

CONTRIBUCIONES ORIGINALES

CONTRIBUCION AL ESTUDIO QUIMIO-TERAPI- CÔ DE LA TRIPANOSOMIASIS

Por el Dr. Alberto Abondano Herrera.

Miembro de la Sociedad Internacional de Microbiología. Actual Profesor de la Escuela Nacional de Medicina Veterinaria.

Son muchos los trabajos publicados hasta hoy en relación con la quimio-terapia de la tripanosomiasis, sin que hasta el momento se haya llegado a una conclusión plenament satisfactoria. Las pruebas realizadas para curar la tripanosomiasis con una forma de vacuna autógena no han dado resultado alguno.

Bien conocidos son los graves inconvenientes debidos a las formas recidivantes, inconvenientes éstos que nos hacen pensar solamente en la búsqueda de una curación por medio de la quimio-terapia. Sería, efectivamente, el ideal en estas materias hallar un medicamento que diera resultados fijos con todas las especies de tripanosomas pues bien estudiadas han sido las diversas afinidades de los medicamentos, afinidades que los hacen variables e inconstantes.

Algunos medicamentos obran como semi-esterilizadores del organismo, haciéndolo portador latente del tripanosoma, el que, después de un examen negativo de la sangre, se hace nuevamente presente en ésta debido a causas diferentes que disminuyen el grado de resistencia orgánica. Otros, en cambio, no tienen un valor terapéutico seguro para los diversos tipos recidivantes del tripanosoma.

El estudio de la infección experimental ha demostrado cómo en ciertos periodos, seguidos de tratamientos diversos (tripanosoma Lewisi) el tripanosoma desaparece completamente de la sangre circulante, para nidar en algunos tejidos especialmente en el esplénico, y simultáneamente, da origen a la aparición de anticuerpos en la sangre (citolisinas y atrepsinas). Al cesar este período o crisis tripanolítica, que es muy relativa, aparecen de nuevo en la sangre los tripanosomas, sufriendo de esta manera el organismo una nueva invasión.

| No. del ratón | Peso Gms. | Sexo | Fecha inoculación | OBSERVACIONES | | | | | No. Trip. por mm ³ | Tratamiento | Cantidad | Producto | Título de la Solución | Observaciones | | | | | | | | | | | | |
|---------------|-----------|------|-------------------|---------------|----|----|----|----|-------------------------------|-------------|--------------------|----------|-----------------------|---------------|--------|----|---|---|--|--|--|--|---|---|---|---|
| 0 | 22 | M | 22-VIII | 23 | 24 | 25 | 26 | 27 | 28 | 29 | 5:600 ^u | | | | 29 | 30 | 1 | 2 | <p style="text-align: center;">Endovenosa de Acido Picrico</p> | | | | | | | |
| 1 | 25 | M | 22-VIII | 0 | - | + | + | + | + | + | 1:520 ^u | 28 | 1:40cc | A P | 1:2000 | + | | | | <p style="text-align: center;">Endovenosa de Acido Picrico</p> | | | | | | |
| 2 | 23 | M | 22 | - | - | - | - | + | + | + | 1:280 ^u | 28 | 1:15cc | A P | 1:1800 | + | + | + | | | <p style="text-align: center;">Endovenosa de Acido Picrico</p> | | | | | |
| 3 | 19 | M | 22 | - | - | - | - | + | + | + | 1:600 ^u | 28 | 0.95 | A P | 1:1500 | + | + | + | | | | <p style="text-align: center;">Endovenosa de Acido Picrico</p> | | | | |
| 4 | 26 | M | 22 | - | - | - | ± | ± | + | + | 1:400 ^u | 28 | 1:30cc | A P | 1:1300 | + | + | + | | | | | <p style="text-align: center;">Endovenosa de Acido Picrico</p> | | | |
| 5 | 20 | M | 22 | - | - | - | - | + | + | + | 800 ^u | 28 | 1cc | A P | 1:1000 | + | + | + | <p style="text-align: center;">Endovenosa de Acido Picrico</p> | | | | | | | |
| 0 | 25 | M | 28-VIII | 29 | 30 | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 720 ^u | 2 | | | 3 | 4 | 5 | 6 | | 7 | | | | 8 | 9 | <p style="text-align: center;">SEPTIEMBRE Endovenosa de Acido Picrico</p> |
| 1 | 23 | M | 28-VIII | - | ± | + | + | + | | | 1400 ^u | 2 | 1:15cc | A P | 1:950 | + | | | | | | | | | | |
| 2 | 21 | M | 28-VIII | - | ± | + | + | + | | | 640 ^u | 2 | 1.05 | A P | 1:900 | + | | | | | | | | | <p style="text-align: center;">SEPTIEMBRE Endovenosa de Acido Picrico</p> | |
| 3 | 24 | M | 28-VIII | - | ± | + | + | + | | | 880 ^u | 2 | 1.20 | A P | 1:850 | + | | | | | | | | <p style="text-align: center;">SEPTIEMBRE Endovenosa de Acido Picrico</p> | | |
| 4 | 22 | M | 28-VIII | - | ± | + | + | + | | | 1280 ^u | 2 | 1.10 | A P | 1:800 | + | | | | | | | <p style="text-align: center;">SEPTIEMBRE Endovenosa de Acido Picrico</p> | | | |
| 5 | 26 | M | 28-VIII | - | + | + | + | | | | 580 ^u | 2 | 1.30 | A P | 1:750 | + | | | | | | | | | | <p style="text-align: center;">SEPTIEMBRE Endovenosa de Acido Picrico</p> |

Dados los buenos resultados curativos obtenidos con la Tripaflavina en la piroplasmosis causada en los bóvidos por el subgénero Babesiella, los que se deben en parte a la afinidad que por el colorante posee el protozoario, fui tentado a ver el efecto que pudiera tener el ácido pícrico sobre el tripanosoma, para lo cual elegí tripanosoma Bruce en infecciones producidas en ratones blancos. Estas experiencias fueron verificadas en el Instituto Seroterápico de Milán, bajo la dirección del Sub-Director del Instituto, Profesor Zironi, a quien doy mis agradecimientos.

Conociendo el empleo externo, como también la dosis oral del ácido pícrico en los organismos vivientes, y siendo desconocida totalmente la toxicidad del producto por vía endovenosa, comencé mis trabajos para establecer ante todo la dosis mínima mortal.

Después de varias semanas de investigación sobre ratones blancos, sin que éstos hubieran sido inoculados por segunda vez, y comenzando con una solución hidro-pícrica al 1 por 10.000 llegué a comprobar que la dosis mínima letal intravenosa es, para el ratón blanco de 26 gramos de peso, la de 1 centímetro cúbico de una solución al 1 por 250 m. l., lo que corresponde a 0.20 centigramos por kilogramo de animal.

Durante la busca de la dosis mínima letal pude observar la enorme influencia que ejerce cualquier trastorno hepático en el ratón inoculado, pues se demostraba con la coloración amarilla de las mucosas, córnea y aun en las orejas. Siempre a la muerte y en la autopsia pude comprobar en esos animales abscesos, quistes, hidáticos equinococos, etc., también veía que la resistencia disminuía enormemente, pues a otros ratones sanos inoculados con las mismas dosis y con otras mayores no les causaba ni coloración de dichas mucosas, ni muerte.

En la autopsia que verifiqué de los animales en el curso de la busca de la mínima letal, pude apreciar que la eliminación del ácido pícrico inoculado endovenosamente (vena coccígea lateral) se efectúa por el riñón, el hígado e intestinos, presentando estos últimos, principalmente en su primera porción una fuerte enteritis hemorrágica que no se extendía al resto del tubo.

Los ratones a los que inoculé una dosis inferior a la mínima letal presentaban dentro de los primeros quince minutos después de la inyección formas convulsivas, pérdida de la conciencia, movimientos incoordinados, y, a la autopsia, una clara colo-

ración amarilla del peritoneo, lo mismo que de la primera porción del intestino. El corazón lo hallé siempre en diástole y el pulmón normal. Solamente en dos casos pude ver una ligera hemorragia que atribuí a una faz estertórea. Ni el hígado ni el bazo alcanzaron a tomar la coloración marilla, mostrándose siempre normales, lo mismo que los demás órganos.

Los demás ratones inoculados con una dosis menor a la mínima letal sobrevivieron. Pude también apreciar que la dosis mínima letal para los ratones enfermos de tripanosomiasis correspondía a la mitad de la que debe emplearse para animales sanos, o sea de 0.10 centigramos por kilogramo de peso bruto.

Una vez obtenida la dosis mínima letal endovenosa de ácido pícrico en el ratón blanco me propuse observar el efecto que tal ácido pudiera ejercer sobre la vida del tripanosoma.

Empecé las experiencias inculando un ratón blanco con tripanosoma Brucei, aislado de un curí al que se le había inoculado de una fuente pura del tipo *Tripanosoma Brucei*. (Como tipo puro de *Tripanosoma*, esto es, no recivivante, hubiera sido muy bien elegir el *Tripanosoma* tipo Gloxina para partir de un tipo original.) Debo agregar que todos los ratones por mí inoculados estaban libres de otras especies de tripanosomas, pues al menos así lo demostraron los exámenes de sangre centrifugada etc. que de ellos hice días antes de su inoculación con *Tripanosomas Brucei*. Además estos ratones pertenecían al criadero especial del Instituto Seroterápico de Milán.

Las experiencias no se siguieron ni en ratas, ni en conejos, ni en curies, dadas las irregularidades notables que presentan tales animales en la tripanosomiasis.

En el curso de la curación de los animales inoculados con el *Tripanosoma Brucei* se procedió de la manera siguiente:

A una serie de ratones inoculé subcutáneamente con sangre del primer ratón inoculado, al que había comprobado al séptimo día tripanosomas en la sangre. Esta sangre antes de la inoculación la mezclé a una solución fisiológica citratada al 7 por mil, la que, antes de unirla a la sangre, se calentaba a 38 grados porque cuando se debe inocular un cierto número de animales he observado la diferencia en grados de la infección desarrollada entre el primer ratón inoculado y el último, lo que hace pensar en la modificación de vitalidad del tripanosoma, ocasionada por

el enfriamiento de la sangre diluida. De la sangre tomada para inocular los ratones, mezclada con la solución fisiológica citrada, se inocularon por vía subcutánea 0.20 centímetros cúbicos por cada uno. La sangre del animal infectado, y del cual se tomaba sangre para la inoculación de los animales sanos que más tarde debían ser tratados, me hizo pensar en el número alto de tripanosomas por campo, lo que me daba un valor aproximado del poder infectante.

En los días siguientes a la inoculación examinaba la sangre al microscopio hasta conseguir que el número de tripanosomas por milímetro cúbico fuera mayor de 600.000 (para contar los tripanosomas procedí como para contar los glóbulos blancos, según el método de Thomasai, agregando a la solución empleada unas cuantas gotas de formol puro con el objeto de fijar los tripanosomas.) Después inyectaba el ratón enfermo con ácido pícrico.

La sangre de los ratones así tratados era examinada en los días siguientes a la inoculación mediante la extracción de una gota de sangre de la punta de la cola o de la marginal de la oreja. Esta gota era colocada sobre un cubre-objetos previamente calentado, y éste a la vez sobre un porta objetos calentado también. Luégo se examinaba en fresco y al campo oscuro. En cuanto al curso de la enfermedad en los ratones era ésta más precisa de 3 a 4 días en el caso de inocular sangre con tripanosomas, provenientes de otro ratón; cuando se le inoculaba proveniente de un curí había necesidad de esperar 6 a 7 días. En los Cuadros adjuntos de los exámenes microscópicos he usado para indicar el número de tripanosomas encontrados los signos siguientes:

- No se encontraron tripanosomas en todo el preparado.
- Encontré en todo el preparado, de 1 a 2.
- ± Se encontraron en número de 1 a 10 tripanosomas en todo el preparado.
- + Se encontraron de 1 a 2 por campo.
- ++ Se encontraron de 2 a 5 por campo.
- +++ Se encontraron de 5 y más por campo.

Para observar al microscopio la preparación es necesario obrar con cautela y mucho más cuando se trabaja con cubre y porta-objetos nuevos porque como los tripanosomas son muy sensibles fuera de la circulación al contacto con los álcalis que

contienen los vidrios nuevos, de por sí ya debilitados los tripanosomas con las sustancias químicas usadas para el experimento, vendría con el residuo de los álcalis adheridos al vidrio, a modificarse los movimientos, lo que se podría interpretar como una influencia del medicamento en experiencia.

Para mis experimentos no emplee el ácido pícrico en soluciones azucaradas ni saladas porque con estas sustancias no es neto el límite de la eficacia del remedio y se pueden presentar graves errores, como sucede con ciertas sustancias colorantes asociadas del cloruro de sodio. El azul de metileno por ejemplo, agregado a la sacarosa, produce una cierta disminución de la eficacia. Emplee, pues, la sola solución acuosa de ácido pícrico para conseguir un valor terapéutico igual.

Interpretación del movimiento.

Después de haber tomado la gota de sangre del ratón infectado observé los movimientos del tripanosoma, luego de haber tenido la precaución de calentar a 37 grados centígrados la solución citratada, como quedó arriba explicado. La interpretación de los movimientos es de importancia enorme para estudiar la eficacia del medicamento.

Durante los últimos tiempos de mi experimento pude ver que la infección provocada con sangre diluida a ratones nuevos traía como consecuencia que la infección se observaba en los días siguientes y en número igual en los varios ratones, lo que podría interpretarse como que el tripanosoma, después de haber sufrido varios pasajes, en ratones, originaba una multiplicación de los tripanosomas y se hacía más rápida que en los pasajes iniciales.

Un resultado negativo al examen, después de haber sufrido la inyección infectante, no indica que el animal esté exento del tripanosoma: demuesera solamente que ellos no se encuentran en la gota de sangre examinada. En otras palabras: que el número de tripanosomas no llegaba al límite del campo del microscopio. Puede, sin embargo suceder que en la sangre examinada y señalada como negativa, no haya parásitos, cosa que no excluye la posibilidad de que tenga una cantidad mínima de tripanosomas, suficientes para provocar una recaída, lo que se excluiría con una inoculación de la sangre a otro ratón. Puede también

| No. del ratón | Peso Gms. | Sexo | Fecha inocularión | OBSERVACIONES | | | | | | No. Trip. per mm ³ | Cantidad, en c.c. | Título de la Solución | Producto |
|---------------|-----------|------|-------------------|---------------|---|----|------|-------|---|-------------------------------|-------------------|-----------------------|----------|
| | | | | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | | | | |
| 0 | 25 | M | 2-IX-1932 | ± | + | ++ | ++++ | +++++ | | 800 ^{cc} | | | |
| 1 | 26 | M | 2 | ± | + | ++ | +++ | | | 850 ^{cc} | 1.30 | 1:750 | A P |
| 2 | 23 | M | 2 | ± | + | ++ | +++ | | | 1'110 ^{cc} | 1.15 | 1:700 | A P |
| 3 | 21 | M | 2 | - | + | + | ++ | | | 3 20 ^{cc} | 1.05 | 1:650 | A P |
| 4 | 22 | M | 2 | ± | + | - | +++ | | | 6'20 ^{cc} | 1.10 | 1:600 | A P |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|---|----|---|---|----|-----------|---------|--|-------------------|------|--------|-----|
| 0 | 23 | M | no | 8 | 9 | 10 | | | | | | 1:500 | A P |
| 1 | 21 | M | 7 | ± | + | ++ | Sin trip. | Control | | 850 ^{cc} | | | |
| 2 | 22 | M | 7 | ± | + | ++ | | Control | | 700 ^{cc} | 1.10 | 1:1000 | A P |
| 3 | 20 | M | 7 | ± | + | ++ | | | | 650 ^{cc} | 1cc | 1:950 | A P |
| 4 | 24 | M | 7 | ± | + | ++ | | | | 800 ^{cc} | 1.20 | 1:900 | A P |

| | | | | | | | | | | | | | |
|---|----|---|----|----|----|----|--|---------|-------|-------------------|------|-------|-----|
| 0 | 21 | M | no | 13 | 14 | 15 | | Control | AP | | | 1:450 | A P |
| 1 | 25 | M | no | | | | | Control | AP | | | 1:500 | A P |
| 2 | 22 | M | 12 | ± | + | | | Control | trip. | | | | |
| 3 | 20 | M | 12 | ± | + | | | | | 100 ^{cc} | 1cc | 1:900 | A P |
| 4 | 21 | M | 12 | ± | + | | | | | 260 ^{cc} | 1.05 | 1:850 | A P |

suceder que la inoculación de la sangre en la que no haya tripanosomas dé resultados positivos como lo demostraron Herlich, Breiuel y Kinghorn.

Es cosa aceptada que no se puede dar un resultado negativo con certeza a la esterilidad de la sangre sometida únicamente al examen microscópico. Estas circunstancias hacen, naturalmente, más difícil la busca del poder esterilizante de un medicamento en el organismo animal.

En ciertos períodos el tripanosoma desaparece de la sangre para anidar en los tejidos, como anteriormente quedó expuesto.

Bien conocemos los trabajos de Levaditi, Mesnil, Mac Intash, Neuman, Rosenth Kindiche, Goder, Ritz, Stuhmer y de otros que por el momento se me escapan, y sabemos que esos autores refieren cómo un tipo dado de tripanosoma, durante una reciviva, infectan al ratón de control: el que primero había sufrido una infección de tripanosoma tipo gloxina, esto es, infectado directamente por la gloxina. Si de éste se había curado espontáneamente y presentaba los anticuerpos en circulación contra el tripanosoma tipo gloxina, los tripanosomas tipo recidivante inoculados a este mismo ratón lo infectan no obstante ser portador de anticuerpos tripanolíticos.

Así también la afinidad que pueden tener los tripanosomas para determinados medicamentos presentan dificultades para conseguir un tipo específico a todos. Recordaré los trabajos de Tourneau, Madame Trefonel, Vallée, Haldel y Jortten, quienes demostraron que el Bayer 205 tiene una acción mucho más eficaz para el Tripanosoma Brucei, el Equiperdum Equinum, el Congolense y el Rhodesiense. En cambio Brumpt y Lavier demostraron que el Bayer 205 tiene una acción específica contra el tripanosoma Venezolense pero carece de ella contra el Cruci.

Handel y Joetter confirman la misma negativa contra el tripanosoma Lewise y Mayer y Zeiss contra el tripanosoma Cruci.

Los trabajos de Pfeiler han demostrado cómo los caballos tratados con Bayer 205 no han curado todos, y que en cambio aquellos no curados por el Bayer presentaban una menor resistencia al Atoxil. Los trabajos de Levaditi y Nicolau han demostrado que el tripanosoma que presentaba cierta resistencia a las sales

de bismuto in vitro no resistía a estas sales si se les agregaba un pedazo de hígado o pequeños fragmentos de cerebelo, riñón, bazo o músculo.

Muchas veces sucede que primero que el medicamento empleado para la cura haya podido extender su acción plenamente sobre los parásitos, el medicamento se fija en gran parte por los diferentes órganos y de esta manera resulta ineficaz. Otros, en cambio, explican su acción tripanolítica, seguida de la acción intravenosa, en aquellos momentos en que la inyección inoculada tiene el máximo de la concentración de la solución. La acción disminuye con la dilución que el medicamento va sufriendo en el organismo, y que lo hace inactivo contra los tripanosomas.

Tampoco los experimentos in vitro permiten siempre sacar conclusiones seguras, en cuanto se trata del efecto curativo de un medicamento en el organismo animal. Así, por ejemplo, he podido observar cómo el ácido pícrico empleado sobre el tripanosoma in vitro tenía una acción tripanolítica intensa y, en veces se mostró ineficaz empleado al interior, o no demostró toda su eficacia. En cambio otras sustancias químicas que se experimentaron in vitro mantenían móviles los tripanosomas, pero a la inoculación experimental mezcladas con tripanosomas no permitían producir la infección.

En vista de que el ácido pícrico, inoculado tanto subcutáneamente como intravenosamente en ratones blancos infectados experimentalmente con tripanosomas no me dió un resultado plenamente halagador, quise asociarlo a otros medicamentos, eligiendo al efecto los arsenobenzoles entre los cuales escogí el Arsenobenzol Pieroni y el Neo-Iacol. En los Cuadros adjuntos se hallará el resultado de esas experiencias.

También ensayé separadamente el efecto de cada uno de los Arsenobenzoles habiendo llegado a un resultado favorable para uno y desfavorable para otro. Pude observar también que la mezcla de ácido pícrico con Arsenobenzol Pieroni conservaban invariables las toxicidades respectivas, esto es, la toxicidad de un producto se sumaba a la del otro, pudiéndose matar los animales con la mitad de las respectivas dosis mínimas letales.

Observé que la asociación del ácido pícrico y del Arsenobenzol Pieroni a la dosis de 5-3-2 "5 por kilogramo de peso vivo ha tenido una modificación terapéutica más intensa por la vía subcu-

tánea que por la intravenosa, obteniendo la reducción del tripanosoma y la desaparición de éste por algunos días".

En el Boletín de la Sección Italiana de la Sociedad Internacional de Microbiología, Fascículo X del mes de noviembre de 1932, fue publicada la nota preventiva de este trabajo, y hoy rindo con este estudio los últimos resultados de mi experimento.