

ESTUDIOS SOBRE BARTONELLOSIS

BARTONELLOSIS MURINA III. ACCION DEL EXTRATO TOTAL DE BAZO HOMOLOGO EN LA BARTONELLOSIS MURINA

POR VICTOR M. AYULO R., OLGA DAMMERT T.,
CARLOS BATTISTINI VARGAS Y OSCAR MIRÓ-QUESADA C.

*Departamento de Investigaciones y Sección Bioquímica.
Instituto Nacional de Higiene y Salud Pública.*

(Recibido para su publicación el 20 de Julio de 1948)

Siendo la Bartonellosis una enfermedad infecciosa propia de varias especies animales (*Bartonella bacilliformis*, BARTON 1905 (2); *Bartonella muris*, MAYER 1921 (22) (31) (33); *Bartonella canis*, KIKUTH 1928 (22) (31); *Bartonella tropidorum*, WEISS 1928 (32); *Bartonella opossum* REGEN-DANZ y KIKUTH 1928 (27); *Bartonella sergenti*, ADLER y ELLENBOGEN 1934 (22); (31); *Bartonella tizzeri*, WEINMAN y PINKERTON 1938 (30); etc.) y estendo ampliamente demostrado el alto grado de infección espontánea con *bartonella* en la rata, seleccionamos este animal para el estudio de la bartonellosis murina en sus diferentes aspectos de orden inmunológico.

Ha quedado establecido por los trabajos de MAYER (22) (31), DOMAGK (22) (31), LAUDA (22) (31), FORD y ELLIOT (8) (9), REGEN-DANZ y KIKUTH (27) y MARMORSTON y PERLA (20) (21) (22); que el Bazo juega un rol fundamental en la defensa del organismo de la rata contra la infección con *Bartonella muris*.

A pesar del gran volumen de literatura referente a dilucidar el mecanismo íntimo de la acción protectora del Bazo contra este hemo-parásito, aun no ha sido posible cimentar sobre bases experimentales una explicación adecuada de tan importante fenómeno.

MAYER, BORCHARDT y KIKUTH en 1927 (31), demostraron que la mitad del Bazo, después de la esplenectomía sub-total, confería protección a las ratas adultas contra la bartonelosis murina.

FORD y ELLIOT 1928 (8), obtuvieron resultados negativos en pruebas de protección empleando extracto acuoso salino de Bazo de rata adulta mezclado con sangre de rata bartonellósica.

NOGUCHI, en 1928 (24) encontró que el tejido esplénico fresco inyectado por vía intraperitoneal en rata bartonellósica determina la rápida desaparición de las bartonellas circulantes.

MARMORSTON y PERLA en 1930 (20) señalaron que el injerto autoplástico de Bazo era capaz de proteger al 50 % de sus animales esplenectomizados.

LEVI, en 1931 (31) confirmando los trabajos de Mayer y colaboradores, demostró que una tercera parte de Bazo representa la fracción crítica del órgano en el mecanismo protector antibartonellósico; una mayor parte de este órgano confiere protección contra la bartonelosis murina y que menos de la tercera parte no confiere protección a la rata.

FLAUM y LAUDA en 1931 (22) (31), demostraron la acción protectora del Bazo "por aparente vía humoral", en experimentos de parabiosis realizados en ratas; trabajo confirmado por las investigaciones de KOLPAKOW (31) y CASSOLI (31).

KOH en 1932 (31) demostró la rápida acción antibartonellósica del suero heterólogo normal obtenido de sangre de la vena esplénica. Estos trabajos no han sido aún confirmados.

Por último MARMORSTON y PERLA en 1932 (21) empleando un extracto heterólogo de lipoides esplénicos obtuvieron una protección de 37 % en un grupo de ratas jóvenes, y de 66 % en otro de ratas adultas contra la infección.

Por el contrario, PANDO en 1934 (31), usando los mismos extractos lipoidicos concluye que estos no poseen ningún valor profiláctico o terapéutico en la bartonelosis murina.

Hasta el presente la literatura no registra un estudio sistemático de la terapia por sustitución esplénica en la bartonelosis murina. De

acuerdo con el Profesor Dr. TELÉMACO S. BATTISTINI, se ha planeado una serie de trabajos con el objeto de estudiar el rol que juega el Bazo en el curso de esta infección y su mecanismo de acción, iniciando estas investigaciones con el estudio de la acción terapéutica del extracto total acuoso salino de Bazo (EBAS) de rata.

Por diferentes ensayos preliminares con extractos totales acuosos salinos de Bazos de ratas albinas, (raza INH) (Instituto Nacional de Higiene) se obtuvo la información necesaria para diseñar un experimento final. Para este efecto fueron empleados tan sólo bazos pertenecientes a la misma raza de los animales usados en la prueba terapéutica (bazos homólogos). Por otro lado, con el fin de restringir al máximo el error introducido por el muestreo y variabilidad biológica de la población experimental, se balanceó el experimento empleando un diseño de tipo pareado ortogonal.

MATERIAL Y METODOS

En el presente estudio se emplearon ratas albinas INH, sin distinción de sexos y cuya edad oscilaba entre dos y tres meses, con un promedio de peso corpóreo de 46.36 grms. La población experimental fué mantenida durante todo el tiempo que duraron las observaciones bajo idénticas condiciones de alimentación, (pan con leche enriquecida al 10% con aceite de hígado de bacalao y cebada germinada) y viviendas, (jaulas metálicas con virutas de madera en el fondo), habiéndose repartido de 9 a 11 animales por jaula.

Por esplenectomía de 128 ratas practicada el mismo día se obtuvo 35 grms. de bazos frescos en condiciones asépticas conservándolos a 6°C., después de liberarlos de tejido conjuntivo y adiposo. Los 35 grms. de bazo fueron molidos al día siguiente con arena estéril en mortero refrigerado y el producto extraído con 140 c.c. de suero fisiológico estéril obteniéndose un extracto bruto al 20 %.

Por centrifugación y luego filtración al vacío, se eliminaron las partículas gruesas en suspensión esterilizando luego el extracto por filtración a través de bujía Berckefeld, bajo condiciones constantes de refrigeración. Habiéndose determinado que el peso promedio de bazo de rata albina INH, es de 400 miligramos, se calculó que una dosis ade-

cuada por rata y por día, correspondía a 2 c.c. del extracto total al 20 %, o sea el equivalente a un bazo.

123 ratas esplenectomizadas, fueron controladas por exámenes hematológicos seriados cada 12 horas, con el fin de segregar de la población experimental a los individuos no bartonellósicos. A las 24 horas de la esplenectomía, 58 animales (47.15 %) mostraron *Bartonella muris* en la sangre periférica.

Con el objeto de reducir al mínimo el error del muestreo, se sortearon 30 de las 58 ratas bartonellósicas, las mismas que fueron nuevamente sorteadas con el fin de parearlas en 15 grupos de dos animales

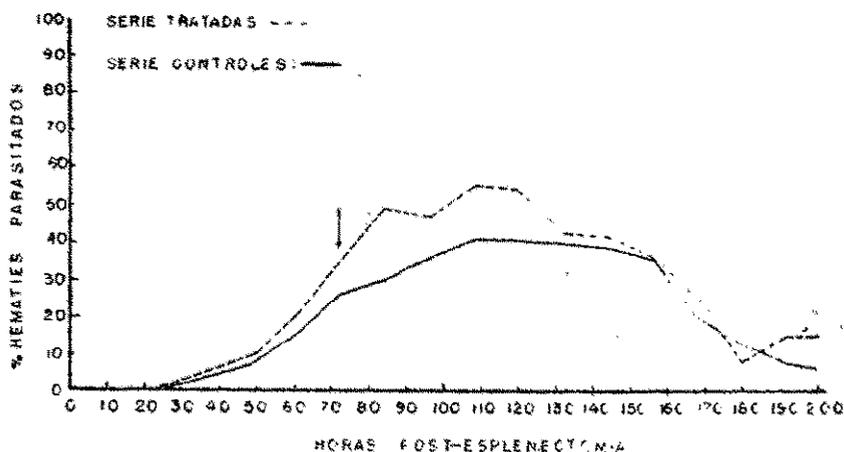


Fig. 1 -- Curva porcentual de comparación entre el parasitismo eritrocitario con *Bartonella muris* en la serie tratada y serie control. La flecha indica el inicio del tratamiento con EBAS de la serie Tratada.

cada uno; "tratado" y "control", reduciéndose así, también al mínimo el error por variabilidad biológica entre estas dos series al adoptar un diseño ortogonal en la población experimental. A las 72 horas, cuando el parasitismo hemático había alcanzado un promedio de 37.26 % de glóbulos rojos parasitados en ambas series, los 15 animales de la serie "tratados", recibieron 2 c.c. de EBAS por vía intraperitoneal; tratamiento que se continuó cada 24 horas por espacio de 6 días, no recibiendo ningún tratamiento la serie control. Los individuos de cada par, (tratado y control) en los 15 grupos experimentales fueron estudiados hematológicamente cada 12 horas por medio de frótises de sangre colo-

reados con Wright. El porcentaje de infección globular con *Bartonella muris* se determinó sobre un recuento de 1,000 glóbulos rojos pro frotis. Del mismo modo, el porcentaje de mortalidad en las dos series fué controlado cada 12 horas.

RESULTADOS

El extracto de bazo acuoso salino en la forma que ha sido utilizado no modificó el curso normal de la bartonelosis murina, tanto en lo

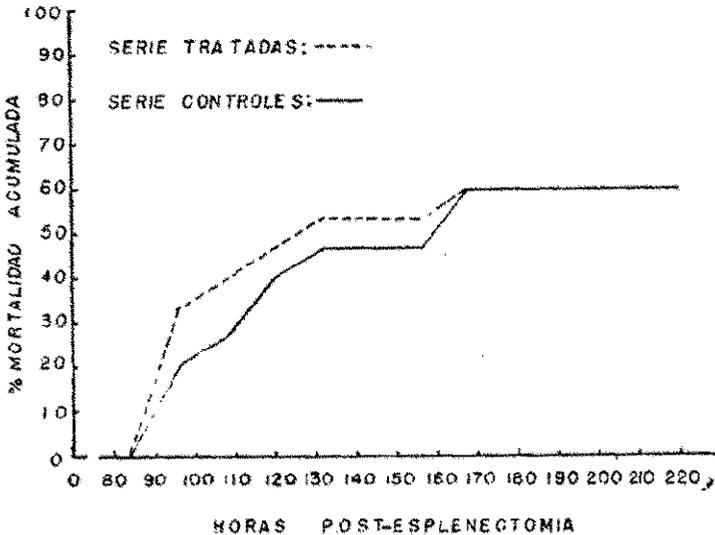


Fig. 2. — Curva porcentual acumulada de comparación entre la mortalidad en la serie tratada y serie control.

que se refiere a la infección porcentual de glóbulos, cuanto a la mortalidad de los animales en experiencia.

El porcentaje de glóbulos rojos parasitados no sufrió ninguna alteración en el sentido de disminución, o por lo menos de una detención, sino que siguió su curva ascensional en forma paralela a la del grupo control. La gráfica de la Fig. N° 1, demuestra en forma clara que el extracto salino de bazo no ejerce ninguna acción sobre el parasitismo globular.

La mortalidad en el grupo de los "tratados" como en el de los "controles", se inició a las 96 horas o sea 24 hrs. después de iniciado el tratamiento, la que continuó en el curso del mismo hasta las 168 horas.

La mortalidad en la serie de los "tratados" no sufrió ninguna alteración en el sentido de una disminución en el número de muertes, sino que siguió su curso normal, comparada con la de los "controles".

En la gráfica de la Fig. N° 2, se puede apreciar que la curva de mortalidad, tanto en el grupo de los "tratados" como en el grupo "control", es paralela. La hemoglobinuria que presentaban muchas de las ratas al iniciarse el tratamiento no sufrió modificación alguna en el curso del mismo, persistiendo en muchos casos hasta la muerte del animal, mientras en otros, la hemoglobinuria se presentó en el curso del tratamiento. En resumen, las dos series experimentales (tratada y control) se han comportado de idéntica manera durante el curso del experimento.

DISCUSION

Estando ampliamente demostrado que la extirpación del bazo en la rata determina un cuadro espontáneo de infección con *B. muris*, gran número de investigadores se han dedicado a determinar el rol que juega este órgano en la aparición de dicho proceso infeccioso. A este respecto coincidimos con el pensamiento de WEINMAN (31), quien refiriéndose a gran número de trabajos experimentales para dilucidar el mecanismo regulador del control que ejerce el bazo sobre la infección latente con *B. muris* dice: "debemos admitir que a pesar de la abundancia de datos experimentales, una explicación clara e inequívoca no puede aún ofrecerse". Se puede considerar la existencia de dos tendencias bien definidas que tratan de explicar el mecanismo íntimo de la acción antibartonellósica del bazo en la rata: una, que atribuye la acción del bazo a un mecanismo de orden coloido-péxico propio de la estructura retículo-endotelial de este órgano, como sugieren los trabajos de PERLA, y MARMORSTON (20), MAYER y COL. (19), VEDDER (29), MENDES FERREIRA, HIGGINS (23), DINGER (5), ROSENTHAL y ZOHMAN (28); otra, que sostiene que dicha acción se realiza por medio de una secreción específica del bazo, la que actuaría por vía humoral controlando la virulencia de la *B. muris* en el organismo del huésped; como se desprende de los trabajos de MARMORSTON y PERLA (21) (22), REGENDANZ y KIKUTH (27), LAUDA y FLAUM (7) (16), KNUTI y HAWKINS (11), KOLPACKOW (14), CASSOLI (4), NOGUCHI (24), y KOH (12), (13).

NOGUCHI (24) considera que "la inyección intraperitoneal de una suspensión salina de tejido esplénico en ratas o ratones esplenectomizados es causante de la rápida desaparición de la *Bartonella muris* de la sangre" y el mismo investigador agrega: "Por lo tanto, la *B. muris* es extremadamente sensible a la sustancia esplénica, aun cuando el mismo bazo no se halla presente" Pero este investigador no señala la fecha de iniciación del tratamiento después de la esplenectomía.

Los múltiples resultados contradictorios registrados en la literatura con referencia a este interesante problema inmunológico se deben según se ha podido apreciar en el presente trabajo, a la falta de información adecuada sobre el curso normal de la bartonelosis murina; ya que la fecha en que se inicia el tratamiento a partir de la esplenectomía, es de importancia tal, que puede decirse, condiciona el resultado del experimento.

Si se inicia el tratamiento experimental a partir del quinto día de la esplenectomía, ya sea con extracto de bazo acuoso salino, como en el presente trabajo, o con cualquier otro producto que desee ensayarse como agente antibartonellósico, el resultado obtenido de dicha experiencia carecería de valor, puesto que según observaciones realizadas durante el curso de este trabajo y por los datos proporcionados por un estudio sistemático del curso normal de la bartonelosis murina, llevado a cabo en el Departamento de Investigaciones de este Instituto (34), se ha observado, que a partir de esta fecha (quinto día de infección bartonellósica post-esplenectomía) la curva de la mortalidad y parasitismo se detiene en su violento ascenso inicial. (Figs. 1 y 2).

En consecuencia se atribuiría valor terapéutico a un producto que no lo tiene, ya que la mayor parte de los animales post-esplenectomizados que han presentado infección bartonellósica espontánea y pasan del quinto día, sobreviven sin ningún tratamiento.

Corroboro lo arriba expuesto uno de los experimentos piloto con 10 animales llevado a cabo en este laboratorio, en el que el tratamiento con EBAS se inició a partir del quinto día de enfermedad, obteniéndose el cien por ciento de curación; índice de sobrevivencia que se hubiera obtenido en dicho lote de ratas bartonellósicas sin necesidad de tratamiento alguno. El cúmulo de observaciones experimentales, materia de esta comunicación (índices de parasitismo globular y mortalidad) obtenido en las dos series (tratados y controles), sometido al análisis matemáti-

co estadístico demuestran que ambas series son homogéneas y presentan ortogonalidad gráfica aceptable (Fig. 3). El significado estadístico entre las dos series ha sido calculado siguiendo la técnica del Análisis de Varianza para experimentos balanceados. (3)

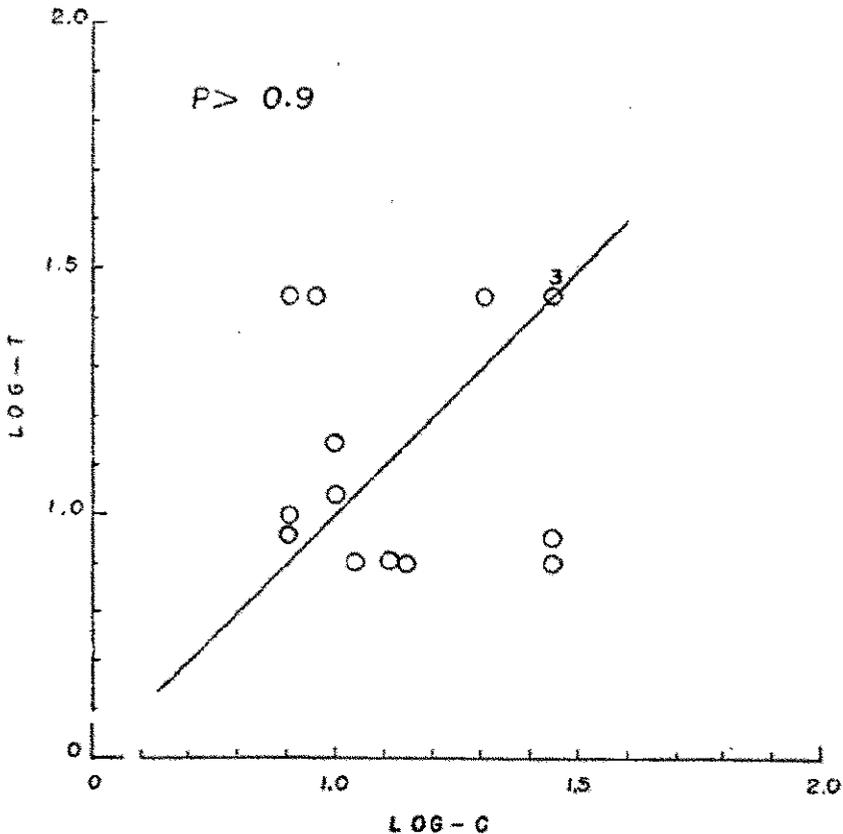


Fig. 3. — Curva que demuestra la homogeneidad y ortogonalidad gráfica entre la serie tratada y la serie control.

El cálculo de la constante de Student "t" para determinar el grado de significado estadístico entre las dos series (T y C), dió un punto de probabilidad "P" mayor que 0.9; corroborándose así, matemáticamente, la falta absoluta de significado obtenido por observación experimental directa.

SUMARIO Y CONCLUSIONES

Con el fin de dilucidar los múltiples y contradictorios resultados que registra la literatura sobre la acción protectora del bazo en la infección con *Bartonella muris*, se han planeado una serie de trabajos, iniciándose éstos con el estudio de la acción terapéutica del Extracto Total Acuoso Salino de Bazo de Rata (EBAS); habiéndose llegado a las siguientes conclusiones:

1º — El Extracto de Bazo Acuoso Salino total (EBAS) (Bazo homólogo) de rata no modifica el curso de la bartonelosis murina, tanto en lo que se refiere a la infección porcentual de glóbulos cuanto a la mortalidad y otras manifestaciones, como la hemoglobinuria, de los animales experimentales.

2º — La fecha en que se inicia el tratamiento a partir de la esplenectomía es de tal importancia, que, puede decirse, condiciona el resultado de las experiencias.

3º — El análisis matemático estadístico de los experimentos realizados demuestra concluyentemente que el Extracto de Bazo Acuoso Salino total (homólogo) de rata no ejerce ninguna acción antibartone-llosica para la rata albina INH.

SUMMARY AND CONCLUSIONS

With the aim of clarifying the multiple and contradictory results that appear in the literature on the spleen protective action in *Bartonella muris* infections a series of experiments has been planned beginning with the study of the therapeutic action of total rat Spleen Saline Extract (EBAS), arriving at the following conclusions:

1. — The Homologous rat Spleen Saline Total Extract (EBAS) does not modify the normal course of murine bartonellosis as far as the percentage of infected red blood cells, mortality and other symptoms, such as haemoglobinuria, of the experimental animals is concerned.

2. — The date after splenectomy in which the treatment begins is of such paramount importance that it may be said it underlies the result of such experiments.

3. — The statistical analysis of the experimental data shows beyond doubt that the Total Homologous Rat Spleen Saline Extract has no antibartonella action for the albino rat of the INH strain.

BIBLIOGRAFÍA

1. ADLER, S. & ELLENBOGEN, V.: *J. Comp. Path. Therap*, 47: 219, 1934.
2. BARTON, ALBERTO L.: *Gaceta de los Hospitales*, 2: No. 46, 1905.
3. BLISS, C. I.: *Curso de Bioestadística y Ensayos Biológicos*, Dpto. de Farmacología, Yale School of Medicine, 1945.
4. CASSOLI, C.: *Arch. Inst. Bioch. Ital.*, 4: 297, 1932.
5. DINGER, J. E.: *Nederl. Tijdschr. v. geneesk.*, 73: 1910, 1929.
6. DOMAGK G.: *Virchows Arch. f. Path. Anat.*, 249: 83, 1924.
7. FLAUM, E. & LAUDA E.: *Ztschr. f. d. ges. exper. Med.*, 77: 410, 1931.
8. FORD, W. W. & ELLIOT, C. P.: *Jour. Exper. Med.*: 48: 475, 1928.
9. " " " " " " : *Am. J. Hyg.* 12: 669, 1930.
10. KIKUTH, W.: *Klin. Wochenschr.*, 7: 1729, 1928.
11. KNUTH, R. E. & HAWKINS, W. B.: *J. Exper. Med.*, 61: 115, 1935.
12. KOH, M.: *J. Chosen M. A.*, 22: 37, 1932.
13. " " : *Keijo J. Med.*, 3: 546, 1932.
14. KOLPAKOW I. V.: *Arch. f. Schiffs u. Tropen-Hyg.*, 34: 612, 1930.
15. LAUDA, E.: *Virchows Arch. f. Path. Anat.*, 258: 529, 1925.
16. LAUDA, E. & E. FLAUM.: *Ztschr. f. d. ges. Exp. Med.*, 73: 293, 1930.
17. LEVÍ, M.: *Haematológica*, 12: 1, 1931.
18. MAYER, M.: *Arch. f. Schiffs u. Tropen-Hyg.*, 25: 150, 1921.
19. MAYER, M. BORCHARDT, W. & KIKUTH, W.: *Arch. f. Schiffs u. Tropen-Hyg.*, 31: 295, 1927.
20. MARMORSTON-GOTTESMANN, J. & PERLA, D.: *J. Exper., Med.*, 52: 131, 930.
21. " " " " " " *J. Exper. Med.*, 56: 777, 1932.
22. MARMORSTON-GOTTESMANN, J. & PERLA, D.: *Natural Resistance and Clinical Medicine*. Little, Brown & Co, Boston 1941.
23. MENDEZ FERREIRA, A. E. & HIGGINS, G. M.: *Proc. Staff Meet., Mayo Clinic.*, 11: 666, 1936.
24. NOGUCHI, H.: *J. Exper Med.*, 47: 235, 1928.
25. PANDO, G.: *Ztschr. f. Immunitaetsforsch. u. Exp. Therap.*, 82: 63, 1934.
26. PERLA, D. & MARMORSTON-GOTTESMANN J.: *J. Exper. Med.*, 52: 131, 1930.

27. REGENDANZ, P. & KIKUTH W.: *Arch. f. Schiffs u. Tropen-Hyg.* 32: 587 1928.
28. ROSENTHAL, I. & ZOHMAN, B. L.: *Arch. Path.*, 12: 405, 1931.
29. VEDDER, A.: *Nederl. Tijdschr. v. geneesk.*, 77:441, 1928.
30. WEINMAN, D. & PINKERTON, H.: *Ann. Trop. Med. & Parasit* , 32: 215, 1938.
31. WEINMAN, D.: *Infectious Anemias due to Bartonella and Related Red Cell Parasites. Reimpreso de Trans. Am. Phil. Soc , New Series, Vol. XXX III, Parte III, Segunda Edición, Philadelphia. Lancaster Press Inc., Pennsylvania, 1944.*
32. WEISS, PEDRO: *Anales de la Facultad de Medicina de Lima.* 10: Nos. 4, 5 y 6, 1928.
33. MAYER, M. BORCHARDT, W. & KIKUTH W.: *Klin. Wochenschr.*, 5: No. 13 Sonderdruck, 1926.
34. AYULO, R. VICTOR M.: (comunicación personal).