X. y Sandoval, J. (1988): Cardiopatía chagásica y zimodemos de *Trypanosoma cruzi* en Chile. Bol. Of. San. Panamer., 104 (5): 450-461.
- Apt., W., Pérez, C. y Sandoval, J. (1980): Prevalencia de la infección chagásica en 4 bancos de sangre de diferentes zonas del país. Revista de Medicina Chilena, 108: 112.
- Aran, V.J.; Bielsa, A.G.; Goya, P.; Ochoa, C.; Páez, J.A.; Stud, M.; Contreras, M.; Escario, J.A.; Jiménez, M.I.; Durán, E.A. y Pueyo de la Cuesta, C. (1986): 3,5-diamino-1,2,6-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives: synthesis and antiparasitic activity. II Farmaco. ed. Sci., XI 11: 862-872.
- Araujo, F.G. y Guptill, D. (1984): Use of antigen preparations of the amastigote stage of *Trypanosoma cruzi* in the serology of Chagas' disease. Am J. Trop. Med. Hyg., 33 (3): 362-371.
- Araujo, F.G.; Heilman, B. y Tighe, L. (1984): Antigens of *Trypanosoma cruzi* detected by different classes and subclasses of antibodies. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 78 (5): 672-677.
- Araujo, F.G. (1985): A method for demonstration of antibodies to *Trypanosoma cruzi* by using antigen-coated nitrocellulose paper strips. Am. J. Trop. Med. Hyg., 34 (2): 242-245.
- Araujo, F.G.; Chiari, E. y Dias, J.C.P. (1981): Demonstration of *T. cruzi* antigen in serum from patients with Chagas' disease. Lancet I, 246-249.
- Arévalo, J.; Panebra, A. y Santa Cruz, C. (1985): Relevance of Hemin for in vitro Differentiation of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., 32: 553-555.
- Arias, A.R.; Ferro, E.A. (1988): Quantification of *Trypanosoma cruzi* parasitaemia by direct micromethod. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82(2): 248.
- Arrick, B.A.; Griffith, O.W. y Cerami, A. (1981): Inhibition of glutathione synthesis as a chemotherapeutic strategy for trypanosomiasis. J. Exp. Med., 153: 72-75.
- Atienza Serna, J. (1994): Cribado farmacológico contra *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* Chagas, 1909. Tesis Doctoral. U.C.M.
- Augusto, O.; Alves, M.J.; Colli, W.; Filardi, L.S. y Brener, Z. (1986): Primaquine can mediate hydroxyl radical generation by *Trypanosoma cruzi* extracts. Biochem-Biophys-Res-Commun., 135 (3): 1029-1034.
- Avila, J.L.; Polegre, M.A. y Roland, K.R. (1986): Action of pyrimidine derivatives on *Trypanosoma rangeli* culture forms. Comp. Biochem. Physiol., 83 C (2): 291-294.

- Avila, J.L.; Bretaña, A.; Casanova, M. A.; Avila, A. y Rodriguez, F. (1979): *Trypanosoma cruzi*: Defined Medium for Continuous Cultivation of Virulent Parasites. Experimental Parasitology, **48**: 27-35.
- Avila, J.L.; Avila, A. y Casanova, M.A. (1981): Differential metabolism of allopurinol and derivatives in *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi* culture forms. Molecular and Biochemical Parasitology, **4** (5/6): 265-272.
- Avila, H.A.; Sigman, D.S.; Cohen, L.M.; Millikan, R.C. y Simpson, L. (1991): Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol., **46** (2): 211-221.
- Avila, J.L.; Avila, A.; Muñoz, E. y Monzon, H. (1983): *Trypanosoma cruzi*: 4-aminopyrazolopyrimidine in the treatment of experimental Chagas' disease. Exp. Parasitol., **56** (2): 236-240.
- Avila, J.L., Avila, A. y Monzon, H. (1984): Differences in allopurinol and 4-aminopyrazolo(3,4-d) pyrimidine metabolism in drug-sensitive and insensitive strains of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., **11**: 51-60.
- Avila, J.L.; Pérez-Kepp, R. y Bretaña, A. (1983): A minimal medium for the cultivation of infective *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Journal of General Microbiology, **129** (2): 285-291.
- Avila, J.L. y Avila, A. (1981): *Trypanosoma cruzi*: Allopurinol in the treatment of mice with experimental acute Chagas disease. Exp. Parasit., **51**: 204-208.
- Avila, J.L. y Avila, A. (1981): *Trypanosoma cruzi*: Nucleotide and Vitamin Requirements of Growing Epimastigotes. Experimental Parasitology, **51**: 318-324.
- Avila, J.L. y Avila, A. (1980): Allopurinol in the treatment of experimental acute Chagas' disease. En Current Chemotherapy and Infectious diseases. Ed. Nelson, J.D.; Grassi C. Amer. Soc. for Microbiol., Washington. Vol. 2: 1121-1123.
- Avila, J.L.; Polegre, M.A. y Robins, R.K. (1987): Biological action of pyrazolopyrimidine derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Studies in vitro and in vivo. Comp. Biochem. Fisiol., **86** C (1): 49-54.
- Avila, J.L. (1983): New rational approaches to Chagas' disease chemotherapy. Inter-ciencia, **8**: 405-417.
- Avila, J.L.; Rojas, M.; Velazquez-Avila, G.; von-der-Mark, H. y Timpl, R. (1986): Antibodies to basement membrane protein nidogen in Chagas' disease and American cutaneous leishmaniasis. J-Clin-Microbiol., **24** (5): 775-778.
- Avila, J.L. y Avila, A. (1987): Defective transport of pyrazolopyrimidine ribosides in insensitive *Trypanosoma cruzi* wild strains is a parasite-stage specific and reversible characteristic. Comp-Biochem-Physiol-B., **87** (3): 489-495.
- Avila, J.L.; Polegre, M.A. y Robins, R.K. (1987): Biological action of pyrazolopyrimidine derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Studies in vitro and in vivo. Comp-Biochem-Physiol-C., **86** (1): 49-54.
- Avila, J.L.; Rojas, T.; Avila, A.; Polegre, M.A. y Robins, R.K. (1987): Biological activity of analogs of guanine and guanosine against American *Trypanosoma* and *Leishmania* spp. Antimicrob-Agents-Chemother., **31** (3): 447-451.
- Ayala, A.; y Kierszenbaum, F. (1987): The effects of p-chloromercuriphenylsulfonic acid on *Trypanosoma cruzi* infection of mammalian host cells in vitro. Mol. Biochem. Parasitol., **23** (1): 63-69.
- Azogue, E.; La Fuente, C. y Darras, C. (1985): Congenital Chagas' disease in Bolivia: epidemiological aspects and pathological findings. Trans. R.Soc. Trop. Med. Hyg. Organ., **79** (2): 176-180.
- Azogue, E. (1982): Transmisión congénita de la enfermedad de Chagas en Santa Cruz, Bolivia, II- Hallazgos patológicos. Bol. Inf. CENETROP, **7**: 19-23.
- Bacchi, C.J. (1981): Content, synthesis and function of polyamines in trypanosomatids: relationship to chemotherapy. Journal of Protozoology, **28**: 20-27.
- Baena, F.; Adroher, F.J. y Osuna, A. (1988): Utilización de sustitutos del suero en cultivos de *Trypanosoma cruzi*. Rev. Ibérica de Parasitol., **47**: 219-222.
- Ballesteros, P.; Claramunt, R.M.; Lopez, M.C.; Elguero, J. y Gomez-Alarcon, G. (1988): Synthesis and antifungal properties of some N,N'-bis-azolyliarymethanes. Chem. Pharm. Bull., **36** (6): 2036-2041.
- Ballesteros, P.; Elguero, J. y Claramunt, R.M. (1985): Reactivity of azoles towards benzaldehyde and its dimethylacetal. Synthesis of N,N'-diazolyliarymethanes. Tetrahedron., **41**: 5955-5963.
- Barbosa, C.A.L. (1988): Estudo da infectividade e imunogenicidade da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* mantida por longo periodo em meio de cultura. Rev. Patol. trop., **17** (1): 25-29.
- Barbosa, W.; Czerewuta, A.C.; Barbosa, C.A. y Oliveira, O.S. de (1988): Nota sobre a variação do comportamento da patogenicidade e imunogenicidade de cepas de *Trypanosoma cruzi* variedade *hastatus* e Y mutante após longo periodo de manutenção em cultura. Rev. Patol. Trop., **17** (1): 1-8.
- Barclay, C.; Cerisola, J.; Lugones, H.; Ledesma, O.; Silva, J. y Mouzo, G. (1978): Aspectos farmacológicos e resultados terapêuticos do Benzonidazol, novo agente quimioterápico para tratamento do Infecção de Chagas. Prensa Med. (Argentina), **65**: 239.
- Barclay, C. (1979): Evolución de la serología y parasitemia en pacientes con infección chagásica tratados con Benzonidazol. II simposio Intern. de Enfermedad de Chagas (Buenos Aires): 18-23.

- Barioglio, S.R.; Lacuara, J.L. y de Oliva P.P. (1987): Effects of clomipramine upon motility of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol., **73** (2): 451-452.
- Barker, R.H. Jr. (1990): DNA probe diagnosis of parasitic infections. Exp. Parasitol., **70** (4): 494-499.
- Barnes, D. y Sato, G. (1980): Methods for growth of cultured cells in serum free medium. Anal. Biochem., **102**: 255-270.
- Barret, T.V.; Mott, K.E.; Miles, M.A.; Godfrey, D.G.; Teixeira, R.; Almeida de Sousa, J.A. y Sherlock, I.A. (1980): Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **74**: 84-90.
- Barret, TV.; Hoff, R.; Mott, KE.; Guedes, F.; Sherlock, IA. (1979): An outbreak of acute Chagas' disease in the Sao Francisco Valley region of Bahia, Brazil: Triatomine vectors and animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. med. Hyg., **73**: 703-709.
- Barrett, P.A.; Beveridge, E.; Bull, D.; Caldwell, I.C.; Islip, P.J.; Neal, R.A. y Woods, N.C. (1982): "The efficacy of a novel compound, (E)-1-(4-bromo-4-biphenyl)-1-(4-clorophenyl)-3-dimethylaminoprop-1-ene against *Trypanosoma cruzi* in mice". Experientia, **38**: 338-339.
- Barvieri Neto, J.S.; Gonçalves, S.; Brandao, S.L.; Rossi, M.N.O. y Ribeiro dos Santos, R. (1984): Benzonidazol e carcinogene: I. Estudo en coelhos. Programas e Resumos de Com. XI Reuniao Anual. Pesquisa basica en Doença de Chagas. FMRP-USP (Brasil), p. 147.
- Baum, S.G.; Wigtner, M.; Madler, J.P.; Horowitz, S.B.; Dennis, J.B.; Schiff, P.B. y Tanowitz, H.B. (1981): "Taxol, a microtubule stabilizing agent, blocks the replication of *Trypanosoma cruzi*". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, **78**: 4.571-4.575.
- Bayles, A.; Waitz, J.A. y Thompson, P.E. (1966): Growth of *Trypanosoma cruzi* in cultures of chick embryo, and effects of fursolidone and tris-(p-Aminophenyl)carbonium chloride. J. Protozol., **136**: 110-114.
- Beach, D.H.; Goad, L.J. y Holz, G.G. Jr. (1986): Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochem-Biophys-Res-Commun., **136** (3): 851-856.
- Beard, C.B.; Young, D.G.; Butler, J.F. y Evans, D.A. (1988): "First isolation of *Trypanosoma cruzi* from a wild-caught *Triatoma sanguisuga* (LeConte) (Hemiptera: Triatominae) in Florida, U.S.A.". Journal Parasitology, **74**: 343-344.
- Belda Neto, F.M.; Ribeiro, R.D.; Pinto, F.H.; Alburquerque, S. y Rosa, J.A. (1987): Comparative study on the behaviour of the infection in mice, through intraperitoneal and subcutaneous inoculations of morphologically distinct subpopulations obtained of a bolivian strain of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **82**: 54.
- Belda Neto, F.M.; Buainain, A.; Oliveira, L.C. y Sousa, D.M. (1988): Estudo da actividade de extratos vegetais sobre formas sanguicolas do *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **83** (1): 176.
- Benavides, G.R.; Hubby, B.; Grosse, W.M.; McGraw, R.A. y Tarleton, R.L. (1995): Construction and use of a multi-competitor gene for quantitative RT-PCR using existing primer sets. J. Immunol. Methods, **181** (2): 145-156.
- Bennett, L.L.; Vail, M.H.; Chumley, S. y Montgomery, J.A. (1966): Activity of adenosine analogs against a cell culture line resistant to 2-fluoroadenine. Biochem. Pharmacol., **15**: 1719-1728.
- Berens, R.L.; Marr, J.J.; LaFon, S.W. y Nelson, D.J. (1981): "Purine metabolism in *Trypanosoma cruzi*". Mol. Biochem. Parasitol., **3**: 187-197.
- Berens, R.L.; Marr, J.J.; da Cruz, F.S. y Nelson, D.J. (1982): "Effect of allopurinol on *Trypanosoma cruzi*: metabolism and biological activity in intracellular and blood stream forms". Antimicrob. Agents Chemother., **22**: 657-661.
- Berens, R.L.; Marr, J.J.; Looker, D.L.; Nelson, D.J. y LaFon, S.W. (1984): Efficacy of pyrazolopyrimidine ribonucleosides against *Trypanosoma cruzi*: studies in vitro and in vivo with sensitive and resistant strains. J. Infect. Dis., **150** (4): 602-608.
- Berkelhammer, G. y Asato, G. (1968): 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole: a new antimicrobial agent. Science, **162**: 1146.
- Berman, J.D.; Goad, J.L.; Beach, D.H. y Holtz, G.G. (1986): Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes in murine macrophage tumor cells. Mol. Biochem. Parasitol., **20**: 85-92.
- Berman, J.D. y Lee, L. (1983): "Activity of 8-aminoquinolones against *Leishmania tropica* within human macrophages in vitro". Am. J. Trop. Med. Hyg., **32**: 753-759.
- Berman, J.D.; Rainey, P.; Santii, D.V. (1983): Metabolism of formycin B by *Leishmania* amastigotes in vitro. J. Exp. Med., **159**: 602-608.
- Berman, J.D. y Lee, L.S. (1983): "Activity of 8-aminoquinolines against *Leishmania tropica* within human macrophages in vitro". Am. J. Trop. Med. Hyg., **32**: 753-759.
- Berman, J.; Oka, D. y Aikawa, M. (1984): "Fine structural alterations in *Trypanosoma rhodesiense* grown in vitro, treated with WR 163577". Journal Protozoology, **31**: 184-186.

- Bertelli, M.S.M. y Brener, Z. (1980): Infection of Tissue Culture Cells with Bloodstream Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol., **66** (6): 992-997.
- Bertelli, M.S. (1975): "Influencia da temperatura na diferenciação intracelular do *Trypanosoma cruzi* em cultura de tecido". Tesis, 88 p. Universidade Federal de Minas Gerais.
- Bettencourt, A.L. (1976): "Congenital Chagas' disease". Am. J. Dis. Child., **130**: 97-103.
- Biou-Marchand, M.; Jadin, J.M.; Steiger, R.F. y Boon, T. (1980): Multiplication of *Trypanosoma cruzi* in a mouse myocardial cell line. Journal of Parasitology, **66** (6): 1050-1052.
- Bitinti, A.J.; Cross-Dorsen, E. y McCann, P.P. (1988): Effects of alpha-difluoromethylornithine on protein synthesis and synthesis of variant-specific glycoprotein (VSG) in *T. brucei brucei*. Biochem. J., **250**: 295-298.
- Bittencourt, A.L. (1984): Actual aspects and epidemiological significance of congenital transmission of Chagas' disease. Mem. Inst. O. Cruz., **79**: 133-137.
- Bittencourt, A.L.; Mota, E. y Pova M. (1985): Isoenzyme characterization of *Trypanosoma cruzi* from congenital cases of Chagas' disease. Ann. Trop. Med. Parasitol., **79** (4): 393-396.
- Bittencourt, A.L.; Sadigursky, M.; Da Silva A.A.; Menezes, C.A.; Marianetti M.M.; Guerra, S.C. y Sherlock, I. (1988): Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., **83** (1): 37-39.
- Blanc, D.; Nicholls, R. y Sargeant, P.G. (1989): Experimental production of new zymodemes of *Entamoeba histolytica* supports the hypothesis of genetic exchange. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **83**: 787-790.
- Blanco, A.; Aoki, A.; Montamat, E. y Roval, L. (1983): Effect of gossypol upon motility and ultrastructure of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., **30** (4): 648-651.
- Boainain, E.; Pereira, V.L.; Levy, A.M.A.; Barboza, C.M.; Ramos, M.C. (1990): Tentativa do tratameto específico da doença de Chagas na fase crônica com allopurinol riboside. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., **85** (1): 101.
- Bock, M.; Habekorn, A.; Herlinger, H.; Mayer, K.H. y Petersen, S. (1972): The structure-activity relationship of 4-(5-nitrofururylidene-amino)-tetra-hydro-4H-1,4-thiadiazine-1,1-dioxides active against *Trypanosoma cruzi*. Arzmittelforsch., **22**: 1564-1569.
- Bodley, A.L. y Shapiro, T.A. (1995): Molecular and citotoxic effects of camptothecin, a topoisomerase inhibitor, on trypanosomes and Leishmania. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **92** (9): 3726-3723.
- Boianain, E. (1979): Tratamento etiológico da doença de Chagas na fase crônica. Rev. Goiana Med., **25**: 1-60.
- Bogitsh, B.J.; Ribeiro Rodrigues, R. y Carter, C.E. (1995): In vitro effects of mannan and cytochalasin B on the uptake of horseradish peroxidase and (1-4C) sucrose by *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. J. Parasitol., **81** (2): 144-148.
- Boker, C.A. y Schaub, G.A. (1984): Scanning electron microscopic studies of *Trypanosoma cruzi* in the rectum of its vector *Triatoma infestans*. Z. Parasitenkd., **70**(4): 459-469.
- Bonaldo, M.C.; Souto-Pradon, T.; de Souza, W.; Goldenberg, S. (1988): Cell-substrate adhesion during *Trypanosoma cruzi* differentiation. J. Cell. Biol., **106** (4): 1349-1358.
- Bongertz, V. y Pontes de Carvalho, L.C. (1992): Production of monoclonal antibodies for the identification of a strain of *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg., **46** (4): 435-439.
- Borges, J.; Faraco, H.O.; Brisola, C. y Rodrigues, J. (1989): Parasitemia en pacientes chagasicos crônicos avaliada pelo índice de triatomíneos infectados no xenodiagnóstico. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **22** (1): 39-44.
- Bories, C.; Durand, R.; Deniau, M.; Vincendeau, P.; Liouzeau, P.; Houin, R.; Gayral, P.; Bailland, O.; Couvreur, P. (1991): Nouvelles données sur la spécificité de l'effet antiparasitaire in vitro d'un vecteur particulier, les nanoparticules de cyanoacrylate d'isobutyle. Bull. Soc. Franç. Parasitol., **9**: 225-232.
- Boschetti, M.A.; Piras, M.M.; Henriquez, D.; Piras, R. (1987): The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. Mol. Biochem. Parasitol., **24** (2): 175-184.
- Boveris, A.; Stoppani, A.O.M.; Docampo, R. y Cruz, F.S. (1978): "Superoxide anion production and trypanocidal action of naphthoquinones on *Trypanosoma cruzi*". Comp. Biochem. Parasitol., **61**: 327-329.
- Boveris, A.; Sies, H.; Martino, E.E.; Docampo, R.; Turrens, J.F. y Stoppani, A.O.M. (1980): "Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*". Biochem. J., **188**: 643-648.
- Boveris, A.; Docampo, R.; Turrens, J.F. y Stoppani, A.O.M. (1978): "Effects of β -lapachone on superoxide anion and hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*". Biochem. J., **175**: 431-439.
- Bradford, M.M. (1976): A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Ann. Biochem., **72**: 248.
- Brack, C. (1968): Elektroenmikroskopische untersochungen zum lebenszyklus von *Trypanosoma cruzi*. Acta Tropica, **25**: 289-356.

- Braga, E.M.; Galvao, L.M.C.; Chiari, E. y Martins, M.S. (1990): Preliminary characterization of tissue culture derived trypomastigotes of three clones isolated from the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **85** (1): 2.
- Brashear, R.J.; Winkler, M.A.; Schur, J.D.; Lee, H.; Burczak, J.D.; Hall, H.J. y Pan, A.A. (1995): Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern and western United States. Evaluation of the sensitivity and specificity of an enzyme immunoassay for detecting antibodies to *T. cruzi*. Transfusion, **35** (3): 213-218.
- Brass, C.; Galgani, J.N.; Blasche, T.F.; Defelice, R.; O'Reilly, R.A. y Stevens, D.A. (1982): Disposition of ketoconazole, an oral antifungal, in humans. Antimicrob. Agents Chemother., **21**: 151-158.
- Brener, Z. (1962): Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **4** (6): 389-396.
- Brener, Z. (1979): "Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western hemisphere". Pharmacol. Ther., **7**: 71-90.
- Brener, Z. (1982): Recent developments in the field of Chagas' disease. Bull. World Health Organ., **60** (4): 463-473.
- Brener, Z. (1971): Study of the action of some active drugs against *Trypanosoma cruzi* blood forms. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **13** (4): 302-306.
- Brener, Z.; Chiari, E. (1967): Susceptibilidades de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a varios agentes quimioterápicos. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **9**: 197-207.
- Brener, Z. (1973): "Biology of *Trypanosoma cruzi*". Ann. Rev. Microbiol., **27**: 347-382.
- Brener, Z. (1976): Significance of morphologic variation of bloodstream forms. En: American Trypanosomiasis Research. OMS Publ. Cient. N° 318, Washington: 127-131.
- Brener, Z. (1969): The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. Ann. Trop. Med. Parasitol., **63** (2): 215-220.
- Brener, Z. (1984): Recent advances in the chemotherapy of Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **79**: 149-155.
- Brener, Z. (1967): Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas. Tesis Doctoral, Fac. Farm. Odonto. Univ. Minas Gerais. Belo Horizonte.
- Brener, Z. y Chiari, E. (1971): "The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas' disease". Transactions of the Royal Society of Medicine and Hygiene, **65**: 629-636.
- Brener, Z. (1972): A new aspect of *Trypanosoma cruzi* life-cycle in the invertebrate host. J. Protozool., **19** (1): 23-27.
- Brener, Z. (1973): Biology of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Rev. Microbiol., **27**: 347-382.
- Brener, Z. (1966): Chemotherapeutic studies in tissue cultures infected with *Trypanosoma cruzi*: the mode of action of some active compounds. Ann. Trop. Med. Parasitol., **60**: 441-451.
- Brener, Z. (1985): Host-parasite relations in Chagas disease: mechanisms of infection and disease. Ann. Soc. Belg. Med. Trop., **65** (1): 9-13.
- Brener, Z. (1961): Atividade terapêutica do 5-nitro-1-furaldeído-semicarbazona (nitrofurazona) em esquemas de duração prolongada na infecção experimental de camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **3**: 43-49.
- Brener, Z.; Costa, C.A.S.G. y Chiari, E. (1976): Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **11**: 245-249.
- Brener, Z. y Chiari, E. (1965): Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. J. Parasitol., **51**: 922-926.
- Brener, Z. (1987): Laboratory-acquired Chagas disease: comment [letter]. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **81** (3): 527.
- Breniere, S.F.; Tibayrenc, M.; Antezana, G.; Pabon, J.; Carrasco, R.; Selaes, H. y Desjeux, P. (1985): Preliminary results suggesting a tenuous or nonexistent relation between clinical forms of Chagas disease and isoenzyme strains of *Trypanosoma cruzi*. C.R. Acad. Sci. III., **300** (15): 555-557.
- Breniere, S.F.; Carrasco, R.; Miguez, H.; Lesmere, J.L. y Cartier, Y. (1985): Comparisons of immunological test for serodiagnosis of Chagas' disease in Bolivian patients. Trop. Geogr. Med., **37**: 231-238.
- Briceño-León, R. (1987): Rural housing for control of Chagas' disease in Venezuela. Parasitol. Today, **3** (12): 384-387.
- Britto, C.; Cardoso, M.A.; Yanno, C.M.; Hasslocher Moreno, A.; Xavier, S.S.; Oelemann, W.; Santoro, A.; Pirmez, C.; Morel, C.M. y Wincker, P. (1995): Polymerase chain reaction of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. Parasitology, **110** (3): 241-247.
- Brujin, M.M.L. (1988): Diagnostic DNA Amplification No Respite for the Elusive Parasite. Parasitology Today, **4** (10): 293-295.

- Brumpt, E. y Silva, P. da (1912): Existence du *Schizotrypanum cruzi* (Chagas, 1909), à Bahia. Biologie du *Conorhinus megistus*. Bol. Soc. Pathol. Exot., 5: 22-26.
- Brun, R. y Jenni, L. (1985): Cultivation of African and South American Trypanosomes of Medical or Veterinary Importance. British Medical Bulletin, 41: 122-129.
- Brun, R. y Lion, W. (1978): "Effect of ethidium bromide on growth and morphology of *Leishmania tarentolae* promastigotes in vitro". Acta Tropica, 35: 239-246.
- Buainain, A.; Pozetti, G.L. y Belda Neto, F.M. (1988): Estudo da actividade de extratos vegetais sobre o desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi* cultivado em meio de Warren. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83 (1): 177.
- Budzko, D.B. y Kierszenbaum, F. (1974): Isolation of *Trypanosoma cruzi* from Blood. The Journal of Parasitology, 60: 1037-1038.
- Bueren, J. Van; Hodson, S.; Miles, M.A. y Neal, R.A. (1989): Zymodeme analysis of laboratory strains of *Trypanosoma cruzi* in relation to drug susceptibility. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 83 (2): 207.
- Burden, E.J.; Racette, E. (1968): 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole: a new antimicrobial agent. IX. Action against hemoflagellate infections in laboratory animals. Antimicrobial Agents Chemother., 7: 545-547.
- Burgos, C.; Gerez de Burgos, N.M.; Rovai, L.E. y Blanco, A. (1986): "In vitro inhibition by gossypol of oxidoreductase from human tissues". Biochem. Pharmacol., 35: 801-804.
- Burgos, M.H.; Gutierrez, L.S.; Lammel, E. y de Isola, E.L.D. (1989): Midgut extract rich in peritrophic membrane from *Triatoma infestans* induces differentiation of *Trypanosoma cruzi*. Microscopia Electrónica y Biología Celular, 13 (2): 151-165.
- Burkholder, J.E.; Allison, T.C. y Kelly, V.P. (1980): *Trypanosoma cruzi* (Chagas) (Protozoa: Kinetoplastida) in invertebrate, reservoir and human hosts of the lower Rio Grande valley of Texas. J. Parasitol., 66: 305.
- Cabeza-Meckert, P.; Chambo, J.G. y Laguens, R.P. (1988): Differences in resistance to reinfection with low and high inocula of *Trypanosoma cruzi* in chagasic mice treated with nifurtimox and relation to immune response. Antimicrob. Agents Chemother., 32 (2): 241-245.
- Cabeza-Meckert, P.M.; Chambo, J.G. y Laguens, R.P. (1988): Modification of the pattern of infection and evolution of cardiopathy in experimental Chagas' disease after treatment with immunosuppressive and trypanocidal drugs. Medicina B. Aires, 48 (1): 7-11.
- Calderón, R.O. (1986): *Trypanosoma cruzi*: Variable Fusogenic Ability by Different Growth Phases of the Epimastigote Form. Experimental Parasitology, 62: 453-455.
- Camargo, M.E. (1966): "Fluorescent antibody test for the diagnosis of american trypanosomiasis: Technical modifications employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test". Revista del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 8: 227-234.
- Camargo, M.E. (1988): American Trypanosomiasis (Chagas' disease). En Laboratory diagnosis of infectious diseases. Vol. I. Bacterial, mycotic and parasitic diseases. Ed.: Balows, A.; Hausler, W.J.; Ohashi, M.; Turano, A., Springer-Verlag New York Inc., Nueva York. p. 744-753.
- Camargo, M.E. y Rebonato, C. (1969): Cross-reactivity in fluorescence tests for *Trypanosoma* and *Leishmania* antibodies. A simple inhibition procedure to ensure specific results. Am. J. Trop. Med. Hyg., 18 (4): 500- 505.
- Camargo, E.P. (1964): Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. Rev. Ins. Med. Trop. Sao Paulo, 6: 93-100.
- Campos-Neto, A.; Lima, F.W.M. y Andrade, A.F.B. (1985): Purification of Tissue Forms (Amastigotes) of *Trypanosoma cruzi* by Immunoaffinity Chromatography. J. Protozool., 32 (1): 84-88.
- Canal, F.E. y Loo, E.F. (1978): Un tercio de siglo tratando la enfermedad de Chagas-Mazza con diferentes drogas: Evaluación de los resultados. Pren. Med. Argentina, 65: 222-228.
- Cançado, J.R.; Marra, U.D.; Lopes, M.; Mourao, O.; Faria, C.A.; Alvares, J.M. y Salgado, A.A. (1969): Toxicity and therapeutic value of Bay 2502 in chronic Chagas' disease in 3 dosage schemes. Bol. Chil. Parasitol., 24 (1): 28-32.
- Cançado, R. (1985): Tratamiento específico. En: Cardiopatía Chagásica. Ed. Cançado, R. y Chuster, M. Fundação Carlos Chagas, Belo Horizonte. p. 327-355.
- Cançado, J.R.; Salgado, A.A.; Batista, S.M. y Chiari, C. (1976): Segundo ensaio terapeutico com nifurtimox na doença de Chagas. Rev. Goiana Med., 22: 203-208.
- Cançado, J.R.; Salgado, A.A.; Marra, M.D.; Alvarez, J.M. y Machado, J.R. (1975): Ensaio terapeutico clinico na doença de Chagas cronica com nifurtimox em tres esquemas de duração prolongada. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 17: 111-117.
- Canoira, L.; Gonzalo Rodriguez, J.; Subirats, J.B.; Escario, J.A.; Jimenez, I.; Martinez-Fernandez, A.R. (1989): Synthesis, structure and anti-fungal activity of 3-2'-nitrovinyl)indoles. Eur. J. Med. Chem., 24: 39-42.

- Cardoso, J.E.; Queiroz, R.O.; Grandi, T.S.M.; de Oliveira, A.B. y Zani, C.L. (1990): In vitro activity of extracts from compositae plant species against blood forms of *Trypanosoma cruzi*, strain Y. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **85** (1): 102.
- Came, M. y Dvorak, J.A. (1982): *Trypanosoma cruzi*: Spontaneous Transformation by Y Strain Variant in a Liquid Medium. Experimental Parasitology, **54**: 87-92.
- Carneiro, M.; Romanha, A.J. y Chiari, E. (1991): Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **86** (4): 387-393.
- Carpintero, D.J. (1983): Use of thiocetic acid for prevention of the adverse effects induced by benznidazole in patients with chronic Chagas' infection. Medicina (B Aires), **43** (3): 285-290.
- Carrasco, R.; Míguez, H.; Camacho, C.; Echalar, L.; Revollo, S.; Ampuero, T. y Dedet, J.P. (1990): Prevalence of *Trypanosoma cruzi* infection in blood banks of seven departments in Bolivia. Memorias del Instituto Oswaldo Cruz, **85** (1): 69-73.
- Carrasco-Guerra, H.A.; Palacios-Pru, E.; Dagert-de-Scorza, C.; Molina, C.; Inglessis, G. y Mendoza, R.V. (1987): Clinical, histochemical, and ultrastructural correlation in septal endomyocardial biopsies from chronic chagasic patients: detection of early myocardial damage. Am. Heart J., **113** (3): 716-724.
- Carson, D.A. y Chang, D.P. (1981): Phosphorylation and anti-Leishmanial activity of Formycin B. Biophys. Res. Comm., **100**: 1377-1383.
- Carvalho, R.; Meirelles, Souza, V. y León, W. (1981): Isolation of the intracellular stage of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with mouse macrophages in vitro. Infection and Immunity, **33** (3): 546-554.
- Carvalho, T.L.; Ribeiro, R.D. y Lopes, R.A. (1991): The male reproductive organs in experimental Chagas' disease. Morphometric study of the vas deferens in the acute phase of the disease. Exp. Pathol., **41**(4): 203-214.
- Carvalho, T.V. y Souza, W. (1983): Separation of amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from cultured cells. Z. Parasitenkd., **69** (5): 571-575.
- Carvalho, T.U. y Souza, W. (1987): Effect of phorbol-1-2-myristate-13-acetate (PMA) on the fine structure of *Trypanosoma cruzi* and its interaction with activated and resident macrophages. Parasitol. Res., **74**: 11-17.
- Castanys, S.; Osuna, A.; Gamarro, F. y Ruiz-Pérez, L.M. (1984): Purification of Metacyclic Forms of *Trypanosoma cruzi* by Percoll Discontinuous Gradient Centrifugation. Z. Parasitenkd., **70**: 443-449.
- Casrellano, O.; Ribeiro, L.V. y Fernandes, J.F. (1967): Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. J. Protozool., **14**: 447-451.
- Castellano, P. y Martínez de Bertorello, M. (1989): Copolymer of sucrose and naphthoquinone imine derivatives. Synthesis and characterization. Polymer Bulletin, **22** (1): 41-45
- Castilla, M.M.; Santos-Gomez, M.; Guzman-Bracho, C. y Bautista-Garfias, C.R. (1988): A new method for diagnosis of Chagas' disease: diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay. J. Parasitol., **74**(5): 805-809.
- Castrillon Rivera, L.E.; Garcia Fernandez, W. y Perez Gutierrez, C. (1984): The therapeutic effect of allopurinol on American trypanosomiasis (Chagas disease) in CFW mice. Salud Publica Mex., **26** (2): 146-54.
- Castro, S.L. de y Meirelles, M.N.L. (1990): Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivative upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **85** (1): 95-99.
- Castro, G.D.; Lopez, A. y Castro, J.A. (1988): Evidence for hydroxyl free radical formation during paraquat but not for nifurtimox liver microsomal biotransformation. A dimethyl-sulfoxide scavenging study. Arch-Toxicol., **62** (5): 355-358.
- Castro, J.A. y Diaz de Toranzo, E.G. (1988): Toxic effects of nifurtimox and benznidazole, two drugs used against American trypanosomiasis (Chagas' disease). Biomed. Environ. Sci., **1** (1): 19-33.
- Cataldi de Flombaum, M.A.; Stoppani, A.O. (1986): Effects of ethidium bromide on the mitochondrial adenosine triphosphatase from *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Int., **12** (4): 513-519.
- Cataldi de Flombaum M.A. y Stoppani, A.O. (1986): Inactivation of mitochondrial adenosine triphosphatase from *Trypanosoma cruzi* by oxygen radicals. Biochem. Int., **12** (6): 785-793.
- Cavalcante, M.D.A. (1987): Blood transfusion and transplacental transmission modes of Chagas' disease in Brazil. Rev. Patol. Trop., **16** (2): 153-193.
- Caviedes, F.; Ovseiovich, R. y Rubio, J. (1994): A simple method to separate metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* from axenic cultures. Acta Trop., **58** (2): 175-177.
- Cavin, J.C.; Krassner, S.M. y Rodriguez, E. (1987): Plant-derived alkaloids active against *Trypanosoma cruzi*. J. Ethnopharmacol., **19** (1): 89-94.
- Celentano, A.M. y González Cappa, S.M. (1988): Enfermedad de Chagas y transfusión sanguínea: Actividad tripanocida del clorhidrato de maprotilina y del violeta de genciana. Medicina (Buenos Aires), **48**: 265-268.

- Centurion Lara, A.; Barret, L. y Van Voorhis, W.C. (1994): Quantitation of parasitemia by competitive polymerase chain reaction simplification of parasite kDNA minicircles during chronic infection with *Trypanosoma cruzi*. *QJ. Infect. Dis.*, 170 (5): 1334-1339.
- Cerisola, J.A.; Alvarez, M.; Lugones, H. y Rebosolan, J.B. (1968): Sensibilidad de las reacciones serológicas para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasitol.*, 24: 2-8.
- Cerisola, J.A.; Da Silva, N.N.; Prata, A.; Schenone, H. y Rohwedder, R. (1977): Evaluación mediante xenodiagnóstico de la efectividad del Nifurtimox en la infección chagásica crónica humana. *Bol. Chile. Parasit.*, 32: 51.
- Cerisola, J.A.; Rabinovich, A.; Alvarez, M.; Corieto, C.A. y Pruneda, J. (1972): Enfermedad de Chagas y la transfusión de sangre. *Bull. Pan American Health Organization*, 73: 203-221.
- Ceron, C.R., Caldas, R.D.A., Felix, C.R., Mundim, M.H. y Roitman, I. (1979): Purine metabolism in trypanosomatids. *J. Protozool.*, 29: 479-483.
- Civita, E.; Salvatella, R.; Mancebo, R.; Rosa, R.; Basmadjian, Y.; Mendaro, G.; Fernandez, H.; Cercetto, S.; Paulon, M. y Stoppani, A.O.M. (1991): Acción de nitorfuranos de síntesis sobre modelo murino de infección por *Trypanosoma cruzi*. *Seminario Taller, Programa de Biología Parasitaria, Universidad de la República, Montevideo-Uruguay, 1991.*
- Clarke, E.D.; Goulding, K.H. y Wardam, P. (1982): Nitorimidazole as anaerobic electron acceptors for xanthine oxidase. *Biochem. Pharmacol.*, 31: 3237-3242.
- Clarkson, A.B.; Brohn, F.H. (1976): Trypanosomiasis: an approach to chemotherapy by the inhibition of carbohydrate catabolism. *Science*, 194: 204-206.
- Cohen, S.M.; Erturk, E.; Von Esch, A.M.; Crovetti, A.J. y Bryan, G.T. (1973): Carcinogenicity of 5-nitrofurans, 5-nitorimidazoles, 4-nitrobenzenes, and related compounds. *J. Nat. Cancer Inst.*, 51: 403-417.
- Coloma, L. (1989): "Respiración celular de *Trypanosoma cruzi*. Efecto de antioxidantes fenólicos". Tesis de Magister en Ciencias Biológicas. Facultad de Medicina, Universidad de Chile.
- Concepcion, J.L.; Lopez, N. y Dagert, M. (1990): Obtention of *Trypanosoma cruzi* clones of thin and thick epimastigotes and trypomastigotes living in the blood on various agar media. *Rev. Cubana Med. Trop.*, 42 (2): 167-177.
- Contreras, V.T.; Morel, C.M. y Goldenberg, S. (1985): Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 14 (1): 83-96.
- Contreras, V.T.; Salles, J.M.; Thomas, N.; Morel, C.M. y Goldenberg, S. (1985): In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 16: 315-327.
- Contreras, V.T.; Araujo Jorge, T.C.; Bonaldo, M.C.; Thomaz, N.; Barbosa, H.S.; Meirelles, M.N. y Goldenberg, S. (1988): Biological aspects of the Dm 28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 83 (1): 123-133.
- Contreras, V.T.; Araque, W. y Delgado, V.S. (1994): *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis in vitro. Changes in the properties of metacyclic trypomastigotes maintained in the laboratory by different methods. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 89 (2): 253-259.
- Cornelissen, F. y Van den Bossche, H. (1983): Synergism of the antimicrobial agents miconazole, bacitracin and polymyxin B. *Chemotherapy*, 29: 419-427.
- Corral, R.S.; Om, A. y Grinstein S. (1992): Detection of soluble exoantigens of *Trypanosoma cruzi* by a dot-immunobinding assay. *Am J. Trop. Med. Hyg.*, 46 (1): 31-38.
- Corral, R.S.; Om, A.A.; Freilij, H.L.; Bergman, T. y Grinstein, S. (1989): Purification and characterization of an 80-kilodalton *Trypanosoma cruzi* urinary antigen. *J. Clin. Microbiology*, 27: 145-151.
- Coura, J.R.; Nogueira, E.S. y da Silva, J.R. (1966): Indices de transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue de doadores na fase crónica da doença. *Hospital*, 69: 991-994.
- Cover, B. y Gutteridge, W.E. (1982): A primary screen for drugs to prevent transmission of Chagas's disease during blood transfusion. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76 (5): 633-635.
- Crane, M.S.T. y Dvorak, J.A. (1980): *Trypanosoma cruzi*: pattern of RNA synthesis following infection of vertebrate cells. *J. Protozool.*, 27 (3): 336-338.
- Crane, M.S. y Dvorak, J.A.: *Trypanosoma cruzi*: spontaneous transformation by a Y strain variant in liquid medium. *Exp. Parasitol.*, 54 (1): 87-92.
- Croft, S.L. y Hogg, J. (1988): Limited activity of bacterial DNA topoisomerase II inhibitors against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi* amastigotes in vitro. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 82: 856.
- Croft, S.L.; Walker, J.J. y Gutteridge, W. (1988): Screening of drugs for rapid activity against *Trypanosoma cruzi* -- trypomastigotes in vitro. *Tropical Medicine and Parasitology*, 39: 145-148.
- Cruz, F.S.; Marr, J.J. y Berens, R.L. (1980): Prevention of transfusion-induced Chagas' disease by amphotericin B. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 29: 761-765.

- Cruz, F.S.; Docampo, R. y De Souza, W. (1978): Effect of β -lapachone on hydrogen peroxide production in *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. (Basel), **53**: 35-40.
- Cruz, F.S.; Lopes, L.A.; De Souza, W.; Moreno, S.N.; Mason, R.P. y Docampo R. (1984): The photodynamic action of rose bengal on *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. (Basel), **41** (2): 99-108.
- Cuhna, W.R.; Rodriguez, C.; Torrico, F.; Afchain, D.; Loyens, M. y Desjeux, P. (1989): Evaluation of a competitive antibody enzyme immunoassay for specific diagnosis of Chagas' disease.: J. Parasitol., **75** (3): 357-359.
- Chabala, J.C.; Waits, V.B.; Ikeler, T.; Patchett, A.A.; Payne, L.; Peterson, L.H.; Reamer, R.A.; Hoogsteen, K.; Wyvratt, M.; Hanson, W.L. (1991): 1-(substituted)benzyl-5-aminoimidazole-4-carboxamides are potent orally active inhibitors of *Trypanosoma cruzi* in mice. Experientia, **47** (1): 51-53.
- Chaffe, E.F.; Fife, E.H. y Kent, J.F. (1956): Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* infection by complement fixation. Am. J. Trop. Med. Hyg., **5**: 763-777.
- Chagas, C. (1909): Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **1**: 159-218.
- Chagas, C. (1912): Sobre um tripanosoma do tatu, *Tatusia novemcincta*, transmitido pelo *Triatoma geniculata* (Latr. 1.811). Brazil Med., **26**: 305-306.
- Chagas, C. (1934): Estado actual da tripanosomíase Americana. Rev. Biol. Hyg. Sao Paulo, **5**: 58.
- Chagas, C. (1916): Trypanosomíase americana: forma aguda da molestia. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **8**: 37-60.
- Chao, D.; Lotz, J.M. y Dusanic, D.G. (1984): Infection of Rodent Myeloma Y3-Ag 1.2.3 Cells by *Trypanosoma cruzi* Metacyclic Trypomastigotes. J. Parasitol., **70** (6): 1005-1007.
- Chiari, E. y Howells, M. (1975): Observations on two strains of *Trypanosoma cruzi* in laboratory mice. Ann., **69** (11): 435-448.
- Chiari, E.; de Oliveira, A.B.; Raslan, D.S.; Mesquita, A.A. y Tavares, K.G. (1991): Screening in vitro of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **85** (3): 372-374.
- Chiari, E. (1976): Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. En: American Trypanosomiasis Research. O.M.S. Publ. Cient. N° 318 Washington: 144-145.
- Chiari, E.; Dias, J.C.; Lana, M.; y Chiari, C.A. (1989): Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **22** (1): 19-23.
- Chowdhury, M.N. y Fistein, B. (1986): Excretion of *Trypanosoma cruzi* by various stages of *Rhodnius prolixus*. Int. J. Parasitol., **16** (4): 353-359.
- Chuit, R.; Paulone, I.; Wisnivesky Colli, C.; Bo, R.; Perez, A.C.; Sosa Stani S. y Segura, E.L. (1992): Result of a first step toward community-based surveillance of transmission of Chagas' disease with appropriate technology in rural areas. Am. J. Trop. Med. Hyg., **46** (4): 444-450.
- D'Alessandro, A.; Barreto, P.; Saravia, N. y Barreto, M. (1984): Epidemiology of *Trypanosoma cruzi* in the oriental plains of Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg., **33** (6): 1084-1095.
- Daneshmend, T.K.; Warnock, D.W.; Turner, A. y Roberts, C.J.C. (1981): Pharmacokinetics of ketoconazole in normal subjects. J. Antimicrob. Chemother., **8**: 299-304.
- Darling, T.N. y Blum, J.J. (1988): D-lactate production by *Leishmania braziliensis* through the glyoxalase pathway. Mol. Biochem. Paras., **28**: 121-128.
- Darling, T.N.; Davis, D.G.; London, R.E. y Blum, J.J. (1987): Proeducts of *Leishmania braziliensis* glucose catabolism: Release of D-lactate and, under anaerobic conditions, glycerol. Procc. Nat. Ac. Sci. USA, **84**: 7129-7133.
- Darling, T.N.; Balber, A.E. y Blum, J.J. (1988): A comparative study of D-lactate, L-lactate and glycerol formation by four species of *Leishmania* and by *Trypanosoma lewisi* and *T. brucei gambiense*. Mol. Biochem. Paras., **30**: 253-258.
- De Acebedo, H.P. y Roitman, I. (1977): Growth of de Y strain of *Trypanosoma cruzi* in an HX25-modified medium. J. Parasitol., **63**: 485.
- De Arruda, M.V., Colli, W. y Zingales, B. (1989): Terminal β -D-galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells. Eur. J. Biochem., **182**: 413-421.
- De Castro, C.R.; Diaz de Toranzo, E.G. y Castro, J.A. (1992): Benzimidazole-induced ultrastructural alterations in rat adrenal cortex. Mechanistic studies. Toxicology, **74** (2-3): 223-232.
- De Castro, C.R.; De Toranzo, E.G.; Carbone, M. y Castro, J.A. (1990): Ultrastructural effects of Nifurtimox on rat adrenal cortex related to reductive biotransformation. Exp-Mol-Pathol., **52** (1): 98-108.
- De Castro, S.L.; Meirelles, M.N. y Oliveira, M.M. (1987): *Trypanosoma cruzi*: adrenergic modulation of cyclic AMP role in proliferation and differentiation of amastigotes in vitro. Exp. Parasitol., **64** (3): 368-375.

- De Castro, S.L. y De Meirelles, M.N. (1987): Effect of drugs on *Trypanosoma cruzi* and on its interaction with heart muscle cell "in vitro". Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **82** (2): 209-218.
- De Castro, S.L. y Meirelles, M.N. (1990): Mechanism of action of a nitroimidazole-thiadiazole derivate upon *Trypanosoma cruzi* tissue culture amastigotes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **85** (1): 95-99.
- De Diego, J.A.; Penin, P.; Del Rey, J.; Mayer, R. y Gamallo, C. (1991): A comparative pathological study of three strains of *Trypanosoma cruzi* in an experimental model. Histol. Histopathol., **6** (2): 199-206.
- De Diego, J.A.; Penin, P.; Mayer, F.; Del Rey, J. y Gamallo, C. (1991): The application of the statistical study in the morphometric characterization of a Colobian strain of *Trypanosoma cruzi*. Ann. Parasitol. Hum. Comp., **66** (1): 3-8.
- De Diego, C.; Avendaño, C.; Alcina, A.; Carrasco, J. y Elguero, J. (1988): Effect of heterocyclic analogues of triphenylmethane dyes against *Trypanosoma cruzi*. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, **82** (3): 235-241.
- De las Heras, F.G.; Camarasa, M.J.; Martinez-Fernandez, A.R.; Escario, J.A. (1984): Synthesis and cytostatic and trichomonacide activities of 1-glucosyl-nitro-1,2,4-triazoles. Eur. J. Med. Chem., **19** (1): 89-92.
- De Marchi, J.M. (1990): The Polymerase Chain Reaction. Clinical Microbiology Newsletter, **12** (11): 81-84.
- De Souza, W.; Arguello, C.; Martinez-Palomo, A.; Trissi, D.; Gonzalez-Robles, A. y Chiari, E. (1977): Surface charge of *Trypanosoma cruzi*. Binding of cationized Ferritin and measurement of cellular electrophoretic mobility. J. Protozool., **24**: 411-415.
- De Souza, W.; De Carvalho, T.U.; Benchimol, M. y Chiari, E. (1978): *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural, cytochemical and freeze-fracture studies of protein uptake. Exp. Parasitol., **45**: 101-115.
- De Souza, W. (1981): Ultra-estrutura do *Trypanosoma cruzi*. Ciencia e Cultura, **31**: 35-47.
- De Souza, W. (1984): Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. Int. Rev. Cytol., **86**: 197-283.
- De Souza, W. y Meyer, H. (1974): On the fine structure of the nucleus on *Trypanosoma cruzi* in tissue culture forms. Spindle fibers in the dividing nucleus. J. Protozool., **21**: 48-52.
- De Souza, H.M. (1986): Metabolism and preservation of fresh and stored blood treated with gentian violet (letter). Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **19** (2): 119.
- De Souza, H.M. (1989): The present state of chemoprophylaxis in transfusional Chagas' disease [editorial]: Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **22** (1): 1-3.
- Dedet, J.P.; Chippaux, J.P.; Goyot, P.; Pajot, F.X.; Tibayrenc, M.; Geoffroy, B.; Gosselin, H. y Jacquet-Violet, P. (1985): Natural hosts of *Trypanosoma cruzi* in French Guiana. High endemicity of zymodeme 1 in wild marsupials. Ann. Parasitol. Hum. Comp., **60** (2): 111-117.
- Degrave, W.M.; Thiemann, O.; Gonçalves, A.M.; Sturm, N.; Simpson, L y Morel, C.M. (1991): Development of tools for diagnosis and epidemiological studies of Chagas disease: detection and strain typing. En: Molecular and immunological aspects of parasitism. Ed Wang, C.C. Eashington, 177-185.
- Delain, E.; Brack, C.; Riou, G. y Festy, B. (1971): Ultrastructural alterations of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast induced by the interaction of a trypanocidal drug (hydroxystilbamidine) with the kinetoplast DNA. J. Ultrastruct. Res., **37** (1): 200-218.
- Deniau, M.; Durand, R.; Bories, C.; Paul, M.; Astier, A.; Couvreur, P. y Houin, R. (1993): Etude in vitro de medicaments leishmanicides vectorises. Ann. Parasitol. Hum. Comp., **68** (1): 34-37.
- Derouin, F. y Chastang, C. (1989): In Vitro Effects of Folate Inhibitors on *Toxoplasma gondii*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **33** (10): 1753-1759.
- Despommier, D.D. y Karapelou, J.W. (1987): Parasite Life Cycles. Springer-Verlag. New York.
- Diamond, L.S. (1968): Improved method for the monoxenic cultivation of *Entamoeba histolytica* Schaudinn, 1903, and *E. histolytica*-like amebae with trypanosomatids. J. Parasitol., **54**: 715-719.
- Dias, E. (1940): Transmissao do *Schizotrypanum cruzi* entre vertebrados, por via digestiva. Brasil-Médico, **54**: 47.
- Dias, J.C.P.; Brener, Z. y Macedo, A.M.M. (1984): Quimioprofilaxia da doença de Chagas em transplante renal com doador infectado. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **17**: 32.
- Dias, J.C.P. (1987): Control of Chagas' disease in Brazil. Parasitol. Today, **3** (11): 336-341.
- Dias, E. (1949): Os riscos da propagação da doença de Chagas pelos serviços de transfusão de sangue. Bolet. Ofic. Sanit. Panam., **28**: 910-911.
- Dias, J.C.P. y Brener, S. (1984): Chagas, disease and blood transfusion. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **79**: 139-147.
- Dias, J.C.P. (1982): Prevalencia da doença de Chagas entre crianças da zona rural de Bambuí, MG, apos ensaio profilático. Rev. Bras. Malarol Doenc. Trop., **19**: 135-159.

- Diaz, C.; Nussenzweig, V. y Gonzalez, A. (1992): An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. Am. J. Trop. Med. Hyg., **46** (5): 616-623.
- Dirie, M.F.; Murphy, N.B. y Gardiner, P.R. (1993): DNA Fingerprinting of *Trypanosoma vivax* Isolates Rapidly Identifies Intraspecific Relationships. J. Euk. Microbiol., **40** (2): 132-134.
- Di Martino, M.J.; Lee, J.C.; Badger, A.M.; Muirhead, K.A.; Mirabelli, C.K. y Hanna, N. (1986): Antiarthritic and immunoregulatory activity of Spirogermanium. Journal of Experimental Therapeutics, **236**: 103-110.
- Doadrio, A.; Craclunescu, D.G.; Bazian, J. y Ghirvu, C. (1981): Relations entre la structure et l'activite antitumorale des complexes du Pt²⁺ avec derives du thiazole. Anales de Química, **77**: 5-9.
- Docampo, R.; Moreno, S.N.J.; Turrens, J.F.; Katzin, A.M.; Gonzales-Cappa, S.M. y Stoppani, A.O.M. (1981): Biochemical and ultrastructural alterations produced by miconazole and econazole in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., **3**: 169-180.
- Docampo, R.; Gadelha, F.R. y Moreno, S.N.J. (1991): Metabolism and mode of anti-*Trypanosoma cruzi* action of gentian violet. En: Molecular and immunological aspects of parasitism. Ed Wang, C.C. Eashington. 95-105.
- Docampo, R. (1980): Generation of free radicals from nifurtimox in *Trypanosoma cruzi* and mammalian host. En: The host invader interplay. Ed. Van den Bossche, Elsevier North Holland, Amsterdam. 667-681.
- Docampo, R.; Moreno, S.N.J.; Stoppani, A.O.M.; Leon, W.; Cruz, F.S.; Villalta, F. y Muniz, R.F.A. (1981): Mechanism of nifurtimox toxicity in different forms of *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Pharmacol., **30**: 1947-1951.
- Docampo, R.; Moreno, S.N.; Muniz, R.P.; Cruz F.S. y Mason, R.P. (1983): Light-enhanced free radical formation and trypanocidal action of gentian violet (crystal violet). Science, **220** (4603): 1292-1295.
- Docampo, R.; Lopes, J.N.; Cruz, F.S. y De Souza, W. (1977): *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural and metabolic alterations of epimastigotes by β-lapachone. Exp. Parasitol., **42**: 142-149.
- Docampo, R. y Moreno, S.N.J. (1985): Biochemical toxicology of antiparasitic compounds used in the chemotherapy and chemoprophylaxis of American tripanosomiasis (Chagas' disease). Reviews of Biochemical Toxicology, **7**: 159-204.
- Docampo, R.; Cruz, F.S.; Boveris, A.; Muniz, R.P.A. y Esquivel, D.M.S. (1978): Lipid peroxidation and the generation of free radicals, superoxide anion, and hydrogen peroxide in β-lapachone-treated *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Biochem. J., **186**: 292-297.
- Docampo, R.; de Bolso, J.F.; Boveris, A. y Stoppani, A.O.M. (1976): Localization of peroxidase activity in *Trypanosoma cruzi* microbodies. Experientia, **32**: 972-975.
- Docampo, R. y Stoppani, A.O.M. (1979): Generation of usperoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. Arch. Biochem. Biophys., **197**: 317-321.
- Docampo, R. y Moreno, S.N.J. (1985): Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. Environ. Health Perspect., **64**: 199-208.
- Docampo, R.; De Souza, W.; Cruz, F.S.; Roitman, I.; Cover, B. y Gutteridge, W.E. (1978): Ultrastructural alterations and peroxide formation induced by naphthoquinones in different stages of *Trypanosoma cruzi*. Z. Parasitenkd., **57**: 189-198.
- Docampo, R.; Casellas, A.M.; Madeira, E.D.; Cardoni, R.L.; Moreno, S.N. y Mason, R.P. (1983): Oxygen-derived radicals from *Trypanosoma cruzi*-stimulated human neutrophils. FEBS Lett., **155** (1): 25-30.
- Docampo, R. y Moreno, S.N.V. (1984): Free radical metabolites in the mode of action of chemotherapeutic agents and phagocytic cells on *Trypanosoma cruzi*. Review Infectious Diseases, **6**: 223-228.
- Docampo, R. (1984): Efecto tripanocida del cristal violeta y otros colorantes catiónicos. An. Reunión sobre la Enfermedad de Chagas, Córdoba (Argentina), Sociedad Argentina de Protozoología.
- Docampo, R. (1990): Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chem. Biol. Interact., **73** (1): 1-27.
- Docampo, R. y Moreno, S.N. (1986): Free radical metabolism of antiparasitic agents. Fed. Proc., **45** (10): 2471-2476.
- Docampo, R.; Moreno, S.N. y Cruz, F.S. (1988): Enhancement of the cytotoxicity of crystal violet against *Trypanosoma cruzi* in the blood by ascorbate. Mol. Biochem. Parasitol., **27** (2-3): 241-247.
- Docampo, R.; Moreno, S.N.; Gadelha, F.R.; de Souza, W. y Cruz, F.S. (1988): Prevention of Chagas' disease resulting from blood transfusion by treatment of blood: toxicity and mode of action of gentian violet. Biomed. Environ. Sci., **1** (4): 406-413.
- Docampo, R. y Moreno, S.N. (1990): The metabolism and mode of action of gentian violet. Drug. Metab. Rev., **22**(2):161-178.
- Douc Rasy, S.; Kayser, A.; Riou, J. y Riou, G. (1986): ATP-independent type II topoisomerase from trypanosomes. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**(19): 7152-7156.
- Doyle, P.S. y Weinbach, E.S. (1989): The activity of tricyclic antidepressant drugs against *Trypanosoma cruzi*. Experimental Parasitology, **68**: 230-234.

- Ducanson, F.P.; Tower Jr, L.H.; Thorpk, A.; Ransil, B.J. y Abelman, W.M. (1977): The effect of sodium salicylate on acute chagasic myocarditis in C3H mice. J. Trop. Med. Hyg., **80**: 52.
- Dujardin, J.P.; Tibayrenc, M.; Venegas, E.; Maldonado, L.; Desjeux, P. y Ayala, F.J. (1987): Isozyme evidence of lack of speciation between wild and domestic *Triatoma infestans* (Heteroptera: Reduviidae) in Bolivia. J. Med. Entomol., **24** (1): 40-45.
- Dulbecco, R. y Elkington, J. (1973): Conditions limiting multiplication of fibroblastic and epithelial cells in dense cultures. Nature, **246**: 197-199.
- Dusanic, D.G. (1980): In Vitro Production of Metacyclic Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol., **66** (6): 1046-1049.
- Dvorak, J.E.; Hall, T.E.; Crane, M.J.; Engel, J.P.; McDaniel, J.P. y Urleges, R. (1982): *Trypanosoma cruzi*: flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin fluorescence. J. Protozool., **29**: 430-437.
- Dvorak, J.A. y Schmunis, G.A. (1972): *Trypanosoma cruzi*: Interaction with mouse peritoneal macrophages. Exp. Parasitol., **32**: 289-300.
- Dvorak, J.A.; Howe, C.L. (1977): The effects of lampit on the interactions of *Trypanosoma cruzi* with vertebrate cells "in vitro". A. J. Trop. Med. Hyg., **26**: 58-63.
- Dvorak, J.A. y Crane, M.St.J. (1981): Vertebrate cell cycle modulates infection by protozoan parasites. Science, **214** (4524): 1034-1036.
- Dvorak, J.A. (1975): New in vitro approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi* vertebrate cell interactions. PAHO Intern. Symp. new App. Amer. Trypanosom. Research, Belo Horizonte, Brasil, p. 105-120.
- Dvorak, J.A.; Gibson, C.C. y Maekelt, A. (1985): A bibliography on Chagas' disease (1968-1984). Washington, Pan American Health Organization.
- Dvorak, J.A. (1976): New in vitro approach to quantitation of *Trypanosoma cruzi*-vertebrate cell interactions. American Trypanosomiasis Research, OMS. Publ. Cient. N° 318. Washington: 109-120.
- Dvorak, J.A.; Engel, J.C.; Leapman, R.D.; Swyt, C.R. y Pella, P.A. (1988): *Trypanosoma cruzi*: elemental composition heterogeneity of cloned stocks. Mol. Biochem. Parasitol., **31** (1): 19-26.
- Eagle, H. (1959): Amino acid metabolism in mammalian cell cultures. Science, **130**: 432.
- Eckert, J.; Thompson, R.C.A.; Lymbery, A.J.; Pawlowski, Z.S.; Gottstein, B. y Morgan, U.M. (1993): Further evidence for the occurrence of a distinct strain of *Echinococcus granulosus* in European pigs. Parasitol. Res., **79**: 42-48.
- Eichbaum, F.W. (1961): Pesquisa sobre a presença de substâncias tóxicas em culturas do *Trypanosoma cruzi*. An. Congr. Intern. sobre Doença de Chagas, **2**: 479-489.
- El Harith, A.; Laarman, J.; Minter-Goedbloed, E.; Kager, P.A. y Kolk, A.H.J. (1987): Trypsin-treated and coomassie blue-stained epimastigote antigen in a microagglutination test for Chagas' disease. Am. J. Trop. Med., **37** (1): 66-71.
- Engel, J.C. y Dvorak, J.A. (1988): *Trypanosoma cruzi*: Cell Biological Behavior of Epimastigote and Amastigote Forms in Axenic Culture. J. Protozool., **35**: 513-518.
- Englund, P.T. y Marini, J.C. (1980): The replication of kinetoplast DNA. Am. J. Trop. Med. Hyg., **29**: 1064-1069.
- Englund, P.T.; Hadjuk, S.L. y Marini, J.C. (1982): The molecular biology of trypanosomes. Annu. Rev. Biochem., **50**: 879-910.
- Fairlamb, A.H.; Blackburn, P.; Ulrich, P.; Chait, B.T. y Cerami, A. (1985): Trypanothione: a novel bis(glutathionyl)spermidine cofactor for glutathione reductase in trypanosomatids. Science, **227** (4693): 1485-1487.
- Fairlamb, A.H. (1991): Trypanothione metabolism in the chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis. En: Molecular and immunological aspects of parasitism. Ed Wang, C.C. Eashington, 107-121.
- Fairlamb, A.H. (1989): Novel biochemical pathways in parasitic protozoa. Parasitology, **99**: 93-112.
- Fairlamb, A.H.; Henderson, G.B. y Cerami, A. (1986): The biosynthesis of trypanothione and N-glutathionylspermidine in *Crithidia fasciculata*. Mol. Biochem. Paras., **21**: 247-257.
- Farrel, N.P.; Williamson, J. y McLaren, D.J. (1984): Trypanocidal and antitumour activity of platinum-metal-drug dual-function complexes. Biochemical Pharmacology, **33**: 961-971.
- Fernandes, J.F.; Castellani, O. (1966): Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasit., **18**: 195-202.
- Fernandez Gomez, R.; Zerrouk, H.; Sebt, F.; Loyens, M.; Benslimane, A. y Ouassi, M.A. (1994): Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. Toxicon, **32** (8): 875-872.
- Fernandez Villamil, S.H.; Dubin, M.; Brusa, M.A.; Duran, R.P.; Perissinotti, L.J. y Stoppani, A.O. (1990): Generation of radical anions of nifurtimox and related nitrofurans by ascorbate. Free Radic. Res. Commun.

- 1Q (6): 351-360.
- Ferreira, M.S.; Nishioka, S.A.; Rocha, A.; Silva, A.M.; Ferreira, R.G.; Olivier, W. y Tostes Junior, S. (1991): Acute fatal *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in a human immunodeficiency virus-positive hemophilic patient. Am. J. Trop. Med. Hyg., **45** (6): 723-727.
- Ferreira, H. (1976): Ensaio terapeutico-clinico con benzonidazol na doenca de Chagas. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **18**: 357-364.
- Ferreira, J.; Coloma, L.; Fones, E.; Letelier, M.E.; Repetto, Y.; Morello, A. y Aldunate, J. (1988): Effects of t-butyl-4-hydroxyanisole and other phenolic antioxidants on tumoral cells and Trypanosome parasites. FEBS Letters, **234** (2): 485-488.
- Ferreira, R.C. y Ferreira, L.C. (1986): Mutagenicity of CL 64855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug. Muta. Res., **171** (1): 11-15.
- Ferreira, R.C.; de Melo, M.E.; Moraes Junior, M.A. y Ferreira, L.C. (1988): Evaluation of genotoxic activity in the blood and urine of guinea pigs treated with nifurtimox and benznidazole. Braz. J. Med. Biol. Res., **21** (5): 1069- 1077.
- Ferreira, R.C. y Ferreira, L.C. (1986): CL 64,855, a potent anti-*Trypanosoma cruzi* drug, is also mutagenic in the Salmonella/microsome assay. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **81** (1): 49-52.
- Ferreira, R.C.; Schwarz, U. y Ferreira, L.C. (1988): Activation of anti-*Trypanosoma cruzi* drugs to genotoxic metabolites promoted by mammalian microsomal enzymes. Exp. Parasitol., **204** (4): 577-583.
- Ferreira, R.C. y Ferreira, L.C. (1986): Mutagenicity of nifurtimox and benznidazole in the Salmonella/microsome assay. Braz. J. Med. Biol. Res., **19** (1): 19-25.
- Figueiredo, J.F.; Martinez, R.; da Costa, J.C.; Moyses Neto, M.; Suaid, H.J. y Ferraz, A.S. (1990): Transmission of Chagas disease through renal transplantation: report of a case. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **84** (1): 61-62.
- Figueiredo, R.C.; Steindel, M. y Soares, M.J. (1994): The reservosomes of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* occurrence during in vitro cultivation. Parasitol. Res., **80** (6): 517-522.
- Filardi, L.S. y Brener, Z. (1982): A nitroimidazole-thiadiazole derivate with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Annals of Tropical Medicine and Parasitology, **76** (3): 293-297.
- Filardi, L.S. y Brener, Z. (1990): Results of specific treatment with benznidazole in mice at the acute and chronic phase of *Trypanosoma cruzi* infection. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **85** (1): 99.
- Filardi, L.S. y Brener, Z. (1985): Efeito curativo do 2-amino-5-(1-methyl-5-nitro-2-imidazolil)-1,3,4-tiadiazol (megazol) em animais inoculados com cepas de *Trypanosoma cruzi* resistentes ao nifurtimox e benzonidazol. XXII Reun. Pesq. Bás. Doença de Chagas, Brasil. p. 135.
- Filardi, L.S. y Brener, Z. (1984): A rapid method for testing "in vivo" the susceptibility of different strains of *Trypanosoma cruzi* to active of chemotherapeutic agents. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **79**: 221-225.
- Filardi-L.S.; Brener-Z (1987): Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **81** (5): 755-759.
- Finlay, G.J.; Baguley, B.C. y Wilson, W.R. (1984): A semiautomated monoculture method for investigating growth inhibitory effects of cytotoxic compounds on exponentially growing carcinoma cells. Anal. Biochem., **39**: 272-277.
- Fischer, V.; West, P.R.; Nelson, D.S.; Harvison, P.J. y Mason, R.P. (1985): Formation of 4-aminophenoxy free radical from the actaminophen metabolite N-acetyl-p-benzoquinone imine. J. Biol. Chem., **260**: 11446-11450.
- Fish, W.R.; Marr, J.J.; Berens, R.L.; Looker, D.L.; Nelson, D.J.; LaFon, S.W. y Balber, A.E. (1985): Inosine analogs as chemotherapeutic agents for African trypanosomes: metabolism in trypanosomes and efficacy in tissue culture. Antimicrob. Agents Chemother., **27**: 33-36.
- Flynn, I.W. y Bowman, I.B.R. (1974): The action of trypanocidal arsenical drugs on *Trypanosma brucei* and *Trypanosoma rhodesiense*. Comp. Biochem. Physiol., **48B**: 261-273.
- Fournet, A.; Manjon, A.M.; Munoz, V.; Angelo, A.; Bruneton, J.; Hocquemiller, R.; Cortes, D. y Cave, A. (1988): Active trypanocidal alkaloids, bisbenzylisoquinolones ii. active in vitro against *Trypanosoma cruzi* the agent responsible for trypanosomiasis. J. Ethnopharmacol., **24** (2-3): 337-343.
- Franke de Cazzulo, B.M.; Martinez, J.; North, M.J.; Coombs, G.H. y Cazzulo, J.J. (1994): The effects of proteinase inhibitors on the growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol. Lett., **124** (1): 81-86.
- Frasch, A.C.C. y Reyes, M.B. (1990): Diagnosis of Chagas' disease using recombinant DNA technology, Parasitology Today, **6**: 137-139.
- Freitas, J.L.P.; Biancalan, A.; Amato Neto, V.; Nussenzweig, W.; Soutang, R. y Barreto, J.G. (1950): Primeiras verificações de transmissao accidental da molestia de Chagas ao homem por transfusao de sangue. Rev. Paul. Med., **49**: 36-40.
- Freshney, R. Ian. (1990): Culture of Animal Cells. A Manual of Basic Technique. Wiley-Liss. New York.

- Funayama, G.K. y Prado Jr. J.C. (1974): Estudio sobre os caracteres de uma amostra boliviana do *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 8: 75-81.
- Gaborak, M.; Darling, J.K. y Gutteridge, W.E. (1977): Comparative drug sensitivities of culture forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma dionisi*. Nature, 268: 339-340.
- Gadelha, F.R.; Hanna, P.M.; Mason, R.P. y Docampo, R. (1992): Evidence for free radical formation during horseradish peroxidase-catalyzed N-demethylation of crystal violet. Chem-Biol-Interactions, 85: 35-48.
- Gadelha, F.R.; Moreno, S.N.; De Souza, W.; Cruz, F.S. y Docampo, R. (1989): The mitochondrion of *Trypanosoma cruzi* is a target of crystal violet toxicity. Mol. Biochem. Parasitol., 34 (2): 117-126.
- Gallerano, R.H.; Marr, J.J. y Sosa, R.R. (1990): Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 43: 159-166.
- Gallerano, R.; Sosa, R.; Meirovich, C. y Montrull, I. (1985): Antiparasitic effect of allopurinol in chronic Chagas disease. Medicina (B Aires), 45 (6): 697-698.
- Galliard, H. (1965): Variété des tropismes de différentes souches de *Trypanosoma cruzi* chez les souris. Prog. Protozool., Abs-Second-Inter-Congres on Protozoology-London.
- Gamarro, F.; Osuna, A.; Castanys, S.; Pérez López y Ruiz Pérez, L.M. (1985): Isolation and purification of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* from cultured Vero cells. Z. Parasitenkd., 71 (1): 15-17.
- Gamarro, F.; Castanys, S.; Ruiz Perez, L.M.; Adroher, F.J. y Osuna, A. (1985): Effect of poly-L-lysine and neuraminidase on the infectivity of *Trypanosoma cruzi* in cultured HeLa cells. Z. Parasitenkd., 71 (4): 429-433.
- Garcia, E.S. y Dvorak, J.A. (1982): Growth and development of two *Trypanosoma cruzi* clones in the arthropod *Dipetalogaster maximus*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 31 (2): 259-262.
- Garrett, C.E.; Coderre, J.A.; Meek, T.D.; Garvey, E.P.; Claman, D.M.; Beverley, S.M. y Santi, D.V. (1984): A functional thymidylate synthetase-dihydrofolate reductase in protozoa. Mol. Biochem. Paras., 11: 257-65.
- Gerez de Burgos, N.M.; Burgos, C.; Montamat, E.E.; Rovai, L.E. y Blanco, A. (1984): Inhibition by gossypol of oxidoreductases from *Trypanosoma cruzi*. Biochem Pharmacol., 33 (7): 955-959.
- Giffin, B.F.; McCann, P.P.; Bitonti, A.J. y Bacchi, C.J. (1986): Polyamine depletion following exposure to DL-alpha-difluoromethylornithine both in vivo and in vitro initiates morphological alterations and mitochondrial activation in a monomorphic strain of *Trypanosoma brucei brucei*. J. Protozool., 33: 238-243.
- Gluckstein, D.; Ciferri, F. y Ruskin, J. (1992): Chagas' disease: another cause of cerebral mass in the acquired immunodeficiency syndrome. Am. J. Med., 92 (4): 429-432.
- Goad, L.J.; Holtz, G.G. y Beach, D.H. (1985): Sterols of ketoconazole-inhibited *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes. Mol. Biochem. Parasitol., 15: 257-279.
- Goad, L.J.; Holtz, G.G.; Beach, D.H. (1985): Effect of the allylamine antifungal drug SF-86327 on the growth and sterol synthesis of *Leishmania mexicana mexicana* promastigotes. Biochem. Pharmacol., 34: 3785-3788.
- Goad, L.J.; Berens, R.L.; Marr, J.J.; Beach, D.H.; Holz, G.G.Jr. (1989): The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: biochemistry and chemotherapeutic action in vitro. Mol. Biochem. Parasitol., 32 (2-3): 179-189.
- Goble, F.C. (1951): Studies on experimental Chagas' disease in mice in relation to chemotherapy testing. J. Parasitol., 37: 4008-4014.
- Goble, F.C. (1952): Activity of certain 6-methoxy-8-aminoquinolines against *Trypanosoma cruzi*. Antibiot. Chemother., 2: 265-270.
- Goble, F.C. (1949): Chemotherapeutic activity of certain 8-aminoquinolines, particularly pentaquine in experimental Chagas' disease. J. Parasitol., 35: 375.
- Goeldbloed, M.E. (1976): Hemoculture compared with xenodiagnosis for the detection of *Trypanosoma cruzi* infection in man and in animals. En: New approaches in American trypanosomiasis research. Sci. Publ. 318. PAHO, Washington. p. 245-252.
- Goijman, S.G.; Frasch, A.C. y Stoppani, A.O. (1984): Different effects of nifurtimox and benznidazole on the biosynthesis of DNA, RNA and proteins in *Trypanosoma cruzi*. Medicina (B Aires), 44 (3): 261-270.
- Goijman, S.G.; Turrens, J.F. Marini Bettolo, G.B. y Stoppani, A.O. (1985): Effect of tingenone, a quinonoid triterpene, on growth and macromolecule biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. Experientia, 41 (5): 646-658.
- Goijman, S.G. y Stoppani, A.O. (1985): Effects of nitroheterocyclic drugs on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Pharmacol., 34 (8): 1331-1336.
- Goijman, S.G.; Frasch, A.C. y Stoppani, A.O. (1984): Introduction of changes in the DNA of *Trypanosoma cruzi* by trypanocidal agents. Rev. Argent. Microbiol., 16 (2): 75-86.
- Goijman, S.G.; Frasch, A.C. y Stoppani, A.O. (1985): Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by

- nitroheterocyclic drugs. Biochem. Pharmacol., **34** (9): 1457-1461.
- Goijman, S.G.; Turrens, J.F.; Marini Bettolo, G.B. y Stoppani, A.O. (1984): Inhibition of growth and macromolecular biosynthesis in *Trypanosoma cruzi* by natural products. Effects of miconidine and tingenone. Medicina (B Aires), **44** (4): 361-370.
- Goijman, S.G. y Stoppani, A.O. (1985): Effects of beta-lapachone, a peroxide-generating quinone, on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. Arch. Biochem. Biophys., **240** (1): 273-280.
- Goijman, S.G.; Dubin, M. y Stoppani, A.O. (1989): Nifurtimox and benznidazole inhibit DNA and protein synthesis in rat hepatocytes. Medicina. B. Aires., **49** (6): 718-719.
- Goldberg, S.S. y Chiari, E. (1980): Growth and Isolation of Single Colonies of *Trypanosoma cruzi* on Solid Medium. J. Parasitol., **66**: 677-679.
- Gomes, Y.M.; Abath, F.G.; Furtado, A.F.; Regis, L.N.; Nakassawa, M.; Montenegro, L.T.; Vouldoukis, I.; Alfred Morin, C. y Monjour, L. (1995): A monoclonal antibody against blood forms of *Trypanosoma cruzi* lyses the parasite in vitro and inhibits host cell invasion. Appl. Biochem. Biotechnol., **50** (1): 57-69.
- Gonçalves, A.M.; Vasconcelos, M.E.; Docampo, R.; Cruz, F.S.; De Souza, W. y Leon, W. (1980): Evaluation of the toxicity of 3-allyl- β -lapachone against *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. Mol. Biochem. Parasitol., **1**: 167-176.
- Gonçalves, A.M.; Nehme, N.S. y Morel, C.M. (1990): An improved silver staining procedure for schizodeme analysis in polyacrilamide gradient gels. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., **85** (1): 101-106.
- Gonert, R. y Bock, M. (1972): The effect of nifurtimox on *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures. Arzneim. Forsch., **22**: 1582-1586.
- Gonzales Perdomo, M.; Lisboa, S.; Meirelles, M.N. y Goldenberg, S. (1990): *Trypanosoma cruzi* proliferation and differentiation are blocked by topoisomerase II inhibitors. Antimicrobial Agents and chemotherapy, Sept. 1990, p. 1707-1714.
- Gonzalez, A.; Rosales, J.L.; Ley, V. y Diaz, C. (1990): Cloning and characterization of a gene coding for a protein (KAP) associated with the kinetoplast of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., **40** (2): 233-243.
- Gonzalez, A.M.; Castanys, S.; Osuna, A.; Herrador, M.M. y Dominguez, J.F. (1989): Inhibitory effect of new pyrimidine bases on *Trypanosoma cruzi*. Arch. Pharm. Weinheim., **322** (12): 843-846.
- Gonzalez, J.; Sagua, H.; Araya, J.; Loyola, A.; Morales, G.; Pereira, J. y Estrada, M. (1990): "In vitro" activity of natural products against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Phytotherapy Res., **4** (1): 1-4.
- Gonzalez, J.; Muñoz, S.; Ortiz, S.; Anaconda, D.; Salgado, S.; Galleguillos, M.; Neira, I.; Sagua, H. y Solari, A. (1995): Biochemical, immunological and biological characterization of *Trypanosoma cruzi* populations of the Andean north of Chile. Exp. Parasitol., **81** (1): 125-135.
- Gonzalez, N.S. y Cazzulo, J.J. (1989): Effects of trypanocidal drugs on protein biosynthesis in vitro and in vivo by *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Pharmacol., **38** (17): 2873-2877.
- Gonzalez Cappa, S.M.; Schmunis, G.A.; Traversa, O.C.; Yanovsky, J.F. y Parodi, A.S. (1968): Complement-fixation tests, skin tests, and experimental immunization with antigens of *Trypanosoma cruzi* prepared under pressure. Am. J. Trop. Med. Hyg., **17** (5): 709-715.
- Gonzalez Cappa, S. y Barosusse, AP. (1988): Parasitic disease and immunosuppression. Medicina (Buenos Aires), **48**: 100-103.
- González Cappa, S.M.; Bijovsky, A.T.; Freilij, H.; Muller, L.A. y Katzin, A.M. (1981): Aislamiento de una cepa de *Trypanosoma cruzi* a predominio de formas delgadas en la Argentina. Medicina (Buenos Aires), **41**: 119.
- Gonzalez Carrion, L y Cevallos Paredes, G. (1986): La enfermedad de Chagas y su importancia en el laboratorio. Rev. Ecuatoriana Med., **22**: 79-86.
- Goodman, H.; Goodman, L. y Gilman, A. (1982). En: Las bases farmacológicas de la terapia. Ed. Med. Panamericana, Buenos Aires. p. 1059.
- Goowin, L.G.; Goss, M.D.; Lock, J. y Walls, L.P. (1950): The chemotherapeutic action of phenanthridine compounds. II. *Trypanosoma cruzi*. Br. J. Pharmacol. Chemother., **5**: 277.
- Gorla, N.B. y Castro, J.A. (1985): Micronucleus formation in bone marrow of mice treated with nifurtimox or benznidazole. Toxicol. Lett., **25**: 259-263.
- Gorla, N.; Diaz Gomez, M.I. y Castro, J.A. (1986): Interaction of benznidazole reactive metabolites with rat liver deoxyribonucleic acid and nuclear proteins. Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., **290** (1): 22-31.
- Gorla, N.B. (1987): Sister-chromatid exchange in splenic lymphocytes of mice after exposure to nifurtimox or benznidazole. Muta. Res., **188** (2): 129-133.
- Gorla, N.B.; Ledesma, O.S.; Barbieri, G.P. y Larripa, I.B. (1988): Assessment of cytogenetic damage in chagasic children

- treated with benznidazole. Exp. Parasitol., 206 (2): 217-220.
- Goya, P.; Nieves, R.; Ochoa, C. Rozas, I.; Contreras, M.; Escario, J.A.; y Jimenez, I. (1986): Synthesis and antiparasitic screening of 4-nitro-1,2,6-thiadiazine 1,1-dioxides. Eur. J. Med. Chem. Chim. Ther., 21 (6): 531-533.
- Grace, T.D.C. (1962): Establishment of four strains of cells from insect tissue grown in vitro. Nature, 195: 788-789.
- Grady, R.W.; Bienen, E.J. y Clarkson, A.B. (1986): p-Alkyloxybenzhydroxamic acids, effective inhibitors of the trypanosome glycerol-3-phosphate oxidase. Mol. Biochem. Paras., 19: 231-240.
- Grady, R.W.; Beinen, E.J.; Clarkson, A.B. (1986): Esters of 3,4-di-hydroxybenzoic acid, highly effective inhibitors of the sn-glycerol-3-phosphate oxidase of *Trypanosoma brucei brucei*. Mol. Biochem. Paras., 21: 55-63.
- Grant, I.H.; Gold, J.W.; Wittner, M. et al. (1989): Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the U.S.A.. Annals of Internal Medicine, 111: 849-851.
- Greig, S.; Ashall, F. y Hudson, L. (1990): Use of total parasite DNA probes for the direct detection of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* in domiciliary *Rhodnius prolixus*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 84 (1): 59-60.
- Greig, S. y Ashall, F. (1990): Electrophoretic detection of *Trypanosoma cruzi* peptidases. Mol. Biochem. Parasitol., 39 (1): 31-37.
- Greig, S. y Ashall, F. (1987). Detection of South american trypanosomes in insects using total parasite DNA probes. Parasitology Today, 3 (12): 375-376.
- Grogl, M. y Kuhn, R.E. (1984): Identification of antigens of culture forms of *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* recognized by sera from patients with chronic Chagas' disease. J. Parasitol., 70 (5): 822-824.
- Grunberg, E.; Beskid, G.; Cleeland, L.; De Lorenzo, WF.; Titsworth, E.; Scholer, H.J.; Richle, R. y Brenner, Z. (1968): Antiparasitic and antibacterial activity of 2-nitroimidazole derivatives. Antimicrob. Ag. Chemother., 513- 519.
- Gugliotta, J.L.; Tanowitz, H.B.; Wittner, M. y Soeiro, R. (1980): *Trypanosoma cruzi*: inhibition of protein synthesis by nitrofurans SQ 18,506. Exp. Parasitol., 49: 216.
- Guimaraes, L.; Takehara, H.A. y Alvarez, J.M. (1988): Protective effects of 3,6-bis-(2-piperidinoethoxy) acridine trihydrochloride (CL-246738) in experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. 82 (4): 579-580.
- Gutteridge, W.E. y Gaborak, M.A. (1979): A re-examination of purine and pyrimidine synthesis in the three main forms of *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Biochem., 10: 410-422.
- Gutteridge, W.E. y Davies, M.J. (1981): Enzymes of purine salvage in *Trypanosoma cruzi*. FEBS Lett., 127: 211-214.
- Gutteridge, W.E.; Cover, B. y Gaborak, M. (1975): Further studies on the activity of SQ 18506 against *Trypanosoma cruzi*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 69: 276.
- Gutteridge, W.E. (1982): Chemotherapy of Chagas disease. In Perspectives in Trypanosomiasis Research (ed. J.R. Baker). London: John Wiley & Sons. p. 45-47.
- Gutteridge, W.E.; Gaborak, M. y Cover, B. (1978): Comparative study of SQ 18 506 with other nitroheterocyclic compounds on experimental Chagas' disease. Ann. Trop. Med. Parasitol., 72: 339-347.
- Gutteridge, W.E.; Knorder, J. y Coombes, J.D. (1969): Growth of *Trypanosoma cruzi* in human heart tissues cells and effects of aminonucleoside of puromycin, trypacidin, and aminopterin. J. Protozool., 16: 521-525.
- Gutteridge, W.E. (1985): Existing chemotherapy and its limitations. Br. Med. Bull., 41: 162-168.
- Habekorn, A. y Gonert, R. (1972): Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. Arzneim. Forsch., 22: 1570-1581.
- Hadjuk, S.L. (1978): Influence of DNA complexing compounds on the kinetoplast of trypanosomatids. Prog. Molec. Subcell. Biol., 6: 158-200.
- Haido, R.M.; Esteves, M.J. y Barreto Bergter, E. (1992): Amphotericin B-induced carbohydrate changes on the *Trypanosoma cruzi* surface membrane. J. Protozool., 39 (5): 609-612.
- Hajduk, S.L. (1984): Antigenic variation during the developmental cycle of *Trypanosoma brucei*. J. protozool., 31: 41-47.
- Ham, R.G. (1965): Clonal growth of mammalian cells in a chemically defined synthetic medium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 53: 288.
- Hamilton-Miller, JMT.; Brumfitt, W. (1976): The versatility of nitro-compounds. J. Antimicrob. Chemother., 2: 5-8.
- Hammond, D.J. y Gutteridge, W.E. (1982): UMP synthesis in the kinetoplastida. Biochem. Biophys. Acta, 718: 1-10.
- Hammond, D.J.; Gutteridge, W.E. y Opperdoes, F.R. (1981): A novel location for two enzymes of de novo pyrimidine biosynthesis in trypanosomes and *Leishmania*. FEBS Letters, 128: 22-30.

- Hammond, D.J.; Hogg, J. y Gutteridge, W.E. (1985): *Trypanosoma cruzi*: possible control of parasite transmission by blood transfusion using amphiphilic cationic drugs. Exp. Parasitol., **60** (1): 32-42.
- Hammond, D.J.; Gutteridge, W.E. (1980): Enzymes of pyrimidine biosynthesis in *Trypanosoma cruzi*. J. Biol. Chem., **118**: 259-262.
- Hammond, D.J. y Gutteridge, W.E. (1983): Studies on the glycosomal orotate phosphoribosyl transferase of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., **7**: 319-330.
- Hammond, D.J. y Gutteridge, W.E. (1984): Purine and pyrimidine metabolism in trypanosomatidae. Mol. Biochem. Parasitol., **13**: 243-261.
- Hammond, D.J.; Croft, S.L.; Hogg, J.; Gutteridge, W.E. (1986): A strategy for the prevention of the transmission of Chagas' disease during blood transfusion. Acta Tropica, **43**: 367-378.
- Hammond, D.J., Cover, B. y Gutteridge, W.E. (1984): A novel series of chemical structures in vitro against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **78** (1): 91-95.
- Hanson, W.L.; Devlin, R.F. y Robertson, E.L. (1974): Immunoglobulin levels in a laboratory acquired case of human Chagas' disease. J. Parasitol., **60**: 532-533.
- Hanson, W.L.; Chapman, W.L. y Waits, V.B. (1976): Immunization of mice irradiated *Trypanosoma cruzi* growth in cell culture: Relation of numbers of parasites, immunizing injection and route of immunization to resistance. Int. J. Parasit., **6**: 341-347.
- Hardy, L.W.; Finer-Moore, J.S.; Montfort, W.R.; Jones, M.O.; Santi, D.V. y Stroud, R.M. (1987): Atomic structure of thymidylate synthase: target for rational drug design. Science, **235**: 448-55.
- Hart, D.; Langridge, A.; Barlow, D. y Sutton, B. (1989): Antiparasitic drug design. Parasit. Today, **4** (4): 117-120.
- Hauschka, T.S. y Goodwin, M.B.T. (1948): *Trypanosoma cruzi* endotoxin (K.R.) in treatment of malignant mouse tumors. Science, **107**: 600-607.
- Hauschka, T.S. (1949): Persistence of strain-specific behaviour in two strains of *Trypanosoma cruzi* after prolonged transfer through inbred mice. J. Parasitol., **35**: 593-599.
- Headley, D.B.; Kopp, R.G.; Michie, P.M.; Eerturk, E. y Bryan, G.T. (1981): Temporal comparisons of immune status and target organ histology in mice fed carcinogenic 5-nitrofurans and their nitro analogs. Cancer Res., **41**: 1397-1401.
- Henderson, G.B. y Fairlamb, A.H. (1987): Trypanothione metabolism: a chemotherapeutic target in trypanosomatids. Parasitology Today, **3**: 312-315.
- Henderson, G.B.; Ulrich, P.; Fairlamb, A.H.; Rosenberg, I.; Pereira, M.; Sela, M. y Cerami, A. (1988): "Subversive" substrates for the enzyme trypanothione disulfide reductase: alternative approach to chemotherapy of Chagas disease. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **85** (15): 5374-5378.
- Henriquez, D.; Piras, R. y Piras, M.M. (1981): The effect of surface membrane modification of fibroblast cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Mol. Biochem. Parasitol., **2**: 359-366.
- Hermosura, M.E. (1985): Comparative study on high and low virulent trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*: infectivity to mouse macrophages, L-cells and newly cultured fibroblast from mouse heart. Trop. Med., **27** (4): 211-219.
- Herrero, A.; Ochoa, C.; Atienza, J.; Escario, J.A.; Gomez-Barrio, A. y Martínez-Fernández, A.R. (1992): Synthesis and antiprotozoal properties of 1,2,6-thiadiazine 1,1-dioxide derivatives. Arch. Pharm. (Weinheim), **325**: 509-514.
- Herrero, A.; Ochoa, C.; Perez, C.; Rodríguez-Cabeiro, F.; Jimenez, A.; De Armas, C.; Criado, A. y Font, M. (1993): Anthelmintic activity of pyrazinohiadiazine dioxide derivatives. Arzheim. Forsch. Drug Res., **43** (1): 2:163-166.
- Higashi, K.O. y de Castro, S.L. (1994): Propolis extracts are effective against *Trypanosoma cruzi* and have an impact on its interaction with host cells. J. Ethnopharmacol., **43** (2): 149-155.
- Hitchings, G.H. (1975): Pharmacology of allopurinol. Arthritis Rheum., **18**: 863-870.
- Hoare, C.A. y Wallace, F.G. (1966): Developmental stages of trypanosomatid flagellates: a new terminology. Nature, **212**: 1385-1386.
- Hoare, C.A. (1972): The stercoraria subgenus *Schizotrypanum* Chagas, 1909. En: The trypanosomes of mammals. A zoological monograph, B.S.P. Oxford-Edinburgo: 360-380.
- Hof, H.; Stroder, J.; Buisson, P. y Royer, R. (1986): Effect of different nitroheterocyclic compounds on aerobic, microaerophilic, and anaerobic bacteria. Antimicrob. Agents Chemother., **30**: 679-683.
- Hof, H. (1989): Antibacterial activities of the antiparasitic drugs nifurtimox and benznidazole. Antimicrob. Agents Chemother., **33** (3): 404-405.
- Hofflin, J.M.; Sadler, R.H.; Araujo, F.G.; Page, W. y Remington, J.S. (1987): Laboratory-acquired Chagas' disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **81**: 527.

- Homsy, J.J.; Granger, B. y Krassner, S.M. (1989): Some Factors Inducing Formation of Metacyclic Stages of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., **36**: 150-153.
- Hori, M.; Ito, E.; Takida, T.; Koyama, G.; Takeuchi, T. y Umezawa, H. (1964): A new antibiotic, formycin. J. Antibiot. (Tokyo), **17**: 96-99.
- Howels, R.E. (1985): The modes of action of some anti-protozoal drugs. Parasitology, **90**: 687-703.
- Hubsch, R.M.; Sulzer, A.J.; Kagan, I.G. (1976): Evaluation of an auto-immune type antibody in the sera of patients with Chagas' disease. J. Parasitol., **62**: 523-527.
- Hudson, L.; Snary, D. y Morgan, S. (1984): *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. Parasitology, **88** (2): 283-294.
- Hudson, L. y Hindmarsh, P.J. (1985): The relationship between autoimmunity and Chagas' disease: causal or coincidental? Curr. Top. Microbiol. Immunol., **117**: 167-177.
- Hudson, L.; Gutteridge, W.E.; Klein, R.; Peters, W.; Neal, R.A.; Miles, M.A.; Williams, J.E. y Scott, M.T. (1983): Suggested guidelines for work with live *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **77**: 416-419.
- Hudson, L. (1985): Experimental studies on *Trypanosoma cruzi*. Ann. Soc. Belg. Med. Trop., **65** (1): 71-77.
- Hudson, L.; Snary, D. y Morgan, S.J. (1984): *Trypanosoma cruzi*: continuous cultivation with murine cell lines. Parasitology, **88**: 283-294.
- Hungerer, K.D.; Schamburg, C. y Dionysius, J. (1981): New methods for the isolation of Bloodstream Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol., **67**: 967-969.
- Hutzler, R.U.; Amato Neto, V. y Souza, H.B.W.T. (1964): Tentativa do emprego do ácido epsilon-amino-capríco na prevenção da transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. Rev. Hosp. Cíln. Fac. Méd. S. Paulo, **19**: 337-339.
- Isola, E.L.D.; Lammel, E.M.; Katzin, V.J. y Gonzalez Cappa, S.M. (1981): Influence of organ extracts of *Triatoma infestans* on differentiation of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol., **67**: 53-58.
- Isola, E.L.; Lammel, E.M. y Gonzalez Cappa, S.M. (1986): *Trypanosoma cruzi*: differentiation after interaction of epimastigotes and *Triatoma infestans* intestinal homogenate. Exp. Parasitol., **62** (3): 329-335.
- Isola, E.L.; Lammel, E.M.; Giovanniello, O.; Katzin, A.M.; Gonzalez, Cappa, S.M. (1986): *Trypanosoma cruzi* morphogenesis: preliminary purification of an active fraction from hemolymph and intestinal homogenate of *Triatoma infestans*. J. Parasitol., **72** (3): 467-469.
- Isola, E.L.; Lammel, E.M. y Gonzalez Cappa, S.M. (1987): *Trypanosoma cruzi*: Differentiation to Metacyclic Trypomastigotes in the Presence of ADP-ribosil transferase inhibitors. Exp. Parasitol., **64**: 424-429.
- Iturrino, L.; Navarro, P.; Rodriguez-Franco, M.I.; Contreras, M.; Escario, J.A.; Martinez-Fernandez, A.R. y Pardo, M.R. (1987): Synthesis, cytostatic and trichomonocide activities of 3,5-bis-(halomethyl)pyrazoles. Eur. J. Med. Chem., **22**: 445-451.
- Jardim, J.M.; Trouet, A.; Van hoof, F.; Bioul-Marchand, M.; Maldague, P. y Jadim-Nyssens, M. (1977): Etude comparative d'une chimiotherapie lysosomotrope dans la maladie de Chagas et dans le Nagana. Ann. Soc. Belg. Med. Trop., **57**: 525-530.
- Jenni, L.; Marti, S.; Schweizer, J.; Bestchart, B.; Le Page, R.W.F.; Wells, J.M.; Tait, A.; Paindavoin, P.; Pays, E. y Steinert, M. (1986): Hybrid formation between african trypanosomes during cyclical transmission. Nature, **322**: 135-175.
- Jenni, L. (1990): Sexual stages in trypanosomes and implications. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, **65** (1): 19-21.
- Jennigs, F.W. (1991): Chemotherapy of CNS-trypanosomiasis: the combined use of the arsenicals and nitro-compounds. Trop. Med. Parasitol., **42** (2): 139-142.
- Jennings, F.W. (1988): Chemotherapy of trypanosomiasis: the potentiation of melarsoprol by concurrent difluoromethylornithine (DFMO) treatment. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **82** (4): 572-573.
- Jennings, F.W. (1990): Future prospects for the chemotherapy of human trypanosomiasis. 2. Combination chemotherapy and African trypanosomiasis. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **84** (5): 618-621.
- Jimenez Ortiz, A.; Guevara, D. y Osuna Carrillo, A. (1984): *Trypanosoma cruzi* induces changes in the nucleic acids content of host HeLa cells in vitro. Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, **59** (6): 573-581.
- Jimenez, M.I.; Escario, J.A.; Martinez-Fernandez, A.R.; Canoira, L. y Gomez de las Heras, F. (1987): Acción antifúngica experimental de derivados triazólicos e indólicos. En: Proc. III Congreso Internacional de Ciencias Farmacéuticas, Barcelona 9-12 junio 1987.: 499-503.
- Jockers-Scherübl, M.C.; Schirmer, R.H. y Krauth-Sieger, R.L. (1989): Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Catalytic properties of the enzyme and inhibition studies with trypanocidal compounds. Eur. Journal Biochem., **180**: 267-272.

- Kagan, I.G. (1965): Evaluation of routine serologic testing for parasitic diseases. Am. J. Public Health Nations Health, 55 (11): 1820-1829.
- Kagan, I.G. y Norman, L. (1970). En: Manual of clinical microbiology. Ed. Blair, Lenett, Truant. American Soc. Microbiol. Bethesda, ch 51, p 453-486.
- Kagan, I.G.; Norman, L. y Allain, D. (1966): Studies on *Trypanosoma cruzi* isolated in the United States: A review. Rev. Biol. Trop., 14: 55-73.
- Kagan, I.G. (1980): American trypanosomiasis (Chagas' disease). En: Immunological Investigation of Tropical Parasitic Diseases, Ed. Vaclav Houba. Churchill Livingstone, Edimburgo. p. 49-64.
- Kahn, T.; Corral, R.; Freilij, H. y Grinstein, S. (1983). Detection of circulating immunocomplexes, antigens and antibodies by enzyme-linked immunosorbent assay in human *T.cruzi* infection. IRCS Medical Science, 11: 670-671.
- Kanbara, H. y Nakabayashi, T. (1983): Comparative studies on trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from infected mouse blood and infected fibroblast cell (L-cell) culture. Biken Journal, 26 (1): 57-62.
- Kanbara, H. y Nakabayashi, T. (1983): Improved method for separation on CM-cellulose of the Trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* from forms grown in fibroblast cell cultures. Biken Journal, 26 (1): 63-65.
- Kanbara, H.; Yanagi, T.; Nakazawa, S. y Fukuma, T. (1987): Comparison of virulent trypomastigotes with low-virulent ones derived from a single strain of *Trypanosoma cruzi*: infectivity to new fibroblasts from various organs of the mouse. Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. A, 264 (3-4): 407-413.
- Karsten, V.; Davis, C. y Kuhn, R. (1992): *Trypanosoma cruzi* in wild racoons and opossums in North Carolina. J. Parasitol., 78 (3): 547-549.
- Kerndt, P.R.; Waskin, H.A.; Kirchoff, L.V.; Steurer, F.; Waterman, S.H.; Nelson, J.M.; Gellert, G.A. y Shulman, I.A. (1991): Prevalence of antibody to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in Los Angeles, California. Transfusion, 31 (9): 814-818.
- Kerndt, P.; Waskin, H.; Shulman, I. et al. (1988): *Trypanosoma cruzi* antibody among blood donors in Los Angeles, California. Transfusion, 28: 31.
- Kerschmann, R.L.; Wolfson, J.S.; McHugh, G.L.; Dickersin, G.R.; Hooper, D.C. y Swartz, M.N. (1989): Novobiocin-induced ultrastructural changes and antagonism of DNA synthesis in *Trypanosoma cruzi* amastigotes growing in cell-free medium. J. Protozool., 36: 14-20.
- Kierszenbaum, F. (1984): The chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas' disease). En: Mansfield, J.M. ed.: Parasitic diseases. Vol. 2. The chemotherapy. Nueva York, p. 113-163.
- Kierszenbaum, F. y Stiles, B. (1985): Evidence supporting the existence of a host cell surface receptor for *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., 32 (2): 364-366.
- Kierszenbaum, F.; Lima, M.F. y Wirth, J.J. (1985): Effects of antiserum to *Trypanosoma cruzi* on the uptake and rate of killing of vector-borne, metacyclic forms of the parasite by macrophages. Int. J. Parasitol., 15 (4): 409- 413.
- Kierszenbaum, F. y Sonnenfeld, G. (1984): Beta-interferon inhibits cell infection by *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol., 132 (2): 905-908.
- Kierszenbaum, F.; Cuna, W.R.; Beltz, L.A. y Szein, M.B. (1989): *Trypanosoma cruzi* reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components. J. Immunol., 143 (1): 275-279.
- Kinnamon, K.E.; Steck, E.A.; Hanson, W.L. y Chapman, W.L. (1977): In search of anti-*Trypanosoma cruzi* drugs: New leads from a mouse model. J. Med. Chem., 20: 741-744.
- Kirchoff, L.V. y Hoff, D.F. (1990): Immunization and challenge of mice with insect-derived metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol., 12 (1): 65-74.
- Kitagawa, T.; Iwamoto, M.; Zhao, L.P. y Kanbara, H. (1991): New enzyme immunoassays for specific assay and general detection of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. Microbiol. Immunol., 35 (11): 943-951.
- Kloetzel, J. (1961): Estudo comparativo da ação tripanossomicida "in vitro" da violeta de genciana e do cristal violeta. Primeiros ensaios com o emprego do verde de metila. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 3: 254-260.
- Kloetzel, J.K.; Midler, R. y Umegawa, E. (1984): *Trypanosoma cruzi* interaction with macrophages: differences between tissue culture and bloodstream forms. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 26 (4): 179-185.
- Knecher, L.M.; Rojkin, L.F.; Capriotti, G.A. y Lorenzo, L.E. (1994): Chagas' disease screening in blood bank employing enzyme immunoassay. Int. J. Parasitol., 24 (2): 207-211.
- Knox, R.J.; Knight, R.C. y Edwards, D.I. (1983): Studies on the action of nitroimidazole drugs: the products of nitroimidazole reduction. Biochem. Pharmacol., 32: 2149-2156.
- Korolkovas, A.; Burckhafer, J.H. y Amidon, G. (1971): Interatomic distances in succinate dehydrogenase inhibitors and substrate. Contribution to the drug therapy of Chagas' disease. Rev. Farm. Bioquim. Univ. Sao Paulo, 9 (1): 135-191.

- Krassner, S.M.; Granger, B.; Phermsangnam, P.; Le, T. y Linden, W. (1990). Further Studies of Substrates Inducing Metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., **37** (2): 128-132.
- Krassner, S.M.; Granger, B.; Lee, P.; Guerra, C.; Le, T. y Luc, K.O. (1991): Action of exogenous potassium and calcium ions on in vitro metacyclogenesis in *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., **38** (6): 602-608.
- Krauth Siegel, R.L.; Enders, B.; Henderson, G.B.; Fairlamb, A.H. y Schirmer, R.H. (1987): Trypanothione reductase from *Trypanosoma cruzi*. Purification and characterization of the crystalline enzyme. Eur. J. Biochem., **164** (1): 123-128.
- Krautz, C.M.; Coutinho, M.C.; Glavao, L.M.; Cancado, J.R. y Krettli, A.U. (1994): Soluble antigens released by *Trypanosoma cruzi* tripomastigotes used in ELISA to detect cure in chagasic patients following specific treatment. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **27** (4): 199-207.
- Kress, Y.; Tanowitz, H.; Bloom, B. y Wittner, M. (1977): *Trypanosoma cruzi*: Infection of Normal and Activated Mouse Macrophages. Experimental Parasitology, **41**: 385-396.
- Krettli, A.U. (1984): Protective antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections: detection, functional and possible mechanisms of trypomastigotes killing in vivo and in vitro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **79**: 59-65.
- Krettli, A.U.; Cancado, J.R. y Brener, Z. (1982): Effect of specific chemotherapy on the levels of tytic antibodies in Chagas's disease. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **76** (3): 334-340.
- Krettli, A.U. y Brener, Z. (1982): Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. J. Immunol., **128** (5): 2009-2012.
- Krieger, M.A.; Almolda, E.; Oelemann, W.; Lafaille, J.J.; Perelra, J.B.; Krieger, H.; Carvalho, M.R. y Goldenberg, S. (1992): Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., **46** (4): 427-434.
- Lafaille, J.J.; Linss, J.; Krieger, M.A.; Souto Padron, T.; de Souza, W. y Goldenberg, S. (1989): Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. Mol. Biochem. Parasitol., **35** (2): 127-136.
- Laguens, R.P.; Cabeza Meckert, P.; Chambo, J.G. y Gelpi, R. (1983): Chronic Chagas' disease in the mouse. IV. Effect of trypanocidal drugs. Medicina (B. Aires), **43** (2): 126-130.
- Lainson, R.; Saw, J.J.; Naiff, R.D. (1980): Chagas' disease in the Amazon Basin: Speculations on transmission "per os". Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **22**: 294-297.
- Lana, D.E. (1979): Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* cultivated with a *Triatoma infestans* embryo cell line. J. Protozool., **26**: 457-462.
- Lanotte, G. y Rioux, J.A. (1990): Mise en evidence d'un processus de cytogamie chez les Leishmania (Kinetoplastida-Trypanosomatidae). Annales de Parasitologie Humaine et Comparée, **65**: 47-48.
- Laplume, H.; Barousse, A. y Cabrera, H. (1982): Efectos indeseables de Nifurtimox y Benzonidazol. Medicina (Buenos Aires), **42**: 55.
- Larralde, G.; Vivas, J. y Urbina, J.A. (1988): Concentration and time dependence of the effects of ketoconazole on growth and sterol synthesis by *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* epimastigotes. Acta. Cient. Venez., **39** (2): 140-146.
- Lauria Pires, L.; Castro C.N. de; Emanuel, A. y Prata, A. (1988): Ineficacia do allopurinol em pacientes na fase aguda da doença de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **21** (2): 79.
- Lazard, K.; Urbina, J.A. y Souza, W. de (1991): Ultrastructural alterations induced by ICI 195.737, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma cruzi*. Anticob. Agents Chem., **35** (4): 736-740.
- Lazard, K.; Urbina, J.A. y de Souza, W. (1990): Ultrastructural alterations induced by two ergosterol biosynthesis inhibitors, ketoconazole and terbinafine, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother., **34** (11): 2097-2105.
- Leichnuk, R.R.; Cardoni, R. y Fuks, A. (1977): Cell mediated immunity in Chagas' disease. Alterations induced by treatment with trypanocidal drug (nifurtimox). Clin. Exp. Immunol., **30**: 434-438.
- Lemesre, J.L.; Afchain, D.; Orozco, O.; Loyens, M.; Breniere, F.S.; Desjeux, P.; Carlier, Y.; Martin, U.; Nogueira Queiroz, J.A.; Le Ray, D.; et al (1986): Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. Am. J. Trop. Med. Hyg., **35** (1): 86-93.
- Leon, W.; Gonçalves, A.M.; Vasconcellos, M.E.; Do Campo, R.; Cruz, F.S. y Souza, V. (1980): Evaluation of the toxicity of 3-allyl- β -lapachone against *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms. Mol. Biochem. Parasitol., **1**: 167-176.
- Letelier, M.E.; Rodriguez, E.; Wallace, A.; Lorca, M.; Repetto, Y.; Morello, A. y Aldunate, J. (1990): *Trypanosoma cruzi*: a possible control of transfusion-induced Chagas' disease by phenolic antioxidants. Exp. Parasitol., **71** (4): 357-363.
- Levine, N.D.; Corliss, J.O.; Cox, F.E.G.; Deroux, G.; Grain, J.; Honigberg, B.M.; Leedale, G.F.; Loeblich, A.R. Lom, J.; Lynn, D.; Merinfeld, E.G.; Page, F.C.; Poljansk, G.; Sprague, V.; Vavra, J. y Wallacw, F.G. (1980): A newly

- revised classification of the Protozoa. J. Protozool., **27** (1): 37-58.
- Levine, R.A.; Werdlaw, S.C. y Patton, C.L. (1989). Detection of Haematoparasites Using Quantitative Buffy Coat Analysis Tubes. Parasitology Today, **5** (4):132-134.
- Lewicka, K.; Breniere Campana, S.F.; Barnabe, C.; Dedet, J.P. y Tibayrenc, M. (1995): An isoenzyme survey of *Trypanosoma cruzi* genetic variability in sylvatic cycles from French Guiana. Exp. Parasitol., **81** (1): 20-28.
- Ley, V.; Robbins, E.S.; Nussenzweig, V. y Andrews, N.W. (1990): The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J. Exp. Med., **171**: 401-413.
- Ley, V.; Andrews, N.W.; Robbins, E.S. y Nussenzweig, V. (1988): Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. J. Exp. Med., **168** (2): 649-659.
- Lherm, C.; Couvreur, P.; Loiseau, P.; Bories, C. y Gayral, P. (1987): Unloaded polyisobutylcyanoacrylate nanoparticles: efficiency against bloodstream trypanosomes. J. Pharm. Pharmacol., **39**: 650-652.
- Lima, M.F. y Kierszenbaum, F. (1984): Effects of treatment of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* or host cells with ethidium bromide on cell infection and intracellular fate of the parasite. J. Parasitol., **70** (6): 911-917.
- Lima, M.F. y Kierszenbaum, F. (1984): Lysis of vector-transmissible, metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* by avian serum. J. Parasitol., **70** (1): 155-156.
- Lima, M.T.; Lenzi, H.L. y Gattass, C.R. (1995): Negative tissue parasitism in mice injected with a noninfective clone of *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res., **81** (1): 6-12.
- Lissaldo, A.M.; Hoshino Shimizu, S.; Umezawa, E.S. y Stoff, A.M. (1994): Alkaline soluble *Trypanosoma cruzi* epimastigote antigen (ASEA) applied to Dot-ELISA. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **36** (2): 163-166.
- Littlefield, N.A.; Gaylor, D.W.; Bleckwell, N. y Allen, R.R. (1989): Chronic toxicity/carcinogenicity studies of gentian violet in Fischer 344 rats: two-generation exposure. Food Chem. Toxicol., **27**: 239-247.
- Littlefield, N.A.; Blackwell, N.; Hewitt, C.C. y Gaylor, D.W. (1985): Chronic toxicity and carcinogenicity studies of gentian violet in mice. Fundam. Appl. Toxicol., **5**: 902-912.
- Lopes, J.N.; Cruz, F.S.; Docampo, R.; Vasconcelos, M.E.; Sampalo, M.C.R.; Pinto, A.V. y Gilbert, B. (1978): In vitro and in vivo evaluation of the toxicity of 1,4-naphthoquinone and 1,2-naphthoquinone derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Ann. Trop. Med. Parasitol., **72**: 523-531.
- Lopes, L.; Samar, M.M. y Korolkovas, A. (1990): Ensaio biológico de novos derivados do ácido 3-fosfonopropiónico contra o *Trypanosoma cruzi*. Rev. Farm. Bioquím. Univ. S. Paulo, **26** (1): 53-64.
- Lopetegui, R. y Miatello, C.S. (1982): Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell-free liquid media. Revista Latinoamericana de Microbiología, **24** (2): 125-132.
- López Eyzaguirre, N. (1982): Culture of *Trypanosoma cruzi* on agar plates free of blood. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **77**: 740-741.
- Loures, M.A.; Pimenta, P.F. y de Souza, W. (1980): Isolation of Bloodstream Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* by a Gradient of Metrizamide. The Journal of Parasitology, **66**: 1058-1059.
- Luban, N.A. y Dvorak, J.A. (1974): *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. Selection for biological characteristics following intracellular passage. Experimental Parasitology, **36**: 143-149.
- Luquetti, A.O. (1990): Use of *Trypanosoma cruzi* defined proteins for diagnosis Multicentre trial. Serological and technical aspects. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., **85** (4): 497-505
- Luz, M.R.M.P., Soreiro, M.N.C. y Araujo Jorge, T.C. (1993): Improved enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the study of *Trypanosoma cruzi* host cell interaction in vitro. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **88** (2):235-241.
- Luz, Z.M.; Coutinho, M.C.; Cancado, J.R. y Krettl, A.U. (1994): Hemoculture: sensitive technique in the detection of *Trypanosoma cruzi* in chagasic patients in the chronic phase of Chagas' disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **27** (3): 143-148.
- Lloyd, D. y Kristensen, B. (1985): Metronidazole inhibition of hydrogen production in vivo in drug-sensitive and resistant strains of *Trichomonas vaginalis*. J. Gen. Microbiol., **131**: 849-853.
- Maekelt, G.A. (1969): Evaluación clínica y serológica de la droga Bay 2502 en pacientes con infección chagásica crónica. Bol. Chil. Parasitol., **24**: 95-96.
- Macedo, A.N.; Melo, M.N.; Gomes, R.F. y Pena, S.D.J. (1992): DNA fingerprints: a tool for identification and determination of the relationships between species and strains of Leishmania. Mol. Biochem. Parasitol., **53**: 63-70.
- Macina, R.A.; Sanchez, D.O.; Gluschkankof, D.A.; Burrone, O.R. y Frasch, A.C.C. (1986): Sequence diversity in the kinetoplast DNA minicircles of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., **21**: 25-32.
- Mahiou, V.; Roblot, F.; Hocquemiller, R.; Cave, A.; Rojas de Arias, A.; Inchausti, A.; Yaluff, G.; Fournet, A. y Angelo, A. (1994): New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. J. Nat. Prod., **57** (7): 890-895.

- Mahiou, V.; Roblot, F.; Hocquemiller, R. y Cave, A. (1995): Piperogalin, a new prenylated diphenol from *Peperomia galloides*. J. Nat. Prod., **58** (2): 324-328.
- Majunder, S.; Wirth, J.J.; Bittonti, A.J.; McCann, P.P. y Kierszenbaum, F. (1992): Biochemical evidence for the presence of arginine decarboxylase activity in *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol., **78** (2): 371-374.
- Malanga, C.M.; Conroy, J. y Cuckler, A.C. (1981): Therapeutic efficacy of several nitroimidazoles for experimental *Trypanosoma cruzi* infections in mice. J. Parasitol., **67** (1): 35-40.
- Maldonado, M.; Ichinose, Y.; Samudio, M.; Arias, A.; Sakamoto, M.; Azorero, R.M. y Kanbara, H. (1990): Application of two types of *Trypanosoma cruzi* amastigotes of different virulence to ELISA for Chagas' disease. Japan. J. Trop. Med. Hyg., **18** (4): 325-332.
- Malissos, W.M. (1947): The action of the endotoxin of *Trypanosoma cruzi* (KR) on malignant mouse tumors. Science, **106**: 591-594.
- Manigot, D.A. (1984): Benznidazole and chronic Chagas disease. Medicina (B Aires), **44** (1): 105-106.
- Mansfield, J.M. (1984): Parasitic Diseases Vol 2. The Chemotherapy. Marcel Dekker, INC. New York and Basel.
- Manzullo, E. y Darraidon, M. (1983): Evolucion electrocardiográfica de infectados chagásicos crónicos tratados y no tratados con nifurtimox. Proc. VI Reunion Nacional de Investigadores de la Enfermedad de Chagas, Buenos Aires, Argentina, p 14.
- Marcipar, A.; Barnes, S.; Lentnojt, E. y Brown, G. (1982): Immunoenzymatic determination of antibody-bound soluble antigens of *T. cruzi*. Applied Biochemistry and Biotechnology, **7**: 459-462.
- Maria, T.A.; Filardi, L.S. y Brener, Z. (1984): Ultrastructural alterations of intracellular stages and effects on blood forms of *Trypanosoma cruzi* induced in vitro by 2-amino-5-(methyl-5-nitro-2-imidazolyl)-1,3,4-thiadiazole. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **17**: 89-93.
- Marinkelle, C.J. (1965): Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between individuals of *Rhodnius prolixus*. Rev. Biol. Trop., **13**: 55-58.
- Marr, J.J. (1991): Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and american trypanosomiasis. J. Lab. Clin. Med., **118** (2): 111-119.
- Marr, J.J. y Docampo, R. (1986): Chemotherapy for Chagas' disease: A perspective of current therapy and considerations for future research. Reviews of infectious diseases, **6** (8): 884-903.
- Marr, J.J. y Berens, R.L. (1983): Pyrazolopyrimidine metabolism in the pathogenic Trypanosomatidae. Mol. Biochem. Parasitol., **7**: 339-356.
- Marr, J.J. y Berens, R.L. (1982): Antileishmanial action of 4-thiopyrazolo(3,4-d)pyrimidine and its ribonucleoside. Biochem. Pharmacol., **2**: 143-148.
- Marr, J.J., Berens, R.L. y Nelson, D.J. (1978): Antitrypanosomal effect of allopurinol: conversion in vivo to aminopyrazolopyrimidine nucleotides by *Trypanosoma cruzi*. Science, **201**: 1.018-1.020.
- Marr, J.J.: Pyrazolopyrimidine metabolism in Leishmania and trypanosomes: significant differences between host and parasite. J. Cell Biochem., **22** (3): 187-196.
- Marr, J.J.; Berens, R.L.; Cohn, N.K.; Nelson, D.J. y Klein, R.S. (1984): Biological action of inosine analogs in *Leishmania* and *Trypanosoma* spp. Antimicrob. Agents Chemother., **25**: 292-295.
- Marr, J.J. y Berens, R.L. (1988): Hypoxanthine and inosine analogues as chemotherapeutic agents in Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **83** (1): 301-307.
- Marreto, J.P. y Andrade, S.G. (1994): Biochemical behavior of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from mice submitted to specific chemotherapy. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **27** (4): 209-215.
- Martínez Díaz, R.A. (1992): Modelo "in vitro" para ensayos farmacológicos sobre formas intracelulares de *Trypanosoma cruzi*. Tesina de Licenciatura. U.C.M.
- Masana, M.I.; de Toranzo, E.G.D.; Rubio, M.C. y Castro, J.A. (1985): Effects of benznidazole on the mixed function oxygenase system from rat aliver microsomes. Arch. Int. Pharmacol. Ther., **276**: 4-11.
- Masana, M.; Toranzo, E.G.D.; Castro, J.A. (1984): Reductive metabolism and activation of benznidazole. Biochem. Pharmacol., **33**: 1041-1045.
- Mastov, D.A. y Simpson, L. (1995): Evolution of Parasitism in Kinetoplastid Protozoa. Parasitology Today, **11** (1): 30-32.
- Mayr, E.; Linsley, E.G. y Usinger, R.L. (1953): Methods and principles of systematic zoology. Mac Graw Hill Book Company, Inc., Londres.
- Mazz, S.; Basso, G.; Basso, R. (1942): Ensayos terapéuticos del producto 9736 (as) Bayer y de su acción comparada con el 7602 (Ac) en la enfermedad de Chagas. MEPRA, **61**: 1.

- Mazza, S.; Montaná, A.; Benítez, C. y Janfi, F.A. (1936): Transmisión de *Schizotrypanum cruzi*, al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. MEPRA, 28: 41-46.
- Medina Acosta, E. y Cross, G.A.M. (1983): Rapid isolation of DNA from trypanosomatid protozoa using a simple "mini-prep" procedure. Mol. Biochem. Parasitol., 59: 327-330.
- MCala, D.R.; Voutsinos, D. (1974): On the mutagenicity of nitrofurans. Mutation Research, 26: 3-16.
- McCabe, R.E.; Remington, J.S. y Araujo, F.G. (1984): Mechanisms of invasion and replication of the intracellular stage in *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immunol., 46 (2): 372-376.
- McCabe, R.E.; Remington, J.S. y Araujo, F.G. (1984): Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection of mice against lethal infection with the organism. J. Infect. Dis., 150 (4): 594-601.
- McCabe, R.; Remington, J. y Araujo, F. (1985): In vivo and in vitro activities of formycin B against *Trypanosoma cruzi*. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 27 (4): 491-494.
- McCabe, R.E.; Araujo, F.G. y Remington, J.S. (1983): Ketoconazole protects against infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32 (5): 960-962.
- McCabe, R.; Remington, J. y Araujo, F. (1986): In vivo and in vitro effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 35 (2): 280-284.
- McCabe, R.; Remington, J. y Araujo, F. (1985): In vivo and in vitro effects of cytosporin A on *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg., 34 (5): 861-865.
- McCabe, R. (1988): Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. J. Infect. Dis., 158 (6): 1408-1409.
- McCabe, R.E. (1988): Primaquine is lethal for intracellular but not extracellular *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol., 74 (5): 748-53.
- McCabe, R.E. y Mullins, B.T. (1990): Failure of *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages. Mechanism for immune evasion and importance of oxygen-independent killing. J. Immunol., 144 (6): 2384-2388.
- McCabe, R.E.; Remington, J.S. y Araujo, F.G. (1987): Ketoconazole promotes parasitological cure of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 81 (4): 613-615.
- McCann, P.P.; Bacchi, C.J.; Nathan, H.C. y Sjoerdsma, A. (1983): Polyamine antagonists for the cure of protozoan infection. En: Singer, T.P., Mansour, T.P. y Ondarza, R.N., eds.: Mechanisms of drug action. Nueva York, Academic Press, p. 121-133.
- McGrath, M.E.; Eakin, A.E.; Engel, J.C.; McKerrow, J.H.; Craik, C.S. y Fletterick, R.J. (1995): The crystal structure of cruzain: a therapeutic target for Chagas' disease. J. Mol. Biol., 247 (2): 251-259.
- Medina-Lopes, M.D. y Macêdo, V. (1987): Pesquisa dos *Trypanosoma cruzi* nas secreções lácteas de chagásicos crônicos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 20: 39.
- Medina-Lopes, M.D.; Guerra, L.M.P. y Macêdo, V. (1984): Estudo prospectivo sobre a transmissão congênita da Doença de Chagas. Relato de um caso assintomático. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 17: 83.
- Medina-Lopes, M.D. (1988): Transmission of *Trypanosoma cruzi* in a case, during lactation, in a non-endemic area. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 21 (3): 151-153.
- Meirelles, M.N. y De Souza, W. (1985): Killing of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*, and survival of *Toxoplasma gondii*, in chicken macrophages in vitro. J. Submicrosc. Cytol., 17 (3): 327-334.
- Meirelles, M.N.; Juliano, L.; Carmona, E.; Costa, E.M.; Silva, S.G.; Lima, A.T.; Arnholdt, A.V.; Leme, V.M.; Guimaraes, E.S.; Berro, O.J. et-al (1990): Functional and antigenic properties of the major cysteine proteinase (GP57/51) of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 85 (4): 533-538.
- Meirovich, C.I.; Montrull, H.L.; Gallerano, R.H. y Sosa, R.R. (1985): Allopurinol in the treatment of chronic Chagas' disease. Arg. Bras. Cardiol. Organ., 45 (3): 217-223.
- Melo, R.C. y Brener, Z. (1978): Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. J. Parasitol., 64: 475-482.
- Melo-Souza, S.; De Faria, C.; Rassi, A. y Leus, A. (1979): Polineuropatia com Benzonidazol no tratamento de Doença de Chagas. Abst. Congr. Intern. Doença de Chagas. Rio de Janeiro, Brasil. p. 146.
- Merenlender, A.M.; Woodruff, D.S.; Upatham, E.S.; Vityanant, V. y Yuan, H.C. (1987): Large Genetic Distance Between Chinese and Philippine *Schistosoma japonicum*. J. Parasitol., 73(4): 861-863.
- Mesa Valle, C.M.; Craciunescu, D.; Parrondo Iglesias, E. y Osuna, A. (1989): In vitro action of platinum (II) and platinum (IV) complexes on *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani*. Arzneimittelforschung, 39 (8): 838-842.
- Mester, B.; Claramunt, R.M.; Elguero, J.; Atienza, J.; Gomez Barrio, A.; Escario, J.A. (1991): Research for new antichagasic drugs. Chem. Pharm. Bull., 39 (8): 1990-1993.
- Mester, B.; Elguero, J.; Claramunt, R.M.; Castany, S.; Mascaro, M.L.; Osuna, A.; Vitaplana, M.J. y Molina, P. (1987): Activity against *Trypanosoma cruzi* of new analogues of nifurtimox. Arch. Pharm. Weinheim, 320(2): 115-120.

- Metcalf, B.W.; Bey, P.; Danzin, C.; Jung, M.J.; Casara, P. y Vever, J.P. (1978): Catalytic irreversible inhibition of mammalian ornithine dicarboxylase (ec 4.1.1.17) by substrate and product analogues. Journal of the American Chemical Society, **100**: 2551-2553.
- Metz, G.; Cartier, Y. y Vray, B. (1993): *Trypanosoma cruzi* upregulates nitric oxide release by IFN-gamma-primed macrophages. limiting cell infection independently of the respiratory burst. Parasite Immunol., **15** (12): 693-699.
- Meyer, H. y De Souza, W. (1976): Electron microscopic study of *Trypanosoma cruzi* periplast in tissue cultures. I. Number and arrangements of peripheral microtubules in the various forms of the parasite's life cycle. J. Protozool., **23**: 385-390.
- Meyer, H. (1979): *Trypanosoma cruzi* in tissue culture. Ciencia e Cultura, **31**: 49-54.
- Meyer, H.; Machado, R.D. y Cintra, W.H. (1982): On the cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures of the spinal and sympathetic ganglion from the chick embryo. Anais da Academia Brasileira de Ciencias, **54** (4): 739-742.
- Meyer, H. y Oliveira Musacchio, M.X. (1948): Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue cultures: A four-Year study. Parasitology, **39**: 91-94.
- Michels, P.A.M. (1988): Compartmentation of glycolysis in trypanosomes: a potential target for new trypanocidal drugs. Biol. Cell., **64** (2): 157-164.
- Miles, M.A.; Souza, A.; Shaw, J.J.; Lainson, R. y Toye, P.G. (1978): Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. Nature, **272**: 819-821.
- Miles, M.A.; Lanham, S.H.; Souza, A.A. y Pova, M. (1980): Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **74** (2): 221-237.
- Miles, M.A. (1983): The epidemiology of South American trypanosomiasis—biochemical and immunological approaches and their relevance to control. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **77** (1): 5-23.
- Miller, D.K.; Griffiths, E.; Lenard, J. y Firestone, R.A. (1983): Cell killing by lysosomotropic detergents. Journal of Cell Biology, **97**: 1.847-1.851.
- Miller, R.L. y Sabourin, C.L. (1983): Nucleoside synthesizing and cleaving activities in *Trypanosoma cruzi* extracts. J. Cell. Biochem., **7**(A): 15.
- Ming, M.; Ewen, M.E. y Pereira, M.E. (1995): Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. Cell, **82** (2): 287-296.
- Misset, O.; Bos, O.J. y Opperdoes, F.R. (1986): Glycolytic enzymes of *Trypanosoma brucei*. Simultaneous purification, intraglycosomal concentrations and physical properties. Eur. J. Biochem., **157**: 441-53.
- Misset, O. y Opperdoes, F.R. (1987): The phosphoglycerate kinase from *Trypanosoma brucei*: a comparison of the glycosomal and the cytosolic isoenzymes and their sensitivity towards suramin. Eur. J. Biochem., **162**: 493-500.
- Molyneux, D.H. y Ashford, R.W. (1983): The biology of *Trypanosoma* and *Leishmania*, parasites of man and domestic animals. Taylor y Francis (Eds.) Londres: 161-181.
- Moncada, C.; Repetto, Y.; Aldunate, J.; Letelier, M.E. y Morello, A. (1989): Role of glutathione in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to drugs. Comp. Biochem. Physiol. C, **94** (1): 87-91.
- Montamat, E.E.; De Luca d'Oro, G.; Perret, B. y Rivas, C. (1992): Characterization of *Trypanosoma cruzi* from Argentina by electrophoretic zymograms. Acta Trop. (Basel), **50**(2): 125-133.
- Montamat, E.E.; Burgos, C.; Gerez de Burgos, N.M.; Rovai, L.E.; Blanco, A. y Segura, E.L. (1982): Inhibitory action of gossypol on enzymes and growth of *Trypanosoma cruzi*. Science, **218** (4569): 288-289.
- Moore, G.E.; Gemer, R.E. y Franklin, H.A. (1967): Culture of normal human leukocytes. J. Am. Med. Assoc., **199**: 519-524.
- Moraes Souza, H. y Cervi, T. (1988): Estudo retrospectivo sobre o emprego da violeta de genciana no banco de sangue do Hospital escola da FMTM-Uberaba. En: Resumos da V Reuniao de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas, Araxa. p. 84.
- Moraes Souza, H.; Kervauy, J.; Barreto, O.C.; Puhler, G.M.; Nonoyama, K. y Juliano, Y. (1988): Metabolism and preservation of fresh and stored erythrocytes in blood treated with gentian violet. Braz. J. Med. Biol. Res., **21**: 241-246.
- Moraes Souza, H.; Bordin, J.O.; Bardossy, L. y Blajchman, M.A. (1994): Efficacy of leukodepletion in removing *T. cruzi* from contaminated blood. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **27** (3): 175.
- Morel, C.; Chiari, E.; Plessmann, E.; Mattei, D.M.; Romanha, A.J. y Simpson, L. (1980): Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. Am. J. Trop. Med. Hyg., **29** (5): 1070-1074.
- Morello, A. (1988): The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiology, **90** (1): 1-12.

- Morello, A.; Aldunate, J.; Letelier, M.E. y Repetto, Y. (1988): Biochemical bases of the action of anti-chagasic drugs. Arch. Biol. Med. Exp. Santiago, 21 (1): 93-99.
- Moreno, S.N.J. y Docampo, R. (1985): Mechanism of toxicity of nitro compounds used in the chemotherapy of trichomoniasis. Environ Health Perspect, 64: 199-208.
- Moreno, N.J.; Gadelha, F.R. y Docampo, R. (1988): Crystal violet as an uncoupler of oxidative phosphorylation in rat liver mitochondria. J. Biol. Chem., 263 (25): 12493-12499.
- Moreno, S.N.; Docampo, R.; Mason, R.P.; Leon, W. y Stoppani, A.O. (1982): Different behaviors of benznidazole as free radical generator with mammalian and *Trypanosoma cruzi* microsomal preparations. Arch. Biochem. Biophys., 218 (2): 585-591.
- Moreno, S.N. (1988): Metabolism and mode of action of gentian violet. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83 (1): 308-320.
- Moreno, S.N. (1988): The reductive metabolism of nifurtimox and benznidazole in *Crithidia fasciculata* is similar to that in *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol. C, 91 (2): 321-325.
- Moreno, S.N.; Carnieri, E.G. y Docampo, R. (1994): Inhibition of *Trypanosoma cruzi* trypanothione reductase by crystal violet. Mol. Biochem. Parasitol., 67 (2): 313-320.
- Morgan, G.J.; Morton, H.J. y Parker, R.C. (1950): Nutrition of animal cells in tissue culture. I. Initial studies on a synthetic medium. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 73: 1.
- Moro, A.; Ruiz Cabello, F.; Fernandez Cano, A.; Stock, R.P. y Gonzalez, A. (1995): Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a peptidyl-prolyl cis-trans isomerase involved in cell infection. EMBO J., 14 (11): 2483-2490.
- Morris, S.A.; Tanowitz, H.; Factor, S.M.; Bilezikian, J.P. y Wittner, M. (1988): Myocardial adenylate cyclase activity in acute murine Chagas' disease. Circ. Res., 62 (4): 800-810.
- Mortara, R.A. (1991): *Trypanosoma cruzi* amastigotes and trypomastigotes interact with different structures on the surface of HeLa cells. Exp. Parasitol., 73 (1): 1-14.
- Mortatti, R.C. y Munk, M.E. (1985): Separation of Bloodstream Trypomastigote of *Trypanosoma cruzi* by Density Gradient Centrifugation. J. Parasitol., 71: 520-521.
- Morton, H.J. (1970): A survey of commercially available tissue culture media. In vitro, 6: 89-108.
- Moser, D.R.; Kirchoff, L.V. y Donelson, J.E. (1989): Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA Amplification Using the Polymerase Chain Reaction. J. Clin. Microbiol., 27 (7): 1.477-1.482.
- Moya, P.R.; Paciasso, R.D.; Blanco, S.; Lapasset, M.; Sanmartino, C.; Basso, B.; Moretti, E. y Cura D. (1985): Treatment of Chagas' disease with nifurtimox during the first months of life. Medicina (B. Aires), 45 (5): 553-558.
- Mrema, J.; Slavik, M. y Davis, J. (1983): Spirogermanium: A new drug with antymalarial activity against chloroquine-resistant *Plasmodium falciparum*. Jornada internacional sobre farmacología clínica, terapia y toxicología, 21: 161-171.
- Murray, P.K.; Habbersett, M.C. y Meurer, R.D. (1983): *Trypanosoma cruzi*: efficacy of the 2-substituted, 5-nitroimidazoles, MK-436 and L634,549, in tissue culture and mice. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32 (6): 1242-1250.
- Murray, H.W. (1983): How protozoa evade intracellular killing. Ann. Intern. Med., 98 (6): 1016-1018.
- Murray, P.K.; Boltz, R. y Schmatz, D.M. (1982): Separation of individual stages of *Trypanosoma cruzi* grown in cell culture by continuous free-flow electrophoresis. Journal of Protozoology, 29 (1): 109-113.
- Musacchio, O.M. y Meyer, H. (1962): Aço do *Schizotrypanum cruzi* degenerado ou em suspensão de tripanosomas mortos sobre células nervosas em cultura de tecido de embrião de galinhas. An. Congr. Intern. Doença Chagas, 3: 1065-1068.
- Nagel, R. y Nepomnaschy, I. (1983): Mutagenicity of 2 anti-chagasic drugs and their metabolic deactivation. Mutat. Res., 117 (3-4): 237-242.
- Nagel, R. (1987): Genotoxicity studies with two antichagasic drugs. Mutat. Res., 191 (1): 17-20.
- Navarro, M.L.; Dain, A.M.; Miblgiorini, L. y Nagel, R. (1984): Clastogenic activity of two antichagasic drugs. Comun. Biol., 3: 25-28.
- Navin, T.R.; Roberto, R.R.; Juranek, D.D.; Limpakarnjanarat, K.; Mortenson, E.W.; Clover, J.R.; Yescott, R.E.; Taclindo, C.; Steurer, F. y Allain, D. (1985): Human and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in California. Am. J. Public Health, 75 (4): 366-369.
- Neal, R.A. y van Bueren, J. (1988): Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82 (5): 709-714.
- Nelson, D.J.; Lafon, S.W.; Tuttle, J.V.; Miller, W.H.; Miller, R.L.; Krenitsky, T.A.; Ellison, G.B.; Berens, R.L. y Marr, J.J. (1979): Allopurinol ribonucleoside as an antileishmanial agent. J. Biol. Chem., 254: 11544-11549.
- Neva, F.A. y Gam, A.A. (1977): A complement-fixing antigen from *Trypanosoma cruzi* grown in cell cultures. Am. J. Trop. med. Hyg., 26: 37-46.

- Neves, D.P. (1971): Influência da temperatura na evolução do *Trypanosoma cruzi* em triatomíneos. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, **13**: 155-161.
- Neville, M.C. y Verge, J.P. (1977): Antiprotozoal thiazoles 2.2.-(5-nitro-2-furil-thiazolil, and 1-methylimidazolyl-) thiazoles. J. Med. Chem., **20**: 946.
- Newton, B. (1957): The mode of action of phenanthridines: The effect of ethidium bromide on cell division and nucleic acid synthesis. J. Gen. Microbiol., **17**: 718-730.
- Nickerson, P.; Orr, P.; Schoroder, M.I.; Sekta, L. y Johnston, J.B. (1989): Transfusion-associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. Annals of Internal Medicine, **111**: 851-853.
- Nilsson, L.A. y Voller, A. (1982): A comparison of thin layer immunoassay (TIA) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **76**: 95-97.
- Nirschl, R.A.; Soares Junior, J.M.; Pirani, E.M.; Franciscon, J.U. y Ramirez, L.E. (1994): Susceptibility to *Triatoma infestans* to various strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from chagasic patients from the Triangulo Mineiro. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **27** (4): 235-239.
- Nogueira, N. y Cohn, Z. (1976): *Trypanosoma cruzi*: Mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. J. Exp. Med., **143**: 1402-1420.
- Nogueira, N. (1983): Host and parasite factors affecting the invasion of mononuclear phagocytes by *Trypanosoma cruzi*. Ciba Found Symp., **99**: 52-73.
- Nogueira, N.; Chaplan, S. y Cohn, Z. (1980): *Trypanosoma cruzi*: factors modifying ingestion and fate of blood forms trypomastigotes. J. Exp. Med., **152**: 447-451.
- Norris, K.A.; Schrimp, J.E.; Flynn, J.L. y Morris, S.M.Jr. (1995): Enhancement of macrophage microbicidal activity: supplemental arginine and citrulline augment nitric oxide production in murine peritoneal macrophages and promote intracellular killing of *Trypanosoma cruzi*. Infect. Immun., **63** (7): 2793-2796.
- Nothenberg, M.S.; Takeda, G.K. y Najjar, R. (1991): Adducts of nitroimidazole derivatives with rhodium(II) carboxylates: syntheses, characterization, and evaluation of antichagasic activities. J. Inorg. Biochem., **42** (3): 217-229.
- Nussenzweig, V.; Sonntag, R.; Freitas, J.L.P.; Biancalana, A.; Amato Neto, V. y Kloetzel, J. (1953): Ação de corantes trifenil-metânicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro". Emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da moléstia de Chagas por transfusão de sangue. Hospital, **44**: 731-744.
- Nussenzweig, V.; Biancalana, A.; Amato Neto, V.; Sonntag, R.; Freitas, J.L.P. y Kloetzel, J. (1953): Ação da violeta de genciana sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro": sua importância na esterilização do sangue destinado à transfusão. Rev. Paul. Med., **42**: 57-58.
- Nussenzweig, V. y Goble, F. (1966): Further studies on the antigenic constitution of strains of *Trypanosoma cruzi*. Exp. Parasitol., **18**: 224-230.
- Nussenzweig, V.; Nussenzweig, R.; Freitas, J.L.P.; Amato Neto, V.; Biancalana, A. y Kloetzel, J. (1954): Ação de agentes físicos e químicos sobre o *Trypanosoma cruzi* "in vitro". Hospital, **45**: 589-599.
- Nussenzweig, V.; Amato Neto, V. y Mellone, O. (1959): Novos dados sobre o emprego da violeta de genciana na profilaxia da transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. Hospital, **55**: 183-188.
- O'Daly, J.A.; Rodríguez, M.B. y Garfin, G. (1987): *Trypanosoma cruzi*: Growth Requirements of Different Temperatures in Foetal Bovine Serum or Peptide Supplemented Media. Experimental Parasitology, **64**: 78-87.
- O'Daly, J.A. (1975): A new liquid medium for *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. J. Protozool., **22**: 265-270.
- O'Daly, J.A. (1976): Effect of fetal calf serum fractions and proteins in division and transformation of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* "in vitro". J. Protozool., **23**: 577-583.
- Oddo, D.; Casanova, M.; Acuña, G.; Ballesteros, J. y Morales, B. (1992): Acute Chagas' disease (Trypanosomiasis americana) in acquired immunodeficiency syndrome: report of two cases. Hum. Pathol., **23** (1): 41-44.
- Ohnishi, T.; Ohashi, Y.; Nozu, K. y Inoki, S. (1983): Mutagenicity of the anti-trypanosomal drug, Ro 7-1051, in *Escherichia coli*. Mutation Res., **58**: 505-509.
- Ohnishi, T.; Ohashi, K.; Nozu, K.; Inoki, S. (1980): Mutagenicity of nifurtimox in *Escherichia coli*. Mutation Res., **77**: 241-244.
- Okumura, M.; Amato Neto, V.; Kitagawa, M.M.; Takamatsu, N.K.; Ishikawa, P.S.; Iizuka, F.H. y Iriya, K. (1990): Atividade terapêutica do benzonidazol em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e imunodeprimidos por associação de ciclosporina com prednisona. Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Sao Paulo, **45** (6): 260-262.
- Olcina, M.A. y Blanco, A. (1990): Effects of gossypol on infected mice with *Trypanosoma cruzi*. Acta Phys. Pharm. Lat. Am., **40** (2): 219-226.
- Olivares Fontt, E. y Vray, B. (1995): Relationship between granulocyte macrophage-colony stimulating factor, tumour necrosis factor- α and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. Parasite Immunol., **17** (3): 135-141.

- OMS (1985): Chagas' disease in the region of the Americas. Current status. Week. Epidemiol. Record, **60**: 37-42.
- OMS (1985): Meeting on the development of trypanocidal compounds for the sterilization of blood. TDR/CHA/BS, **84**: 3.
- OMS (1986): Major parasitic infections: a global review. Parasitic Diseases Programme. World Health Organization, Geneva. World Health Stat Q., **39** (2): 145-160.
- Oppendoes, F.R. y Borst, P. (1977): Localization of nine glycolytic enzymes in a microbody-like organelle in *Trypanosoma brucei*: the glycosome. FEBS Lett., **80**: 360-364.
- Oppendoes, F.R. (1987): Compartmentation of carbohydrate metabolism in trypanosomes. Ann. Rev. Microbiol., **41**: 127-151.
- Oppendoes, F.R.; Misset, O. y Hart, D.T. (1984): Metabolic pathways associated with the glycosomes (microbodies) of the Trypanosomatidae. En: Molecular parasitology. August, J.T. eds. Academic Press, Nueva York, páginas 63-75.
- Oppendoes, F.R. (1983): Glycolysis is targeted for the development of new trypanocidal drugs. En: Mechanisms of drug action. Singer, T.P., Mansour, T.P. y Ondarza, R.N. eds. Academic Press, Nueva York, p. 159-175.
- Oppendoes, F.R.; Borst, P. y Fonk, K. (1976): The potential use of inhibitors of glycerol-3-phosphate oxidase for chemotherapy of African trypanosomiasis. FEBS Lett., **62**: 169-172.
- Ortega Barria, E. y Pereira, M.E.A. (1991): A novel *Trypanosoma cruzi* heparin-binding protein promotes fibroblast adhesion and penetration of engineered bacteria and trypanosomes into mammalian cells. Cell, **67** (2): 411-421.
- Osuna, A.; Gamarro, F.; Castanys, S. y Ruiz Pérez, L.M. (1986): Inhibition of lysosomal fusion by *Trypanosoma cruzi* in peritoneal macrophages. Int. J. Parasitol., **16** (6): 629-632.
- Osuna, A.; Ortega, Gamarro, F.; Castanys, S. y Mascaro, M.C. (1984): Some factors affecting the in vitro invasion of HeLa cells by *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Parasitol., **14** (3): 253-257.
- Osuna, A.; Castanys, S.; Mascaro, C.; Adroher, F.J. Braña, M.F. y Roldán, C.M. (1983): In vitro action of three benzo (de) isoquinoline-1,3-dione derivatives against *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo., **25** (5): 254-258.
- Osuna, A.; Gamarro, F.; Castanys, S. y Ruiz Pérez, L.M. (1985): Effect of proteolytic enzymes on the penetration of *Trypanosoma cruzi* into mouse peritoneal macrophages. Anales de Parasitologie Humaine et comparée, **60** (4): 383-388.
- Osuna, A.; Ruiz-Pérez, L.M.; López, M.C.; Castanys, S.; Gamarro, F.; Craciunescu, D.G. y Alonso, C. (1987): Antitrypanosomal action of cis-diamminedichloroplatinum (II) analogs. J. Parasitol., **13**: 272-277.
- Osuna, A.; Castanys, S.; Ortega, G.; Gamarro, F.; Aneiros, J.; Braña, M.F. y Roldán, C.M. (1983): Ultrastructural study of the effect of 2 derivatives benzo (de) isoquinoline-1,3-dione on *Trypanosoma cruzi* in vitro. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo., **25** (3): 133-138.
- Osuna, A.; Ruiz-Perez, L.M.; Gamarro, F.; Rodríguez-Santiago, J.I.; Castanys, S.; Sharples, D.; Galy, A.M.; Giovannageli, G.; Galy, J.P.; Soyfer, J.C. et al. (1988): New antiparasitic agents. III. Comparison between trypanocidal activities of some acridine derivatives against *Trypanosoma cruzi* in vitro. Chemotherapy, **34** (2): 127-133.
- Osuna-Carrillo, A.; Jimenez-Ortiz, A.; Guevara Benítez, D.C. y Guevara Pozo, D. (1980): Cultivo "in vitro" de *Trypanosoma cruzi* sobre células HeLa: interacciones parásito-célula hospedadora. Revista Ibérica de Parasitología, **40** (3): 283-293.
- Osuna-Carrillo, A.; Jimenez-Ortiz, A. y Lozano-Maldonado, J. (1979): Medios de cultivo para la obtención de formas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi*. Revista Ibérica de Parasitología, **39**: 129-133.
- Ouaisi, M.A.; Afchain, D.; Capron, A. y Grimaud, J.A. (1984): Fibronectin receptors on *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and their biological function. Nature, **308** (5957): 380-382.
- Ouaisi, A.; Cornette, J.; Taibi, A.; Velge, P. y Capron, A. (1988): Major surface immunogens of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., **83** (1): 502.
- Ouaisi, M.A.; Cornette, J. y Capron, A. (1986): Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. Mol. Biochem. Parasitol., **19** (3): 201-211.
- Ouaisi, M.A.; Cornette, J.; Afchain, D.; Capron, A.; Gras-Masse, H. y Tartar, A. (1986): *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. Science, **234** (4776): 603-607.
- Packchanian, A. (1952): Chemotherapy of experimental Chagas disease with nitrofurans compounds. J. Parasitol., **38**: 30.
- Packchanian, A. y Sweetts, H.H. (1947): Infectivity of *Trypanosoma cruzi* after cultivation for thirteen years in vitro without animal passage. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., **64**: 169-176.
- Page, H. (1982): Some cautionary notes on prescribing allopurinol. JAMA, **248**: 519.
- Pan, S.C. (1982): Establishment of clones of *Trypanosoma cruzi* and their characterization in vitro and in vivo. Bull. World Health Organ., **60** (1): 101-117.

- Pan, C.T. (1971): Cultivation and morfogenesis of *Trypanosoma cruzi* in improved liquid media. J. Protozool., **18**: 556-560.
- Pate, P.G.; Wolfson, J.S.; McHugh, G.L.; Pan, S.C. y Swartz, M.N. (1986): Novobiocin antagonism of amastigotes of *Trypanosoma cruzi* growing in cell-free medium. Antimicrobial Agents Chemother., **29**: 426-431.
- Paulos, C.; Paredes, J.; Vasquez, J.; Thambo, S.; Arancibia, A. y Gonzalez-Martin, G. (1989): Pharmacokinetics of a nitrofuran compound, nifurtimox, in healthy volunteers. Int. J. Clin. Pharmacol. Ther. Toxicol., **27** (9): 454-457.
- Pearson, R.D.; Manian, A.A.; Harais, J.L.; Hall, D. y Hewlett, E.L. (1982): Lethal effect of phenothiazine neuroleptics on the pathogenic protozoan *Leishmania donovani*. Science, **217**: 369-371.
- Pecca, J.G. y Albonico, S.M. (1970): Synthetic trypanocides. 1. Substituted 1,2,3,4-tetrahydrocarbazoles. J. Mednl. Chem., **13**: 327-328.
- Peixoto, M.P. y Beverley, S.M. (1987): In vitro activity of sulfonamides and sulfones against *Leishmania major* promastigotes. Antimicrob. Agents Chem., **31**: 1575-1578.
- Penin, P.; De Diego, J.A.; Del Rey, J.; Mayer, R. y Gamallo, C. (1990): Acute chagasic cardiopathy produced by a strain of *Trypanosoma cruzi* (type I) in an experimental model. Ann. Parasitol. Hum. Comp., **65** (5-6): 208-213.
- Penketh, P.G. y Kelin, R.A. (1986): Hydrogen peroxide metabolism in *Trypanosoma brucei*. Mol. Biochem. Parasitol., **20**: 111-121.
- Penketh, P.G.; Kennedy, W.P.K.; Patton, C.L. y Sartorelli, A.C. (1987): Trypanosomatid hydrogen peroxidase metabolism. FEBS Letters, **221**: 427-31.
- Pereira, M.E.A.; Loures, M.A.; Villalta, F. y Andrade, A.F.B. (1980): Lecitin receptors as markers for *Trypanosoma cruzi*. Developmental stages and a study of the interaction of wheat germ agglutinin with sialic acid residues on epimastigote cells. Journal of Experimental Medicine, **152** (5): 1357-1392.
- Pereira, M.E. (1983): A developmentally regulated neuraminidase activity in *Trypanosoma cruzi*. Science, **219** (4591): 1444-1446.
- Pereira da Silva, H.L. y Kirchner, E. (1962): Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection in tissue culture. A comparative study on the action of primaquine, carbidium sulphate and the aminonucleoside of styliomycin. Rev. Inst. med. Trop. Sao Paulo, **4**: 16-28.
- Pereira, M.E.A.; Andrade, A.F.B. y Ribeiro, J.M.C. (1981): Lectins of distinct specificity in *Rhodnius prolixus* interact selectively with *Trypanosoma cruzi*. Science, **211**: 597-600.
- Pereira Barretto, O.C.O.; Amato Neto, V.; Castilho, E.A.; Moreira, A.A.B.; Nonoyama, K.; Kanaka, K.; Sawastani, E.; Pinto, P.L.S.; Okumura, Y. y Campos, R. (1983): Efeito da anfotericina B sobre a viabilidade eritrocitaria. Perspectivas do seu uso na prevenção da doença de Chagas induzida pela transfusão de sangue. Rev. Paulista Med., **101**: 212-216.
- Pereira, M.E. y Hoff, R. (1986): Heterogeneous distribution of neuraminidase activity in strains and clones of *Trypanosoma cruzi* and its possible association with parasite myotropism. Mol. Biochem. Parasitol., **20** (2): 183-189.
- Pereira, V.L.; Levy, A.M. y Boainain, E. (1989): Xenodiagnosis, hemoculture and the complement mediated lysis test, as criteria in selecting chronic chagasic patients for chemotherapy. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, **31** (5): 301-307.
- Pernin, P.; Cariou, M.L. y Jacquier, A. (1985): Biochemical Identification and Phylogenetic Relationships in Free-Living Amoebas of the Genus *Naegleria*. J. Protozool., **32**(4): 592-603.
- Petry, K. y Eisen, H. (1989): Chagas' disease: a model for the study of autoimmune diseases. Parasitol. Today, **5**: 111-116.
- Peyrol, S.; Ouaisi, M.A.; Capron, A. y Grimaud, J.A. (1987): *Trypanosoma cruzi*: ultrastructural visualization of fibronectin bound to culture forms. Exp. Parasitol., **63** (1): 112-114.
- Pfefferkorn, L.C. y Pfefferkorn, E.R. (1980): *Toxoplasma gondii*: genetic recombination between drug resistant mutants. Exp. Parasitol., **50**: 305-316.
- Phillips, M.A.; Coffino, P. y Wang, C.C. (1987): Cloning and sequencing of the ornithine decarboxylase gene from *Trypanosoma brucei*: implications for enzyme turnover and selective difluoromethylornithine inhibition. J. Biol. Chem., **262**: 8721-8727.
- Piazza, R.M.; de Andrade Junior, H.F.; Umezawa, E.S.; Katzin, A.M. y Stolf, A.M. (1994): In situ immunoassay for the assessment of *Trypanosoma cruzi* interiorization and growth in cultured cells. Acta Trop., **57** (4): 301-306.
- Piesman, J. y Sherlock, I.A. (1985): *Trypanosoma cruzi*: kinetics of metacyclogenesis in adult and nymphal *Panstrongylus megistus*. Exp. Parasitol., **59** (2): 231-238.
- Pinho, R.T.; Dutra, H.S.; Giovanni de Simone, S. y de Carvalho, L.C. (1991): A glass wool-based method for purifying *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes and identification of an epimastigote-specific glass-adherent surface peptide. Acta Trop. (Basel), **50** (1): 29-38.
- Pinto Dias, J.C. y Brener, S. (1984): Chagas' disease and blood transfusion. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **79**: 139-147.

- Pinto, A.V.; Ferreira, V.F.; Capella, R.S.; Gilbert, B.; Pinto, M.C.R. y Santana da Silva, J. (1987): Activity of some naphthoquinones on blood stream forms of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 81: 609-610.
- Pinto, F.H.; Ribeiro, R.D.; Belda Neto, F.M. y do Prado Junior, J.C. (1986): Comparative study of the behavior of infection in mice, through subcutaneous and intraperitoneal inoculation, using 2 strains of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Saude Publica, 20 (2): 133-140.
- Pipkin, A.C. (1969): Transmission of *Trypanosoma cruzi* by arthropod vectors: anterior versus posterior route infection. Int. Rev. Trop. Med., 3: 1-47.
- Piras, M.M.; Piras, R.; Henriquez, D. y Negri, S. (1982): Changes in morphology and infectivity of cell culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., 6 (2): 67-81.
- Piras, R.; Piras, M.M. y Henriquez, D. (1982): The effect of inhibitors of macromolecular biosynthesis on the in vitro infectivity and morphology of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Mol. Biochem. Parasitol., 6 (2): 83-92.
- Pizzi, T. (1961): Un derivado imidazolico efectivo en el tratamiento de las infecciones experimentales por *Trypanosoma cruzi*. Bol. Chil. Parasitol., 16: 35-36.
- Pizzi, T. (1951): Efecto de primaquina on experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Procee. Soc. Exp. Biol. Med., 78: 643-644.
- Polack, A. y Riehle, R. (1978): Mecanismo de acción do derivado 2-nitroimidazolico benzonidazol. Ann. Trop. Med. Parasitol., 72 (1): 228-232.
- Poliakoff, N.; Albonico, S.M.; Alvarez, M.; Pecca, J.G. y Vernengo, M.J. (1973): Synthetic trypanocides. 3. Structure-activity relationship. J. Med. Chem., 16: 1411-1413.
- Pollard, W.J. y Walker, M.J. (1990): Animal Cell Culture, Humana Press. Clifton, New Jersey.
- Postan, M.; McDaniel, J.P. y Dvorak, J.A. (1986): *Trypanosoma cruzi*: constancy of clone pathogenicity for inbred mice during long-term in vitro maintenance. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 80 (4): 659-662.
- Prado Junior, J.C.; Ribeiro, R.D.; Albuquerque, S.; Carraro, A.A.; Lopes, R.A. y Garcia, T.A.R. (1992): Natural infection of Guarã, *Chrysocyon brachyurus*, by *Trypanosoma cruzi*. 14º Encontro de Pesquisas Veterinarias UNESP, p. 246.
- Prado Junior, J.C.; Ribeiro, R.D.; Albuquerque, S.; Carraro, A.A.; Lopes, R.A.; Garcia, T.A.R. y Toldo, M.A. (1992): Infecção natural do Gato do Mato, *Felis yagouaroundi*, pelo *Trypanosoma cruzi*. 14º Encontro de Pesquisas Veterinarias (UNESP), p. 247.
- Prata, A. (1978): Possibilidade do tratamento da doença de Chagas. Rev. Assoc. Med. Bras., 24: 140-142.
- Prata, A. y Macedo, V. (1975): Tratamento da doença de Chagas pelo Nifurtimox (Bayer 2502). Rev. Soc. Bras. Med. Trop., IX (6): 297-307.
- Prioli, R.P.; Rosenberg, I. y Pereira, M.E. (1990): High- and low-density lipoproteins enhance infection of *Trypanosoma cruzi* in vitro. Mol. Biochem. Parasitol., 38 (2): 191-198.
- Prioli, R.P.; Mejia, J.S. y Pereira, M.E. (1990): Monoclonal antibodies against *Trypanosoma cruzi* neuraminidase reveal enzyme polymorphism, recognize a subset of trypomastigotes, and enhance infection in vitro. J. Immunol., 144 (11): 4384-91.
- Qiang, S.Z. y Wang, Z.G. (1984): Gossypol: a potential antifertility agent for males. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 24: 329-360.
- Raafliub, J. (1980): Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. Arzneimittelforsch., 30: 2192-2194.
- Raether, W. y Seidenath, H. (1984): Ketoconazole and other potent antimycotic azoles exhibit pronounced activity against *Trypanosoma cruzi*, *Plasmodium berghei* and *Entamoeba histolytica* in vivo. Z. Parasitenkd., 70 (1): 135-138.
- Raether, W. y Deutschlander, N. (1979): DOE 239 (Fexnidazole), a 5-nitroimidazole highly potent against *Trypanosoma cruzi* in NMRI mice. Proc. Congr. Intern. sobre Doença de Chagas, p 142.
- Raether, W. y Seidenath, H. (1983): The activity of fexnidazole (HOE 239) against experimental infections with *Trypanosoma cruzi*, trichomonads and *Entamoeba histolytica*. Ann. Trop. Med. Parasitol., 77 (1): 13-26.
- Rainey, P.; Garrett, C.E. y Santì, D.V. (1983): The metabolism and cytotoxic effects of Formycin B in *Trypanosoma cruzi*. Biochem Pharmacol., 32 (4): 749-752.
- Rakhmatullin, E.K. y Tsvetkova, N.I. (1989): Testing Azidin, Diamidin and allopurinol for mutagenicity. Veterinariya (Moscu), 9: 60-61.
- Ramirez, L.E.; Lages Silva, E.; Pianetti, G.M.; Rabelo, R.M.; Bordin, J.O. y Moraes Souza, H. (1995): Prevention of transfusion-associated Chagas' disease by sterilization of *Trypanosoma cruzi* infected blood with gentian violet, ascorbic acid and light. Transfusion, 35 (3): 226-230.
- Rao, D.N.; Jordan, S. y Mason, R.P. (1988): Generation of nitro radical anions of some 5-nitrofurans, and 2- and 5-nitroimi

- dazoles by rat hepatocytes. Biochem. Pharmacol., **37** (15): 2907-2913.
- Rao, D.N. y Mason, R.P. (1987): Generation of nitro radical anions of some 5-nitrofurans, 2- and 5-nitroimidazoles by norepinephrine, dopamine, and serotonin. A possible mechanism for neurotoxicity caused by nitroheterocyclic drugs. J. Biol. Chem., **262** (24): 11731-11736.
- Rassi, A. y Ferreira, H.O. (1971): Tentativas de tratamento específico da fase aguda da doença de Chagas com nitrofuranos em esquemas de duração prolongada. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **5**: 235-262.
- Reed, S.G. (1988): In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. J. Immunol., **140** (12): 4342-4347.
- Reis, C.C.; Utrilla, L.S.; Ribeiro, R.D.; Lopes, R.A. y Martini, A.S. (1989): Can cocaine block the uptake of neurotoxin produced by *Trypanosoma cruzi*? Angew. Parasitol., **30** (4): 239-247.
- Requejo, H.I.; Nakamura, P.M.; Vaz, A.J.; Pialarissi, C.S.; Hoshino Shimizu, S.; Matsumoto, T.K. y Nakamura, H. (1991): Diffusion-in-gel enzyme-linked immunosorbent assay (DIG-ELISA) for Chagas' disease serodiagnosis. Braz. J. Med. Biol. Res., **24** (5): 471-483.
- Reszka, K.; Cruz, F.S. y Docampo, R. (1986): Photosensitization by the trypanocidal agent crystal violet. Type I versus type II reactions. Chem. Biol. Interact., **58** (2): 161-172.
- Rezende, J.M.; Zupelli, W. y Bafutto, M.G. (1965): O problema da transmissão da doença de Chagas por transfusão de sangue. O emprego da violeta de genciana como medida profilática. Rev. Goiana Med., **11**: 35-47.
- Ribeiro, R.D.; Lopes, R.A.; Carmo, T.A. y Rissato, T.A. (1988): Índice de cura de camundongos tratados com nifurtimox e benzonidazol na doença de Chagas experimental. Rev. Cien. Farm. S. Paulo, **10**: 71-76.
- Ribeiro dos Santos, R. y Hudson, L. (1980): *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cells. Clin. Exp. Immunol., **40**: 36.
- Ribeiro, R.D.; Belda Neto, F.M. y Barretto, M.P. (1977): Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi*. LXII.: Evolução do *Trypanosoma cruzi* na cavidade celômica de triatomíneos. Rev. Bras. Biol., **37**: 55-59.
- Ribeiro, R.D.; Belda Neto, F.M. y Ferrioli Filho, F. (1982): Behavior of blood-stream trypomastigotes of substrains of *Trypanosoma cruzi* intravenously inoculated in normal and immune mice. Rev. Bras. Biol., **42** (1): 79-83.
- Ribeiro, R.D.; Belda Neto, F.M.; Prado Junior, J.C. y de Albuquerque, S. (1986): Behavior of the blood forms of *Trypanosoma cruzi* obtained from mice used as biological filters, in culture and in triatomide. Rev. Saude Publica, **20** (2): 129-132.
- Ribeiro, R.D.; Rissato e Garcia, T.A. y Bonomo, W.C. (1987): Mechanisms of transmission of the etiological agent of Chagas' disease. Rev. Saude Publica, **21** (1): 51-54.
- Ribeiro, R.D.; Lopes, R.A.; Garcia, T.A. y Carraro, A.A. (1990): A new aspect of the morphological transformation of *Trypanosoma cruzi* brought about by environmental variation. Angew. Parasitol., **31** (4): 207-210.
- Ribeiro, R.D.; Belda Neto, F.M. y Prado Junior, J.C. (1986): Behavior of *Trypanosoma cruzi* strains in agglutination reactions. Rev. Fac. Odontol. Ribeiro Preto, **23** (2): 208-212.
- Ribeiro, R.D.; Albuquerque, S.; Carraro, A.A.; Lopes, R.B.; Prado Jr., J.C.; Garcia, T.A.R y Toldo, M.P.A. (1993): Uma nova cepa do *Trypanosoma cruzi* isolada do triatomíneo *Triatoma infestans*. **45ª Reunião da SBPC**, p. 769.
- Richle, R. (1974): Chemotherapy of experimental acute Chagas' disease in mice: parasitological cure by Ro 7-1051. Proc. Third Int. Congr. Parasitol., Munich, **3**: 1296-1297.
- Rimoldi, M.T.; Tenr, A.J.; Bobak, D.A. y Joiner, K.A. (1989): Complement components C1q enhances invasion of human mononuclear phagocytes and fibroblasts by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. J. Clin. Invest., **84** (6): 1982-1989.
- Rimoldi, M.T.; Tartanian, A. y Joiner, K.A. (1989): Lytic rabbit IgG for tissue culture trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* alters the extent and form of complement deposition. Exp. Parasitol., **68** (2): 160-167.
- Riou, G.F.; Gbillot, M.; Douc Rasy, S. y Kayser, A.W. (1984): DNA topoisomerase(s) of trypanosomes: inhibitory effect of some chemicals. En: Molecular biology of host-parasite interactions, Ed. Agabian, N.; Eisen, H.; Alan Liss, Nueva York. p 279-289.
- Riscoe, M.K.; Ferro, A.J. y Fitch, J.H. (1988): Analogs of 5-Methylthioribose, a novel class of antiprotozoal agents. Antimicrob. Agents Chemother., **32** (12): 1904-1906.
- Rocha, A.; Mineo, J.R.; Lopes, E.R.; Bessa, J.C.; Ferreira, A.P.; Segadaes Filho, A.J.; de Menezes, T.G. y Costa, M.C. (1987): ELISA immunoenzymatic assay in the pericardial fluid: a new method for the post-mortem diagnosis of Chagas disease. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **20** (4): 213-216.
- Rodríguez, E. (1989): Desarrollo y modo de acción de drogas tripanocidas para tratar sangre humana contaminada con *Trypanosoma cruzi*. Thesis. Facultad de Ciencias Veterinarias y Pecuarias, Universidad de Chile.
- Rohwedder, R.W. (1969): Chagas' infection in blood donors and the possibility of its transmission by blood transfusion. Bel.

- Chil. Parasitol., 24 (1): 88-93.
- Rojas de Arias, A.; Ferro, E.; Inchausti, A.; Ascurra, M.; Acosta, N.; Rodriguez, E. y Fournet, A. (1995): Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. J. Ethnopharmacol., 45 (1): 35-41.
- Romana, C. (1953): Ensayos de antibióticos y quimioterápicos en la enfermedad de Chagas. An. Inst. Med. Rep. Tucuman, 3: 255.
- Rosemberg, S.; Chaves, C.J.; Higuchi, M.L.; Lopes, M.B.; Castro, L.H. y Machado, L.R. (1992): Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. Neurology, 42 (3): 640-642.
- Rottenberg, M.E.; Riarte, A.; Sporrang, L.; Altchek, J.; Petray, P.; Ruiz, A.M.; Wigzell, H. y Orn, A. (1995): Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. Immunol. Lett., 45 (1-2): 52-60.
- Roval, L.E.; Aoki, A.; Gerez de Burgos, N.M. y Blanco, A. (1990): Effect of Gossypol on trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., 37: 280-286.
- Rowland, E.; Luo, H. y McCormick, T. (1995): Infection characteristics of an Ecuadorian *Trypanosoma cruzi* strain with reduced virulence. J. Parasitol., 81 (1): 123-126.
- Rubio, M. (1955): Influencia del acetato de cortisona sobre la virulencia y localización tisular de una nueva cepa de *Trypanosoma cruzi*. Estudio de la persistencia de los cambios observados. Biológica, 21: 75-89.
- Rubio, M. (1954): Estudio de los factores que intervienen en la virulencia de una cepa de *Trypanosoma cruzi*. Acción de la cortisona en la capacidad de invasión y multiplicación del parásito. Biológica, 20: 89-125.
- Rubiolo, E.R. y Cano, R.C. (1987): In vivo and in vitro susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to ketoconazole. Rev. Latinoam. Microbiol., 29 (4): 395-401.
- Ruiz Pérez, L.M.; Osuna, A.; Castany, S.; Gamarro, F.; Craciunescu, D.G. y Doadrio, A. (1986): Evaluation of the toxicity of Rb(III) and Pt(II) complexes against *Trypanosoma cruzi*. Arzneimittel Forschung Drug Research, 36: 13-15.
- Ruiz Perez, L.M.; Osuna, A.; Lopez, M.C.; Gamarro, F.; Castany, S.; Craciunescu, D. y Alonso, C. (1988): Activity of rhodium(III) complexes against *Trypanosoma cruzi*. Arzneimittel Forschung Drug Research, 38 (2): 312-314.
- Ruiz Perez, L.M.; Osuna, A.; Lopez, M.C.; Castany, S.; Gamarro, F.; Craciunescu, D. y Alonso, C. (1987): Mode of action of intercalating drug, cis-Pt(II)(DDH)Cl₂, cis-Pt(II)(DDH) (metafluorobenzolc)₂, and cis-Pt(II)(DDH)(mucubromic)₂, on *Trypanosoma cruzi*. Trop. Med. Parasitol., 38 (1): 45-48.
- Sadigursky, M. y Brodskyn, C.I. (1986): A new liquid medium without blood and serum for culture of hemoflagellates. Am. J. Trop. Med. Hyg., 35 (5): 942-944.
- Salgado, A.A. (1969): Methodology and sensitivity of xenodiagnosis. Bol. Chil. Parasitol., 24 (1): 9-13.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989): Molecular Cloning. A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York. USA.
- Sanchez, G.; Wallace, A.; Olivares, M.; Díaz, N.; Aguilera, X.; Apt, W. y Solari, A. (1990): Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Zymodemes: In Vitro Differentiation of Epimastigotes and Infectivity of Culture Metacyclic Trypomastigotes to Mice. Experimental Parasitology, 71: 125-133.
- Sanderson, C.J.; Thomas, J.A. y Twomey, C.E. (1980): The growth of *Trypanosoma cruzi* in human diploid cells for the production of trypomastigotes. Parasitology, 80: 153-162.
- Santos, D.O. y Oliveira, M.M. (1988): Effect of cAMP on macromolecule synthesis in the pathogenic protozoa *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 83 (3): 287-292.
- Saravia, N.G.; Holguín, A.F.; Cibulskis, R.E. y D'alessandro, A. (1987): Divergent isoenzyme profiles of sylvatic and domiciliary *Trypanosoma cruzi* in the eastern plains, piedmont and highlands of Colombia. Am. J. Trop. Med. Hyg., 36 (1): 59-69.
- Sargeant, P.G.; Jackson, T.F.H.G.; Wiffen, S.R. y Bhojnani, R. (1988): Biological evidence, of genetic exchange in *Entamoeba histolytica*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 82: 862-867.
- Sarti, S.; Silva, J.; Santos, D.; Petto, G.; Ferreira, S.; Rossi, M. y Ribeiro dos Santos. (1984): Controle de transmissão transfusional da doença de Chagas. Avaliação de drogas isoladas de produtos naturais vegetais. En: Abst. Reun. An. Pesquisa Bas. em Doença de Chagas, Caxambú, M.G., Brasil. p 146.
- Sbrabate, C.; Campaner, M.; Camargo, L.E.A.; Conchon, I.; Teixeira, M.M.G. y Plessmann Camargo, E. (1989): Culture and generic identification of trypanosomatids of phytophagous hemiptera in Brazil. J. Protozool., 36: 543-547.
- Scott, V. y Matthews, T.R. (1987): The efficacy of an n-substituted imidazole, RS-49676, against a *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Am. J. Trop. Med. Hyg., 37 (2): 308-313.
- Scharfstein, J.; Abrahamson, M.; de Souza, C.B.; Barral, A. y Silva, I.V. (1995): Antigenicity of cystatin-binding proteins from parasitic protozoan. Detection by a proteinase inhibitor based capture immunoassay (PINC-ELISA). J. Immunol. Methods, 182 (1): 63-72.

- Schaub, G.A. (1991): Rapid isolation of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from feces and urine of the vector. Acta Tropica, **50** (1): 51-58.
- Schaub, G.A. y Boker, C.A. (1986): Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi*: influence of starvation studied by scanning electron microscopy. Acta Tropica, **43**: 349-354.
- Schaub, G.A. (1990): Membrane feeding for infection of the reduviid bug *Triatoma infestans* with *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae) and pathogenic effects of the flagellate. Parasitol. Res., **76** (4): 306-310.
- Schaub, G.A. (1987): *Blastocrithidia triatomae* (Trypanosomatidae): a biological agent against vectors of Chagas' disease?. Zbl. Bakt. Hyg., **265**: 489-556.
- Schaub, G.A. (1988): Direct transmission of *Trypanosoma cruzi* between vectors of Chagas' disease. Acta Tropica, **45**: 11-19.
- Schaub, G.A. (1988): Development of isolated and group-reared first instars of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res., **74** (6): 593-594.
- Schaub, G.A. (1988): Developmental time and mortality of larvae of *Triatoma infestans* infected with *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **82** (1): 94-96.
- Schaub, G.A. (1989): *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. Exp. Parasitol., **68** (3): 260-273.
- Schaub, G.A. (1988): Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in the vector *Triatoma infestans*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz., **83** (1): 563-570.
- Schaub, G.A. y Losch, P. (1988): *Trypanosoma cruzi*: origin of metacyclic trypomastigotes in the urine of the vector *Triatoma infestans*. Exp. Parasitol., **65** (2): 174-186.
- Schaub, G.A. y Boker, C.A. (1987): Colonization of the rectum of *Triatoma infestans* by *Trypanosoma cruzi* studied by scanning electron microscopy: influence of blood uptake by the bug. Parasitol. Res., **73** (5): 417-420.
- Schaub, G.A. y Losch, P. (1989): Parasite/host interrelationships of the trypanosomatids *Trypanosoma cruzi* and *Blastocrithidia triatomae* and the reduviid bug *Triatoma infestans*: influence of starvation of the bug. Ann. Trop. Med. Parasitol., **83** (3): 215-223.
- Schaub, G.A.; Grunfelder, C.G.; Zimmermann, D. y Peters, W. (1989): Binding of lectin-gold conjugates by two *Trypanosoma cruzi* strains in ampullae and rectum of *Triatoma infestans*. Acta Trop. Basel., **46** (5-6): 291-301.
- Schenkman, S.; Andrews, N.W.; Nussenzweig, V. y Robbins, E.S. (1988): *Trypanosoma cruzi* invade a mammalian epithelial cell in a polarized manner. Cell, **55** (1): 157-165.
- Schenkman, S.; Díaz, C. y Nussenzweig, V. (1991): Attachment of *Trypanosoma cruzi* Trypomastigotes to Receptors at Restricted Cell Surface Domains. Exp. Parasitol., **72**: 76-86.
- Schenone, H.; Rojas, A.; Alfaro, E.; Concha, L. y Aranda, R. (1981). Estudio longitudinal de la persistencia de la acción terapéutica del nifurtimox y del benznidazol en pacientes con infección chagásica crónica. Bol. Chile. Parasit., **36**: 59-62.
- Schettino, P.M.; Majumder, S. y Kierszenbaum, F. (1995): Regulatory effect of the level of free Ca²⁺ of the host cell on the capacity of *Trypanosoma cruzi* to invade and multiply intracellularly. J. Parasitol., **81** (4): 597-602.
- Schiff, P.B.; Fant, J. y Horwitz, S.B. (1979): Promotion of microtubule assembly in vitro by taxol. Nature, **277**: 665-667.
- Schiffler, R.J.; Mansur, G.P.; Navin, T.R. y Limpakarnjanarat, K. (1984): Indigenous Chagas' disease (American trypanosomiasis) in California. Journal of American Medicine Association, **251** (22): 2983-2984.
- Schlemper, B.R.Jr. (1978): Estudos experimentais de quimioprofilaxia da transmissao da doença de Chagas por transfusao sanguínea. Tese, UFMG, Rev. Patol. Trop., **7**: 55-111.
- Schlemper, B.R.Jr; Chiari, E. y Brener, Z. (1977): Growth inhibition drug test with *Trypanosoma cruzi* culture forms. J. Protozool., **24**: 544.
- Schmatz, D.M. y Murray, P.K. (1981). *Trypanosoma cruzi*: selective isolation of pure trypomastigotes from cultured muscle cells. J. Parasitol., **67** (4): 517-521.
- Schmatz, D.M. y Murray, P.K. (1982): Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in irradiated muscle cells: improved synchronization and enhanced trypomastigote production. J. Parasitol., **85** (1): 115-125.
- Schmunis, G.A. (1991): *Trypanosoma cruzi*, the etiologic agent of Chagas' disease: status in the blood supply in endemic and nonendemic countries. Transfusion, **31** (6): 547-557.
- Schnur, L.; Bachrach, U.; Bar-Ad, G.; Haran, M.; Tashma, Z.; Talmi, M. y Katzhendler, J. (1983): The effect of diaminoalkyl-anthraquinone derivatives on the growth of the promastigotes of *Leishmania tropica minor*, *L.t. major*, *L. donovani* and *L. aethiops*. Biochemical Pharmacology, **32**: 1729-1732.
- Schuster, F.L. y Mandel, N. (1984): Phenothiazine compounds inhibit in vitro growth of pathogenic free-living amoebae. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, **25**: 109-112.

- Schwarcz de Tarlovsky, M.N.; Gojman, S.G. y Stoppani, A.O. (1988): Growth and DNA synthesis inhibition and superoxide anion formation by iminoquinones in *Trypanosoma cruzi*. Rev. Argent. Microbiol., 20 (4): 183- 193.
- Seah, S. (1970): The effect of suramin on experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice. J. Trop. Med. Hyg. 73 (7): 170-171.
- Seebeck, T. y Gehr, P. (1983): Trypanocidal action of neuroleptic phenothiazines in *Trypanosoma brucei*. Molecular and Biochemical Parasitology, 9: 197-208.
- Segura, M.A.; Molina de Raspi, E. y Basombrio, M.A. (1994): Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanosomicidal treatment. Mem. Inst. Oswaldo cruz. 89 (2): 213-216.
- Seneca, H.; Peer, P. y Hampar, B. (1966): Active immunization of mice with chagastoxin. Nature, 209 (20): 309-310.
- Seneca, H. y Peer, P. (1966): Immuno-biological properties of chagastoxin (lipopolysaccharide). Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg. Organ., 60 (5): 610-620.
- Shadomy, S.; Espinel-Ingroff, A. y Gebhart, R.J. (1985): In vitro studies with SF-86327, a new orally active allylamine derivative. Sabouraudia, 23: 125-132.
- Shames, S.L.; Kimmel, B.E.; Peoples, O.P.; Agabian, N. y Walsh, C.T. (1988): Trypanothione reductase of *Trypanosoma congolense*: gene isolation primary sequence determinatin, and comparison to glutathione reductase. Biochemistry, 27: 5014-19.
- Shapiro, T.A.; Klein, V.A. y Englund, P.T. (1989): Drug-promoted cleavage of kinetoplast DNA minicircles. Evidence for type II topoisomerase activity in trypanosomes mitochondria. J. Biol. Chem., 264: 4173-4178.
- Sher, A. y Snary, D. (1982): Specific inhibition of the morphogenesis of *Trypanosoma cruzi* by a monoclonal antibody. Nature, 300: 639-641.
- Shikanai Yasuda, M.A.; Marcondes, C.B.; Guedes, L.A.; Siqueira, G.S.; Barone, A.A.; Dias, J.C.P.; Neto, V.A.; Tolezano, J.E.; Perse, B.A.; Arruda, E.R.; Lopes, M.H.; Shiroma, M. y Chapadeiro, E. (1991): Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 33: (5): 351-357.
- Shlomai, J. y Zadok, A. (1984): Kinetoplast DNA minicircles of trypanosomatids encode for a protein product. Nucleic Acids Res., 12: 8017-8028.
- Shlomai, J. y Zadok, A. (1983): Reversible decatenation of kinetoplast DNA by a DNA topoisomerase from trypanosomatids. Nucleic Acids Res., 11: 4019-4034.
- Shoemaker, J.P. y Hoffman, R.V.Jr. (1969): Effects of 8-azaguanine on the pathogenesis of experimental Chagas' disease. J. Parasitol., 55 (3): 654-659.
- Shyam, K.; Penketh, P.G.; Divo, A.A.; Loomis, R.H.; Patton, C.L. y Sartorelli, A.C. (1990): Synthesis and evaluation of 1,2,2-tris(sulfonyl)hydrazines as antineoplastic and trypanocidal agents. J. Med. Chem., 33 (8): 2259-2264.
- Sies, H.; Cadenas, E. (1983): Biological basis of detoxication of oxygen free radicals. En: Biological Basis of Detoxication. Ed.: Cladwell, J; Jakoby, WB., Academic Press, Nueva York. p 181-211.
- Silva, L.H.P. y Kirchner, E. (1962): Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection in tissue culture. A comparative study on the action of primaquine sluphate and the aminonucleoside of stylomycin. Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo, 4: 16-28.
- Silva, L.H. y Nussenszweig, V. (1953): Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. Biol., 20: 191-207.
- Silva Filho, F.C. y de Souza, W. (1988): Effect of metronidazole on the cell surface charge of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*. Braz. J. Med. Biol. Res., 21 (5): 1037-1045.
- Simpson, L.; Simpson, A.M.; Kidane, G.; Livingston, L. y Spithill, T.W. (1980): The kinetoplast DNA of the hemoflagellate protozoa. Am. J. Trop. Med. Hyg., 29 (5): 1053-1063.
- Simpson, A.J.G.; Dias Neto, E.; Johnston, D.A.; Kaukas, A. y Rollinson, D. (1993): Recent Molecular Approaches to the Study of Schistosome Genetics. Exp. Parasitol., 77: 376-379.
- Sims, P. y Gutteridge, W.E. (1979): Mode of action of a 5-nitrofurán drug (SQ 18506) against *Trypanosoma cruzi*. Int. J. Parasitol., 9: 61-67.
- Sims, P. y Gutteridge, W.E. (1976): Biochemical effects and mode of action of a 5-nitrouran drug, SQ 18506 on *Trypanosoma cruzi*. En: Biochemistry of Parasites and Host Parasites Relationships. Ed H. Van den Bossche, North-Holland, Amsterdam.
- Slavik, M.; Elias, L.; Mrema, J. y Sifers, J.H. (1982): Laboratory and clinical studies of spirogermanium, a novel heterocyclic anticancer. Drugs. Experimental Clinic Research, 8: 379-385.
- Sneath, P.H.A. y Sokal, R.R. (1973): Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. W.H. Freeman and Company. San Francisco. USA.

- Soares, C.M.; de Carvalho, E.F.; Urményi, T.P.; Carvalho, J.F.; de Castro, F.T. y Rondinelli, E. (1989): Alpha- and beta-tubulin mRNAs of *Trypanosoma cruzi* originate from a single multicistronic transcript. FEBS Lett. **250** (2): 497-502.
- Soares, M.J.; Souto Padron, T.; Bonaldo, M.C.; Goldenberg, S. y de Souza, W. (1989): A stereological study of the differentiation process in *Trypanosoma cruzi*. Parasitol. Res. **75** (7): 522-527.
- Soares, M.C.L.; Celeste, B.J.; De Castilho, E.A.; Meneo, J.R. y Paiva, J.M.P. (1981): 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. **30**: 942-947.
- Soliman, M.A. (1990): Phase-contrast study of the efficacy of Lampit (BAY 2502, Nifurtimox) on experimental infection with *Trypanosoma rhodesiense*. J. Egypt. Soc. Parasitol. **20** (2): 821-826.
- Sousa, O.E. (1988): Relationship between vector species and their vectorial capacity for certain strain of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Argent. Microbiol. **20** (1): 63-70.
- Souza, H.M. (1989): Quimioprofilaxia da doença de Chagas transfusional realidade actual. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. **22** (1): 1-3.
- Souza, H.M.; Kerbauy, J.; Martins, P.R.J. y Novo, N.F. (1986): Quimioprofilaxia da doença de Chagas transfusional. fragilidade osmotica como metodo indireto de determinação da viabilidade eritrocitaria do sangue violetado. Rev. Goiana Med. **32** (3-4): 149-159.
- Souza, S.C.; Takahashi, C.S. y da Silva, J.S. (1991): Evaluation of the mutagenic potential of the antichagasic drug Rochagan in healthy and chagasic rodents. Mutation Res. **259** (2): 139-145.
- Souza, W. de (1989): Components of the cell surface of trypanosomatids. En: Progress in Protistology, Vol. 3. Ed. Patterson y Corliss, Bristol, R.U. p 87-184.
- Souza, H.M. y Puhler, G.M.P. (1989): Quimioprofilaxia da doença de Chagas transfusional. Utilização do ascorbato de sodio e luz na ativação do efeito tripanosomicida da violeta de genciana. En: Resumos do XXV Congr. Soc. Bras. Med. Trop., p 12.
- Spector, T.; Berens, R.L. y Marr, J.J. (1982): Adenylosuccinate synthetase and adenylosuccinate lyase from *Trypanosoma cruzi*. Specificity studies with potential chemotherapeutic agents. Biochem. Pharmacol. **31** (2): 225-229.
- Spencer, H.C.; Allain, D.S.; Sulcer, A.J. y Collins, W.E. (1980). Evaluation of the micro-enzyme linked immunosorbent assay for the antibodies to *Trypanosoma cruzi*. Am. J. Trop. Med. Hyg. **29**: 179-182.
- Sreider, C.M.; Grinblat, L. y Stoppani, A.O. (1990): Catalysis of nitrofurán redox-cycling and superoxide anion production by heart lipamide dehydrogenase. Biochem. Pharmacol. **40** (8): 1849-1857.
- Steck, EA. (1981): The chemotherapy of protozoal infections: whither? man. J. Protozool. **28**: 30-35.
- Steiger, R.F. y Steiger, E. (1976): A defined medium for cultivating *Leishmania donovani* and *L. braziliensis*. J. Parasitol. **62**: 1010-1011.
- Stein, R.J.; Ysot, D. y Petrolianas, F. (1966): Carcinogenic activity of nitrofurans. A histologique evaluation. Fed. Proceed. **25**: 291-295.
- Steindel, M.; Scholz, A.F.; Toma, H.K. y Schlemper, B.R.Jr. (1988): Presence of *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of naturally infected opossum (*Didelphis marsupialis*) in the state of Santa Catarina, Brazil. Mem. Inst. Oswaldo Cruz **83** (1): 135-137.
- Steindel, M. y Pinto, C.J. (1988): *Trypanosoma cruzi* development in the anal glands of experimentally infected *Lutreolina crassicaudata* (Marsupialia, Didelphidae). Mem. Inst. Oswaldo Cruz **83** (3): 397.
- Steindel, M.; Dias Neto, E.; Menezes, C.L.P.; Romanha, A.J. y Simpson, A.J.G. (1993): Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. Mol. Biochem. Parasitol. **60**: 71-80.
- Steindel, M.; Dias Neto, E.; Carvalho Pinto, C.J.; Grisard, E.C.; Menezes, C.L.P.; Murta, S.M.F.; Simpson, A.J.G. y Romanha, A.J. (1994): Randomly Amplified Polimorphic DNA (RAPD) and Isoenzyme Analysis of *Trypanosoma rangeli* Strains. J. Euk. Microbiol. **41** (3): 257-263.
- Steriger, M.L.; Povero, N.M. y Davila, E.V. (1980): Reaccion de inmunofluorescencia indirecta para el diagnostico de la infeccion chagasica. I Conservacion de improntas. Medicina **40**: 1-250.
- Sternberg, J.; Tait, A.; Haley, S.; Wells, J.M.; Le Page, R.W.F.; Schweizer, J. y Jenni, L. (1988): Gene exchange in African trypanosomes: frequency and allelic segregation. Mol. Biochem. Parasitol. **27**: 191-200.
- Stoka, A.M. (1988): Disruption of development on Triatominae bugs by action of juvenile hormone analogues. Rev. Argent. Microbiol. **20**(1): 86-90.
- Stoppani, A.O.M. (1986): Rational approaches to Chagas' disease chemotherapy. Rend. Accad. Naz. Sci. (Italia) **10**: 125-139.
- Strout, G.R., (1962). A method for concentrating hemoflagellates. J. Parasitol. **48** (1): 100

- Strum, N.R.; Degraeve, W.; Morel, C. y Simpson, L. (1988): Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas' disease. Mol. Biochem. Parasitol., **33**: 205-214.
- Sud, I.J.S. y Feingold, D.S. (1981): Mechanism of action of antimycotic imidazoles. J. Invest. Dermatol., **76**: 438-441.
- Sud, I.J.S. y Feingold, D.S. (1985): Effect of ketoconazole in combination with other inhibitors of sterol synthesis on fungal growth. Antimicrob. Agents Chemother., **28**: 532-534.
- Suhadolnik, R.J. (1970): Nucleoside antibiotics. Ed. John Wiley & Sons, Nueva York. 354-389.
- Sullivan, J.J. (1982): Metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* in vitro: a simplified procedure. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **76** (3): 300-303.
- Tabor, C.W. y Tabor, H. (1984): Polyamines. Ann. Rev. Biochem., **53**: 749-90.
- Tachibana, H.; Kurihara, K.; Nagakura, K.; Kaneda, Y. y Montenegro, L.T. (1985): Therapeutic effect of hachimycin in *Trypanosoma cruzi* infected mice. IRCS Med. Sci., **13**: 1108-1109.
- Tafuri, W.L.; Chiari, E. y Raso, P. (1983): Ciclo intracelular do *Trypanosoma cruzi* e sua importancia na patogenese da doenca de Chagas. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **16**: 219-221.
- Tait, A. (1983): Sexual processes in the kinetoplastida. Parasitology, **86** (4): 29-57.
- Tait, A. y Turner, C.M.R. (1990): Genetic exchange in *Trypanosoma brucei*. Parasitology Today, **3**: 70-75.
- Takasu, N.; Masuko, T.; Hojo, H. y Hashimoto, Y. (1989): A microtestplate-immunofluorescence assay for anti-*Trypanosoma cruzi* antibodies. Tohoku J. Exp. Med., **159** (4): 307-312.
- Takeuchi, A.M. y Traub Cseko, Y.M. (1991): Development of nuclear DNA probes for the typing of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **86** (3): 307-315.
- Taliaferro, W.H. y Pizzi, T. (1955): Connective tissues reactions in normal and immunized mice to reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. J. Inf. Dis., **96**: 199-201.
- Tanowitz, H.; Wittner, M.; Sveda, M. y Soeiro, R. (1975): Studies on ribosomal RNA of *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol., **61**: 1065-1069.
- Tanowitz, H.B.; Brennessel, D.J.; Baum, S.G.; Braunstein, V. y Wittner, M. (1987): *Trypanosoma cruzi*: Inhibition by spirogermanium hydrochloride. Experimental Parasitology, **64**: 57-63.
- Tanowitz, H.B.; Morris, S.A.; Weiss, L.M.; Bilezikian, J.P.; Factor, S.M. y Wittner, M. (1989): Effect of verapamil on the development of chronic experimental Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., **41** (6): 643-649.
- Tanus, R.; Lauria-Pires, L.; Lopes, E.R.; Prata, A.; Dias, R.M. (1984): Ação do Allopurinol riboside no tratamento de caes com infecção aguda experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., **17**: 39.
- Tarleton, R.L. y Kuhn, R.E. (1984): Loss of suppressor activity in the serum of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Parasitol., **70** (2): 253-260.
- Tarleton, R.L. (1991): Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. Exp. Parasitol., **73** (1): 106-109.
- Tarleton, R.L. (1990): Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J. Immunol., **144**: 717-724.
- Tarleton, R.L. (1988): *Trypanosoma cruzi* induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. J. Immunol., **140** (8): 2769-2773.
- Taylor, A.E.R. y Baker, J.R. (1987): "In vitro" methods for parasite cultivation. Academic Press Ltd. London NW1 7DX, UK.
- Tchoulamjan, A. (1978): Criterios de curacion en la enfermedad de Chagas-Mazz. Pren. med. Arg., **65**: 334-335.
- Teixeira, A.R.L. (1976): Autoimmune mechanism in Chagas' disease. En: American Trypanosomiasis Research. O.M.S. Publ. Cient. N° 318. Washington: 98-107.
- Teixeira, A.R.L.; Teixeira, G.; Macedo, V. y Prata, A. (1978): *Trypanosoma cruzi* sensitized T-lymphocyte mediated Cr release from human heart cells in Chagas' disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., **27**: 1097-1098.
- Teixeira, M.M.G. y Yoshida, N. (1986): Stage specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. Molecular and Biochemical Parasitology, **18** (3): 271-282.
- Teixeira, A.R.; Cunha Neto, E.; Rizzo, L.V. y Silva, R. (1990): Trypanocidal nitroarene treatment of experimental *Trypanosoma cruzi* infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbits. J. Infect. Dis., **162** (6): 1420.
- Teixeira, A.R.; Silva, R.; Cunha Neto, E.; Santana, J.M. y Rizzo, L.V. (1990): Malignant, non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi*-infected rabbits treated with nitroarenes. J. Comp. Pathol., **103** (1): 37-48.
- Teixeira, A.R.; Cordoba, J.C.; Souto Maior, I. y Solorzano, E. (1990): Chagas' disease: lymphoma growth in rabbits treated

- with Benznidazole. Am. J. Trop. Med. Hyg., **43** (2): 146-158.
- Theis, J.H.; Tibayrenc, M.; Mason, D.T. y Ault, S.K. (1987): Exotic stock of *Trypanosoma cruzi* (Schizotrypanum) capable of development in and transmission by *Triatoma protracta protracta* from California: public health implications. Am. J. Trop. Med. Hyg., **36** (3): 523-528.
- Thertullen, R.; Harth, G. y Haidaris, C.G. (1991): Evidence that the entire length of a kinetoplast DNA minicircle is transcribed in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Microbiol., **5** (1): 207-215.
- Thomas, S.M. y Mac Phee, D.G. (1984): Crystal violet: a direct acting frameshift mutagen whose mutagenicity is enhanced by mammalian metabolism. Mutation Research, **1140**: 165-167.
- Tibayrenc, M. y Le Ray, D. (1984): General classification of the isoenzymic strains of *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* and comparison with *T. (S.) C. marinkellei* and *T. (Herpetosoma) rangeli*. Ann. Soc. Belg. Med. Trop., **64** (3): 239-248.
- Tibayrenc, M.; Breniere, F.; Barnabe, C.; Lemesre, J.L.; Echalar, L. y Desjeux, P. (1985): Isozymic variability of *Trypanosoma cruzi*: biological and epidemiological significance. Ann. Soc. Belg. Med. Trop., **65** (1): 59-61.
- Tibayrenc, M. y Desjeux, P. (1984): The presence in Bolivia of two distinct zymodemes of *Trypanosoma cruzi* circulating sympatrically in a domestic transmission cycle. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **77** (1): 73-75.
- Tibayrenc, M.; Solignac, M.; Cariou, M.L.; Le Ray, D. y Desjeux, P. (1984): Isoenzymatic strains of *Trypanosoma cruzi*: recent or ancient, homogeneous or heterogeneous origin?. C. R. Acad. Sci. III, **299** (7): 195-198.
- Tibayrenc, M.; Echalar, L.; Dujardin, J.P.; Poch, O. y Desjeux, P. (1984): The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in southern Bolivia; new isoenzyme profiles and further arguments against Mendelian sexuality. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **78** (4): 519-525.
- Tibayrenc, M.; Kjellberg, F. y Ayala, F.J. (1990): A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. Proc. Nat. Ac. Sci. USA, **87** (7): 2414-2418.
- Tibayrenc, M. y Ayala, F.J. (1987): *Trypanosoma cruzi* Populations: More Clonal than Sexual. Parasitology Today, **3** (3): 189-190.
- Tibayrenc, M. y Ayala, F.J. (1987): High correlation between isoenzyme classification and kinetoplast DNA variability in *Trypanosoma cruzi*. C. R. Acad. Sci. III, **304** (4): 89-92.
- Tibayrenc, M.; Hoffmann, A.; Poch, O.; Echalar, L.; Le Pont, F.; Lemesre, J.L.; Desjeux, P. y Ayala, F.J. (1986): Additional data on *Trypanosoma cruzi* isozymic strains encountered in Bolivian domestic transmission cycles. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **80** (3): 442-447.
- Tibayrenc, M.; Ward, P.; Moya, A. y Ayala, F.J. (1986): Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., **83** (1): 115-119.
- Tibayrenc, M. (1985): On the microdistribution and sexuality of *Trypanosoma cruzi*. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., **79** (6): 882-883.
- Tobie, E.J. y Rees, C.W. (1948): The cultivation of *Trypanosoma cruzi* in dyasilate medium. J. Parasitol., **34**: 121.
- Toetze, F. y Klotz, I.M. (1952): Inhibition of succinic oxidase systems by some structural analogs of succinic and malonic acids. Arch. Biochem. Biophys., **35**: 335-339.
- Tokiwa, H. y Ohnishi, Y. (1986): Mutagenicity and carcinogenicity of nitroarenes and their sources in the environment. CRC Crit. Rev. Toxicol., **17**: 23-60.
- Toledo, M.J.O.; Pereira, M.E.S. y Brener, Z. (1990): Efects of immunosuppression on the specific treatment of mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, **85** (1): 100.
- Tomlinson, S.; Vanderckhove, F.; Frevert, U. y Nussenzweig, V. (1995): The induction of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote to amastigote transformation by low pH. Parasitology, **110** (5): 547-554.
- Toranzo, E.G.D.; Castro, J.A.; Cazzulo, B.M.F. y Cazzulo, J.J. (1988): Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplasic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. Experientia, **44** (10): 880-881.
- Trager, W. (1978): Cultivation of parasites "in vitro". Am. J. Trop. Med. Hyg., **27**: 216-222.
- Trouet, A.; Jadin, J.M. y Van Hoof, F. (1976): Lysosomotropic chemotherapy in protozoal diseases. In Biochemistry of Parasites and Host-Parasite Relationships (H. Van de Bossche, Ed.) Elsevier/North-Holland Biomedical Press, Amsterdam. p 519-522.
- Tsuhako, M.H.; Alves, M.J.; Colli, W.; Filardi, L.S.; Brener, Z. y Augusto, O. (1991): Comparative studies of nifurtimox uptake and metabolism by drug-resistant and susceptible strains of *Trypanosoma cruzi*. Comp. Biochem. Physiol., **99** (3): 317-321.
- Tsuhako, M.H.; Alves, M.J.; Colli, W.; Brener, Z. y Augusto, O. (1989): Restricted bioreductive metabolism of a nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Biochem.

- Pharmacol., **38** (24): 4491-4496.
- Turrens, J.F. (1986): Inhibitory action of the antitumor agent lonidamine on mitochondrial respiration of *Trypanosoma cruzi* and *T. brucei*. Mol. Biochem. Parasitol., **20** (3): 237-241.
- Tuttle, J.V. y Krenitsky, A.J. (1980): Purine phosphoribosyltransferases from *Leishmania donovani*. J. Biol. Chem., **255**: 909-916.
- Umezawa, H.; Sawa, T.; Fukagawa, Y.; Homma, I., M. y Takeuchi, T. (1967): Studies on formycin and formycin B in cells of Ehrlich carcinoma and *E. coli*. J. Antibiot. (Tokyo), **20**: 308-16.
- Urbina, J.A.; Lazardí, K.; Aguirre, T.; Piras, M.M. y Piras, R. (1991): Antiproliferative effects and mechanism of action of ICI 195.739, a novel bis-triazole derivative, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. Antimicrob. Agents Chem., **35** (4): 730-735.
- Urbina, J.A.; Lazardí, K.; Larralde, G.; Aguirre, T.; Piras, M.M. y Piras, R. (1988): Synergistic effects of ketoconazole and SF-86327 on the proliferation of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Ann. N. Y. Acad. Sci., **544**: 357-538.
- Urbina, J.A.; Lazardí, K.; Aguirre, T.; Piras, M.M. y Piras, R. (1988): Antiproliferative synergism of the allylamine SF 86-327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob. Agents Chem., **32** (8): 1237-1242.
- Urbina, J.A.; Vivas, J.; Ramos, H.; Larralde, G.; Aguilar, Z. y Avilan, L. (1988): Alteration of lipid order profile and permeability of plasma membranes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grown in the presence of ketoconazole. Mol. Biochem. Parasitol., **30** (2): 185-195.
- Urdaneta Morales, S. (1983): Pleomorphism in trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from blood and cell culture. Tropenmed Parasitol., **34** (4): 225-228.
- Urdaneta Morales, S. (1983): *Trypanosoma cruzi*: attenuation of virulence by culture in tissues. Ann. Parasitol. Hum. Comp., **58** (4): 317-324.
- Van Schaftingen, E.; Opperdoes, F.R. y Hers, H.G. (1985): Stimulation of *Trypanosoma brucei* pyruvate kinase by fructose 2,6-bisphosphate. Eur. J. Biochem., **153**: 403-406.
- Van den Bossche, H.; Bellens, D.; Cools, W.; Gorrens, J.; Marichal, H.; Verhoeven, H.; Willemsens, G.; De Coster, D.; Beerens, D.; Haelterman, C.; Coene, M.C.; Lauwers, W. y Le Jeune, L. (1986): Cytochrome P-450: a target for itraconazole. Drug Dev. Res., **8**: 287-298.
- Van Schaftingen, E.; Opperdoes, F.R. y Hers, H. (1987): Effects of various metabolic conditions and of the trivalent arsenical melarsen oxide on the intracellular levels of fructose 2,6-bisphosphate and of glycolytic intermediates in *Trypanosoma brucei*. Eur. J. Biochem., **166**: 653-661.
- Van Voorhis, W.C. (1990): Therapy and prophylaxis of systemic protozoan infections. Drugs, **40** (2): 176-202.
- Van Voorhis, W.C. y Eisen, H. (1989): FI-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. J. Exp. Med., **169** (3): 641-652.
- Veas, F.; Breniere, S.F.; Cuny, G.; Bregues, C.; Solari, A. y Tibayrenc, M. (1991): General procedure to construct highly specific kDNA probes for clones of *Trypanosoma cruzi* for sensitive detection by polymerase chain reaction. Cel. Mol. Biol., **37** (1): 73-84.
- Veas, F.; Cuny, G.; Breniere, S.F. y Tibayrenc, M. (1990): Subspecific kDNA probes for major clones of *Trypanosoma cruzi*. Acta Trop. Basel., **48** (1): 79-82.
- Velasco, J.R.; Adroher, F.J. y Osuna, A. (1989): A Survey of Culture Media of *Trypanosoma cruzi* Amastigote Forms From Infected Vero Cells. Chemosphere., **19**: 1743-1748.
- Velasco, J.R.; Adroher, F.J. y Osuna, A. (1990): *In vitro* survival of amastigote forms of *Trypanosoma cruzi* in media conditioned by Vero cells. Chemosphere., **21** (1-2): 263-268.
- Vergara, U.; Veloso, C.; Gonzalez, A. y Lorca, M. (1992): Evaluation of an enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of Chagas' disease using synthetic peptides. Am. J. Trop. Med. Hyg., **46** (1): 39-43.
- Vickerman, K. (1994): The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. Int. J. Parasitol., **24** (8): 1317-1331.
- Vickerman, K. (1985): Developmental cycles and biology of pathogenic trypanosomes. Br. Med. Bull., **41** (2): 105-114.
- Vickerman, K. y Preston, T.M. (1976): Comparative cell biology of the kinetoplastid flagellates. En: Biology of the Kinetoplastids. Ed. WHR Lumsden; DA. Evans. Vol. I. Academic Press, Londres. p 35-130.
- Vilaseca, G.C.; Cerisola, J.A.; Olarte, J.A. y Zothener, A. (1986): The use of crystal violet in the prevention of the transfusional transmission of Chagas' disease. Vox Sanguinis., **11** (6): 711-716.
- Vitalba, R.; Fornes, G.; Alvarez, M.A.; Roman, J.; Rubio, V.; Fernandez, M.; Garcia, J.M.; Vinals, M. y Torres, A. (1992): Acute Chagas' disease in a recipient of a bone marrow transplant in Spain: case report. Clin. Infect. Dis., **14** (2): 594-595.

- Villalta, F. y Kierszenbaum, F. (1985): The effect of swainsonine on the association of *Trypanosoma cruzi* with host cells. Molecular and Biochemical Parasitology, 16 (1): 1-10.
- Villalta, F. y Kierszenbaum, F. (1983): Role of cell surface mannose residues in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. Biochem. Biophys. Acta, 736 (1): 39-44.
- Villalta, F. y Kierszenbaum, F. (1983): Immunization against a challenge with insect vector, metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* simulating a natural infection. Am. J. Trop. Med. Hyg., 32 (2): 273-276.
- Villalta, F. y Kierszenbaum, F. (1983): Role of polymorphonuclear cells in Chagas' disease. I. Uptake and mechanisms of destruction of intracellular (amastigote) forms of *Trypanosoma cruzi* by human neutrophils. J. Immunol., 131 (3): 1504-1510.
- Villalta, F. y Kierszenbaum, F. (1983): Cross-reactivity of vector-borne metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* with mammalian and culture stages. J. Protozool., 30 (2): 329-331.
- Villalta, F. y Kierszenbaum, F. (1984): Enhanced Multiplication of Intracellular (amastigote) Stages of *Trypanosoma cruzi* In Vitro. J. Protozool., 31 (3): 487-489.
- Villalta, F. y Kierszenbaum, F. (1987): Insect-borne and culture derived metacyclic *Trypanosoma cruzi*: differences in infectivity and virulence. Am. J. Trop. Med. Hyg., 36 (3): 523-528.
- Villalta, F. y Kierszenbaum, F. (1982): Growth of isolated amastigotes of *Trypanosoma cruzi* in cell-free medium. J. Protozool., 29 (4): 570-576.
- Villalta, F. y Kierszenbaum, F. (1987): Insect-borne and culture-derived metacyclic *Trypanosoma cruzi*: differences in infectivity and virulence. Am. J. Trop. Med. Hyg., 36 (3): 529-532.
- Villalta, F. y Kierszenbaum, F. (1987): Role of membrane N-linked oligosaccharides in host cell interaction with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., 22 (2-3): 109-114.
- Villalta, F.V. y León, W. (1979): Effect of Purification by DEAE Cellulose Column on Infectivity of *Trypanosoma cruzi* Blood Forms. J. Parasitol., 66: 188-189.
- Villalta, F.; Pankratz, H.S. y Kierszenbaum, F. (1987): Extracellular killing of *Trypanosoma cruzi* amastigotes by human eosinophils. J. Protozool., 34 (3): 285-290.
- Voller, A.; Draper, C.; Bidwell, D.E. y Bartlett, A. (1975): Microplate enzyme-linked immunosorbent assay for Chagas' disease. Lancet, 1: 426-428.
- Von Brand, T. (1973): Biochemistry of Parasites, 2ª ed. Academic Press. Nueva York.
- Von Kreuter, B.F.; Walton, B.L. y Santos Buch, C.A. (1995): Attenuation of parasite cAMP levels in *T. cruzi* host cell membrane interactions in vitro. J. Eukaryot. Microbiol., 42 (1): 20-26.
- Voogd, C.F.; Vean der Stel, J.J. y Jacobs, J.A. (1975): The mutagenic action of nitroimidazoles. Mutation Res., 31: 149-152.
- Waitumbi, J.N. y Murphy, N.B. (1993): Inter and intra species differentiation of trypanosomes by genomic fingerprinting with arbitrary primers. Mol. Biochem. Parasitol., 58: 181-186.
- Walliker, D.; Quakyl, I.A.; Wellems, T.E.; McCutchan, T.F.; Szarman, A.; London, W.T.; Corcoran, L.M.; Burkot, T.R. y Carter, R. (1987): Genetic analysis of the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. Science, 236: 1661-1666.
- Walliker, D. (1989): Implications of genetic exchange in the study of protozoan infections. Parasitology, 99: 549-558.
- Walton, M.I. y Workman, P. (1987): Nitroimidazole bioreductive metabolism. Quantification and characterization of mouse tissue benznidazole nitroreductases in vivo and in vitro. Biochem. Pharmacol., 36: 887-896.
- Warren, L. (1960): Metabolism of *Schizotrypanum cruzi*. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. J. Parasitol., 46: 529-530.
- Weekly Epidemiological Record (1990): Chagas disease: Frequency and geographical distribution. Organización Mundial de la Salud, Ginebra, Suiza, 65: 257-264.
- Weinbach, E.C.; Costa, J.L. y Wieder, S.C. (1985): Antidepressant drugs suppress growth of the human pathogenic protozoa *Giardia lamblia*. Research Communications in Chemical Pathology and Pharmacology, 47: 145-148.
- Weinbach, E.C.; Costa, J.L.; Nelson, B.D.; Claggett, C. E.; Hundal, T.; Bradley, D. y Morris, S.J. (1986): Effects of tricyclic antidepressant drugs on energy-linked reactions in mitochondria. Biochem. Pharmacol., 35: 1445-1451.
- Welsh, J. y McClelland, M. (1990): Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. Nucleic Acids Research, 18: 7213-7218.
- Western, K.; Schults, M.; Farrar, W. y Kagan, I. (1969): Laboratory acquired Chagas' disease, treated with Bay 2502. Bot. Chile. Parasitol., 24: 94.
- WHO (World Health Organization), (1984): Special Programme for Research and Training in Tropical Disease. Meeting on development of trypanocidal compounds for sterilization of blood. Ginebras, 13-14 Dec., 1984.

- WHO. (1987): Major parasitic infections: a global review. Parasitic Diseases Programme. World Health Organization, Geneva. 40 (2): preceding 98.
- Widdmer, G. (1988): A biological and epidemiological study of enzyme polymorphism in *Trypanosoma cruzi*. En: Index to Theses Nat. Acad. Awards-U.K., 36 (3): 1190.
- Widmer, G.; Dvorak, J.A. y Miles, M.A. (1987): Temperature modulation of growth rates and glucosephosphate isomerase isozyme activity in *Trypanosoma cruzi*. Mol. Biochem. Parasitol., 23: 55-62.
- Wienrauch, L.; Livshin, R. y El-On, J. (1983): Cutaneous leishmaniasis treatment with ketoconazole. Cutis, 32: 288-294.
- Wierenga, R.K.; Swinkels, B.W.; Michels, P.A.M.; Osinga, K.; Misset, O.; Van Beeumen, J.; Gibson, W.C.; Postma, J.P.M.; Borst, P. Opperdoes, F.R. y Hol, W.G. (1987): Common elements on the surface of glycolytic enzymes from *Trypanosoma brucei* may serve as topogenic signals for import into glycosomes. EMBO Journal, 6: 215-221.
- Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalsky, J.A. y Tingey, S.V. (1990): DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucleic Acids Research, 18: 6531-6535.
- Williamson, J.; Macadam, R.F. y Dixon, H. (1975): Drug-induced lesions in trypanosome fine structure: a guide to modes of trypanocidal action. Biochem. Pharmacol., 24: 147-151.
- Winkelmann, E. y Raether, W. (1978): Chemotherapeutically active nitro compounds 5-nitroimidazoles (Part III). Arzneimittel-Forschung/Drug Research, 28: 739-749.
- Winkelmann, E. y Raether, W. (1980): New chemotherapeutically active nitroimidazoles. Proc. 11th ICC and the 19th ICAAC. American Society of Microbiology: 969-970.
- Winkler, M.A.; Brashear, R.J.; Hall, H.J.; Schur, J.D. y Pan, A.A. (1994): Detection of antibodies to *Trypanosoma cruzi* among blood donors in the southwestern United States. Evaluation of a supplemental enzyme immunoassay and radioimmunoprecipitation assay for confirmation of seroactivity. Transfusion, 35 (3): 219-225.
- Winkler, P.; Britto, C.; Pereira, J.B.; Cardoso, M.A.; Oelemann, W. y Morel, C.M. (1994): The use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. Am. J. Trop. Med. Hyg., 51 (6): 771-777.
- Wirth, J.J. y Kierszenbaum, F. (1983): Modulatory effect of guanosine-3':5' cyclic monophosphate on macrophage susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. J. Immunol., 131 (6): 3028-3031.
- Wittner, M.; Squillante, L.; Nadler, J.P. y Tanowitz, H.B. (1982): *Trypanosoma cruzi*: colony formation and clonal growth in agar. Exp. Parasitol., 53 (2): 255-261.
- Wood, D.E. y Pipkin, A.C. (1969): Multiplication and differentiation of *Trypanosoma cruzi* in an insect cell culture system. Exp. Parasitol., 24: 176-183.
- Wood, S.F. (1976): Influencia de la temperatura ambiental como regulador de la zoonosis por *Trypanosoma cruzi* en vectores y hospedadores. Prensa Méd. Argent., 63: 462-472.
- Woody, N.C. y Woody, N.B. (1955): American trypanosomiasis (Chagas' disease). First indigenous case in the United States. J. Am. Med. Assoc., 159: 676-677.
- Workman, P.; Twentyman, P.R.; Lee, F.Y.F. y Walton, M.I. (1983): Drug metabolism and chemosensitization: nitroimidazole as inhibitors. Biochem. Pharmacol., 32: 857-864.
- Wright, C.W.; Kane, S.R.; O'Neill, M.J.; y Phillipson, J.D. (1989): "In vitro" Antiamoebic Activity of Some Plants Used in Traditional Medicine. En Biochemistry and Molecular Biology of "Anaerobic Protozoa". Harwood Academic Publishers. Pag 242-253.
- Wyler, D.J. (1987): Fibronectin in parasitic diseases. Rev. Infect. Dis., 9 (4): 391-399.
- Wysor, M.S.; Zwelling, L.A.; Sanders, A. y Grenan, M.M. (1982): Cure of mice infected with *Trypanosoma rhodesiense* by cis-diamminedichloroplatinum(II) and disulfiram rescue. Science, 217: 454-456.
- Yaeger, R.G. (1988): Long term cryopreservation of the amastigote stages of hemoflagellates. J. Protozool., 35 (1): 114-115.
- Yaeger, R.G. (1959): Chagas' disease in the United States. Rev. Goiana Med., 5: 461-470.
- Yakubu, M.A.; Basso, B. y Kierszenbaum, F. (1992): DL-alpha-difluoromethylarginine inhibits intracellular *Trypanosoma cruzi* multiplication by affecting cell division but not trypomastigote-amastigote transformation. J. Parasitol., 78 (3): 414-419.
- Yakubu, M.A.; Majumder, S. y Kierszenbaum, F. (1994): Changes in *Trypanosoma cruzi* infectivity by treatments that affect calcium ion levels. Mol. Biochem. Parasitol., 66 (1): 119-125.
- Yarlett, N.; Gorrell, T.E.; Marczak, R. y Müller, M. (1985): Reduction of nitroimidazole derivatives by hydrogenosomal extracts of *Trichomonas vaginalis*. Mol. Biochem. Parasitol., 14: 29-40.
- Yawetz, A. y Agosin, M. (1980): Glutathione S-Transferase and drugs metabolism in *Trypanosoma cruzi*: in vitro and

- in vivo formatin of thioethers. Comp. Biochem. Physiol., 66C: 265-267.
- Yoneda, S.; De Souza Carvalho, R.P. y Quiroga, M. (1974): Aspects of pyrimidine biosynthesis of *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 16: 324-327.
- Yoshida, Y. y Aoyama, Y. (1987): Interaction azole antifungal agents with cytochrome P-450 purified from *Saccharomyces cerevisiae* microsomes. Biochem. Pharmacol., 36: 229-235.
- Yoshida, N. (1975): A macromolecule free partially defined medium for *Trypanosoma cruzi*. J. Protozool., 22: 128-130.
- Zaidenberg, A.; Tournier, H.; Schinella, G. y Buschiazzo, H. (1995): *Trypanosoma cruzi*: influence of human plasma on the morphogenesis of blood trypomastigotes in a cell-free culture media. Rev. Latinoam. Microbiol. 37 (1): 71-77.
- Zeledon, R. (1976): "Host-parasite relationship in the vector". Symposium on New Approaches in American Trypanosomiasis Research. Ed. Pan American Health Organization, p. 9-13.
- Zeledon, R.; Bolaños, R. y Rojas M. (1984): Scanning electron microscopy of the final phase of the life cycle of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. Acta Trop. (Basel), 41 (1): 39-43.
- Zeledon, R.; Alvarenga, N.J. y Schosinky, K. (1977): Ecology of *Trypanosoma cruzi* in the insect vector. Pan American Health Organization, Publicación Científica n° 347.
- Zeledon, R. (1974): Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chagas'disease". En Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas'disease. Ciba Foundation Symposium, p. 51-77.
- Zeledon, R.; Dias, J.C.; Brilla Salazar, A.; de Rezende, J.M.; Vargas, L.G. y Urbina, A. (1988): Does a spontaneous cure for Chagas' disease exist?. Rev. Soc. Bras. Med. Trop., 21 (1): 15-20.
- Zeledon, R.; Bolaños, R.; Espejo Navarro, M.R. y Rojas, M. (1988): Morphological evidence by scanning electron microscopy of excretion of metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* in vector's urine. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 83 (3): 361-365.
- Zicker, F.; Smith, P.G.; Luquetti, A.O. y Oliveira, O.S. (1990): Mass screening for *Trypanosoma cruzi* infections using the immunofluorescence, ELISA and haemagglutination tests on serum samples and on blood eluates from filter-paper. Bull. World Health Organ., 68 (4): 465-471.
- Zicker, F.; Martelli, C.M.; de Andrade, A.L. y Almeida e Silva, S. (1990): Trends of *Trypanosoma cruzi* infection based on data from blood bank screening. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, 32 (2): 132-137.
- Ziegler, D.M. (1985): Role of reversible oxidation-reduction in enzyme thiols-disulfides in metabolic regulation. Ann. Rev. Microbiol., 54: 305-329.
- Zilberstein, D. y Dwyer, D.M. (1984): Antidepressant cause lethal disruption of membrane function in the human protozoan parasite Leishmania. Science, 226: 977-979.
- Zingales, B. y Colli, W. (1985): *Trypanosoma cruzi*: interaction with host cells. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 117: 129-152.