

## ESTUDIOS SOBRE BARTONELLOSIS

### BARTONELLOSIS MURINA. IV. ACCION DE LIPIDOS ESPLÉNICOS HETEROLOGOS ALCOHOL - ÉTER SOLUBLES SOBRE LA BARTONELLOSIS MURINA

POR CARLOS BATTISTINI V., OLGA DAMMERT, T.

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 diciembre de 1948.

Continuando el estudio sistemático del rol que juega el Bazo en los mecanismos defensivos contra la infección con *Bartonella muris* y de acuerdo con el plan de trabajo delineado con el Profesor Telémaco S. Battistini, se ha investigado el rol que pueda ejercer la fracción de Lípidos esplénicos heterólogos alcohol-éter solubles de Bazo de res sobre el curso de la Bartonellosis murina.

#### MATERIAL Y METODOS

*Obtención de Lípidos Esplénicos Heterólogos Alcohol - Éter solubles.*  
Esta fracción esplénica, que en adelante será denominada "LEH" (Lípidos Esplénicos Heterólogos), fué obtenida empleando la técnica de fraccionamiento de Hartman descrita por Perla y Marmorston-Gottesman (4), con algunas modificaciones. El extracto o fracción fué preparado según la siguiente técnica:

1.—500 gramos de pulpa de bazo fresco de res fueron extractados con 3,060 cc. de éter etílico químicamente puro, divididos en siete porciones: 2 de 780 cc., 3 de 400 cc., 1 de 200 cc. y otra de 100 cc. Las extracciones se hicieron por agitación mecánica horizontal (Agitador de Kahn) a la temperatura del laboratorio en recipientes de vidrio de baja transmisión actínica y en atmósfera saturada de  $\text{CO}_2$ , a fin de evitar la formación de peróxidos en los Lípidos extractados.

2.—El total de las extracciones etereas fué concentrado a  $15^\circ\text{C}$ . y 80 mm. Hg. de presión en desecador de vidrio de baja transmisión actínica hasta evaporación total del solvente extractor, obteniéndose 13 gm. de Lípidos esplénicos totales éter solubles; o sea, el 2.6 % del peso de bazo fresco original.

3.—Los Lípidos así obtenidos fueron extractados con siete porciones de 50 cc. de alcohol etílico de 95% a  $60^\circ\text{C}$ . en el Baño María. La fracción lipídica alcohol insoluble fué descartada.

4.—Los extractos alcohólicos obtenidos se refriugaron a  $-10^\circ\text{C}$ . en una mezcla de hielo- $\text{CaCl}_2$  obteniéndose la precipitación de los lípidos insolubles en alcohol frío. El precipitado se descartó por centrifugación a 3,000 r.p.m. Esta operación se realizó en forma exhaustiva hasta que no apareciera más precipitado por refrigeración.

5.—El extracto alcohólico se conservó luego a  $5^\circ\text{C}$ . durante 5 días en la nevera, precipitando así una nueva fracción lipídica en forma de cristales exagonales planos, los que se separaron por centrifugación en frío.

6.—El extracto alcohólico, libre de lípidos insolubles en frío, fué concentrado luego a  $45^\circ\text{C}$ . y 41 mm. Hg. en recipiente de vidrio de baja transmisión actínica, hasta evaporación completa del solvente.

7.—El residuo lipídico del extracto alcohólico fué disuelto en 70 cc. de éter etílico q. p. y sometido a una refrigeración con mezcla de hielo- $\text{NaCl}$  en la nevera. Bajo estas condiciones precipitó un lípido blanco flocculoso el que se descartó por refrigeración. Dicha operación fué repetida hasta obtenerse tan sólo una cantidad despreciable de precipitado.

8.—La solución eterea de la fracción de lípidos esplénicos así aislados, fué evaporada a sequedad a la temperatura ambiente y 38 mm. Hg. sobre  $\text{NaOH}$ , obteniéndose 4.4 grms. de fracción lipídica esplénica alcohol-éter soluble, o sea un rendimiento ponderal de 0.88 % con relación al peso de bazo fresco original.

9.—Los 4.4 grms. de LEH fueron suspendidos en Suero Fisiológico estéril por agitación mecánica con perlas de vidrio, hasta obtenerse una suspensión al 6.28 %, o sea una concentración de 0.0628 gm. por cc. y un volumen final de 70 cc. de suspensión.

*Ensayo Biológico de la Fracción de LEH.* — Con el fin de investigar el posible valor terapéutico de la fracción de Lípidos esplénicos heterólogos alcohol-éter solubles en la Bartonellosis murina, se empleó un diseño experimental de tipo Pareado Ortogonal igual al descrito en anterior oportunidad (1).

16 ratas albinas INH sin distinción de sexos con un peso promedio de 46.36 grms. y cuya edad oscilaba entre 2 y 3 meses, fueron usadas como población experimental, pareándolas en 8 grupos de 2 individuos cada uno: Tratado y Control. Los animales de ambas Series fueron mantenidos en idénticas condiciones de alimentación y vivienda durante el tiempo que duró el experimento.

Todos los animales fueron inyectados por vía intra-peritoneal con 0.5 cc. de sangre citratada de rata bartonellósica 28 días antes de ser esplenectomizados. El 100 % de las ratas esplenéctomizadas, bajo estas condiciones, mostraron Bartonella muris en la sangre circulante 24 horas después de la operación. El índice de parasitismo bartonellósico fué determinado hematológicamente por medio de frotises de sangre coloreados con Wright, cada 12 horas, contándose 1,000 glóbulos rojos por lámina.

El individuo "tratado" de cada par recibió 1 cc. de suspensión de LEH al 6.28 % por vía intraperitoneal cada 24 horas durante 7 días consecutivos, por considerar dicha dosis lo bastante concentrada en relación con la posible cantidad de lípidos en el bazo homólogo. La serie "controles" no recibió ningún tratamiento.

Cuando el parasitismo globular de ambas Series alcanzó un índice promedio del 18.54% de hematíes parasitados a las 72 horas de la esplenectomía, se inició la administración de LEH en la dosis y forma descrita.

#### RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado del experimento materia de la presente comunicación se halla condensado en la Fig. 1, la que presenta en forma gráfica la curva porcentual de parasitismo globular en ambas series. Dicha curva parece indicar a primera vista una diferencia bastante apreciable, en función del

tiempo, entre la serie "Tratadas" y la serie "Controles", sugiriendo una posible acción terapéutica, de escasa potencia, de la fracción de LEH. Sin embargo, el análisis matemático estadístico de los datos experimentales, siguiendo la técnica del Análisis de Variante según Bliss (2), arroja un punto de Probabilidad "P" entre 0.9 y 0.8 para la comparación entre las dos series. Es decir, que la aparente diferencia gráfica entre el parasitismo globular de las ratas tratadas y las controles, carece en absoluto de significado estadístico. Además, la justificación de la aplicación del método matemático al análisis de los datos experimentales se desprende claramente de la gráfica de la Fig. 2, en que puede observarse ortogonalidad gráfica aceptable entre las dos series.

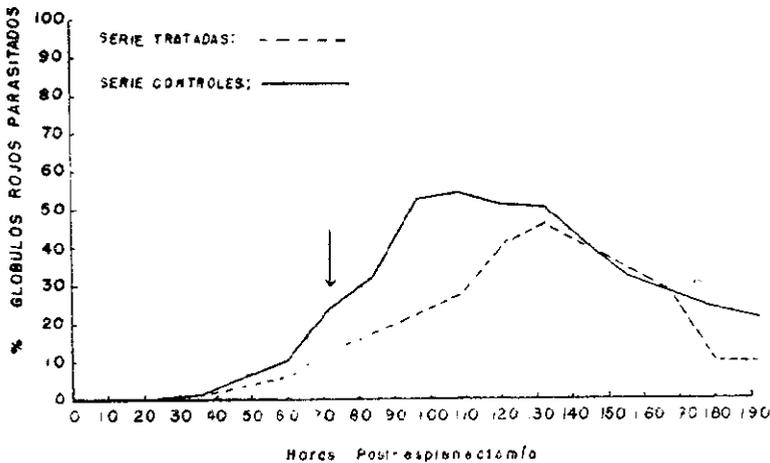


Fig. 1 — Representación gráfica comparativa de la curva porcentual de parasitismo globular de la Serie "tratadas" y Serie "controles". La flecha indica el momento en que se inició la aplicación de la fracción LEH a la Serie "Tratadas".

Desde el punto de vista técnico, las observaciones realizadas durante el presente trabajo, investigaciones anteriores y ensayos preliminares sugieren la estandarización de un ensayo biológico de actividad antibartonellosica empleando, tan sólo, la variación del índice del parasitismo globular de la población experimental durante los cinco primeros días de la infección como dato absoluto y constante de acción específica del producto ensayado, ya que dicho índice constituye una variable dependiente en función directa de la infección con *Bartonella muris*. Otras medidas experimentales de acción terapéutica, tales como la curva de mortali-

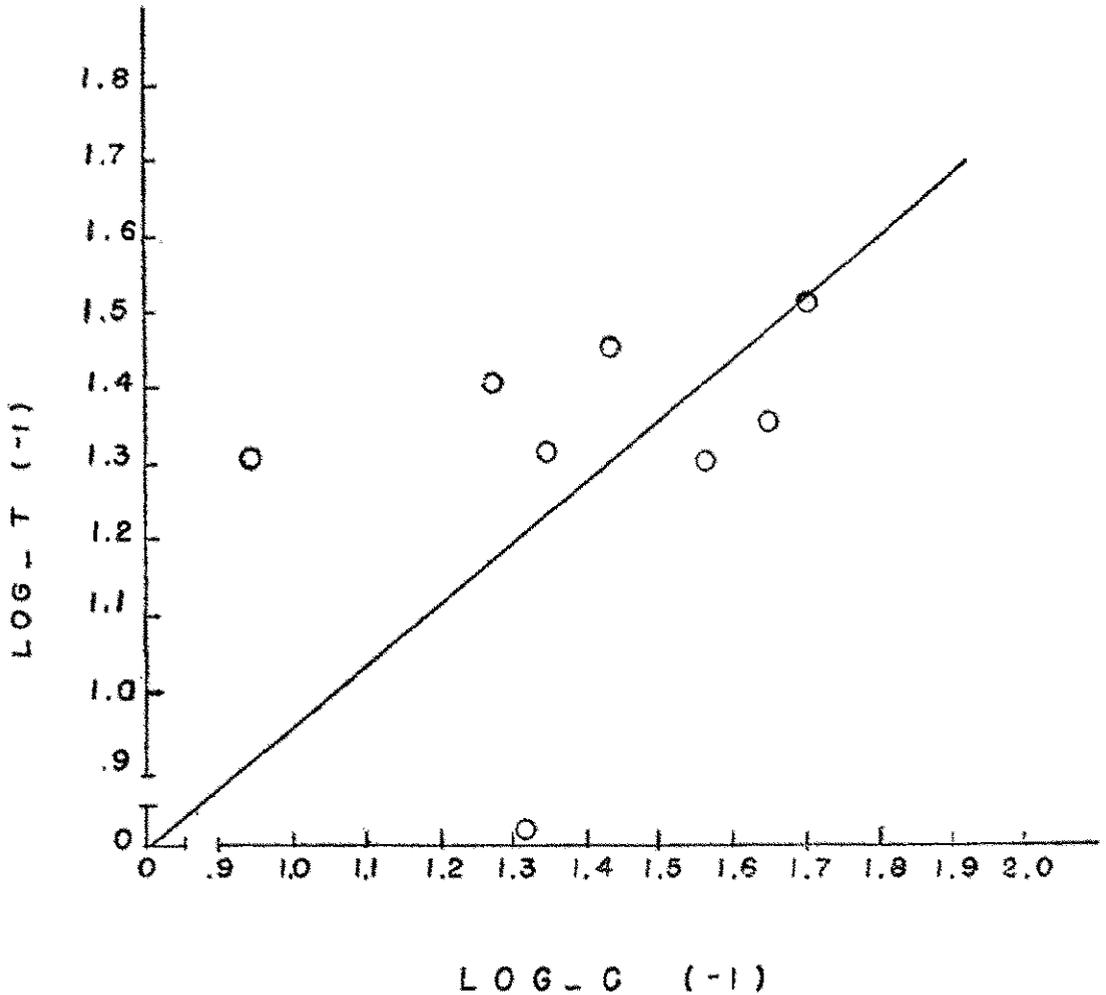
$P = 0.9 - 0.8$ 

Fig. 2 -- Representación gráfica de la ortogonalidad estadística entre ambas series tratadas y controles. La derivación logarítmica de los datos originales se ha empleado en los cálculos.

dad en la población experimental, índice hemoglobínico, anemia, etc., carecen de constancia y no pueden ser considerados como valores absolutos, puesto que la aparición de dichas manifestaciones patológicas constituyen variables dependientes, de funciones múltiples en relación con factores biológicos.

Por otro lado, se ha podido determinar que el diseño experimental que ofrece mayor garantía en la segregación de variabilidad biológica y error de muestreo, en este tipo particular de ensayo biológico, es el diseño Pareado Ortogonal según Bliss (2), el cual permite realizar el ensayo biológico con un mínimo de 12 individuos experimentales pertenecientes a una población homogénea.

Es interesante hacer notar el hecho que los lípidos esplénicos heterólogos preparados prácticamente en la misma forma por Perla y Marmors-ton en 1932, dieron un alto grado de protección antibartonellosica en ratas jóvenes (37 %) siendo dicha protección de 66 % en ratas adultas según dichos autores (4).

Sin embargo, en 1941 los mismos investigadores atribuyen a los extractos de lípidos esplénicos heterólogos mucho menor potencia protectora antibartonellosica, debido — "a la exacerbación de la virulencia del organismo etiológico obtenida por selección genética de la raza de ratas portadoras utilizadas en la prueba" (5).

El estudio realizado en el presente trabajo bajo condiciones de control de las variables experimentales por medio de un diseño estadístico adecuado, demuestra concluyentemente, en contraste con los autores antes mencionados, que los lípidos esplénicos heterólogos alcohol-éter solubles carecen en absoluto de propiedades antibartonellosicas para la rata albina INH. En este sentido, los resultados expuestos confirman ampliamente el trabajo de Pando (3).

#### RESUMEN Y CONCLUSIONES

1º — Se describe una técnica para el fraccionamiento y aislamiento de Lípidos Esplénicos Alcohol-Éter solubles de bazo fresco de res.

2º — El resultado del ensayo biológico de dichos lípidos esplénicos heterólogos (LEH) demuestra que carecen totalmente de valor terapéutico contra al *Bartonella muris* IN VIVO.

3º — Se sugieren las pautas experimentales para la estandarización de un ensayo biológico de actividad antibartonellosica en la rata albina.

## SUMMARY AND CONCLUSIONS

1° — A fractionation technique is described for the isolation of alcohol-ether soluble Lipids of the fresh cattle spleen.

2° — The bioassay of such Heterologous Spleen Lipids (LEH) shows their complete lack of therapeutic value against *Bartonella muris* IN VIVO.

3° — An experimental set up is suggested in order to standardize a Bioassay for antibartonella action in the albino rat.

## BIBLIOGRAFIA

1. AYULO R., VICTOR M., DAMMERT T., OLGA, BATTISTINI V., CARLOS, Y MIRÓ-QUESADA C., OSCAR.: *Rev. Med. Exper. (Lima)*, 7, 44, 1948.
2. BLISS, C. I.: *Curso de Bioestadística y Ensayos Biológicos*, Dpto. de Farmacología, Yale School of Medicine, 1945.
3. PANDO, G.: *Ztschr. f. Immunitätsforsch. u. exper. Therap.*, 82: 63, 1934.
4. PERLA, D. Y MARMORSTON-GOTTESMAN, J.: *J. Exper. Med.*, 56: 777, 1932.
5. PERLA, D. Y MARMORSTON, J.: *Natural Resistance and Clinical Medicine*. Little, Brown & Co., Boston, 1941.