

PHYTOMONAS ELMASSIANI EN EL DIAGNOSTICO DE TRYPANOSOMA CRUZI

Gloria Echeverri¹ y Stephen C. Ayala²

EXTRACTO

Phytomonas elmassiani es un flagelado trypanosomático que infecta el látex de la planta *Asclepius curassavica*, presente en la zona de Cali; es transmitido por el insecto hemíptero *Oncopeltus cingulifer*. Se investigó la posibilidad de usar *P. elmassiani* en el diagnóstico de *Trypanosoma cruzi* en la chucha *Didelphis marsupialis*, uno de sus principales huéspedes silvestres. La inoculación de *Phytomonas* concentradas por centrifugación del látex en chuchas infectadas y no infectadas con *T. cruzi* no mostró reacciones cutáneas específicas. *Phytomonas* vivas, concentradas del látex, u obtenidas de las glándulas salivares de insectos, no se inmovilizaron por el suero de chuchas infectadas con *T. cruzi*.

Aunque Zeledón y Ponce¹, usando como antígeno formas de cultivo de *Trypanosoma cruzi*, observaron reacciones cutáneas inmediatas en personas con la enfermedad de Chagas, las pruebas cutáneas investigadas para diagnosticar la infección chagásica generalmente no han dado resultado positivo². Por otro lado, flagelados pertenecientes a los géneros *Leishmania*, *Trypanosoma* y *Leptomonas*, producen reacciones intradérmicas positivas en pacientes con leishmaniasis^{3,4}. Como se ha demostrado la presencia de antígenos comunes entre flagelados de diversos géneros de la familia Trypanosomatidae, algunos flagelados de insectos del género *Leptomonas* han sido investigados para estimular inmunidad contra *T. cruzi* en ratones.^{5,6}

Basados en estos hechos y en la fácil obtención de grandes cantidades de *Phytomonas elmassiani* en las vecindades de Cali, se decidió probar su utilidad en el diagnóstico de infecciones por *T. cruzi*. *P. elmassiani* es un flagelado trypanosomático que se encuentra frecuentemente en Colombia en el látex de las plantas laticíferas *Asclepius curassavica* y *A. fruticosa*. Es transmitido principalmente por el insecto hemíptero *Oncopeltus cingulifer*.^{7,8}

Se realizaron experimentos preliminares para explorar la utilidad de *P. elmassiani* como antígeno en el diagnóstico de infecciones por *Trypanosoma cruzi* en mamíferos salvajes en los cuales las pruebas inmunodiagnósticas utilizadas rutinariamente en el hombre no son de utilidad. Quisimos averiguar: a: si las *Phytomonas* vivas en presencia de suero de un

mamífero infectado con *T. cruzi* pierden su movilidad (prueba de inmovilización⁹) y b: si las *Phytomonas* vivas inoculadas subcutáneamente en un mamífero infectado con *T. cruzi* provocan alguna reacción antígeno-anticuerpo visible que permita la identificación de los animales infectados (prueba cutánea).

MATERIALES Y METODOS

Se recolectó en tubos capilares látex con *Phytomonas* de *A. curassavica* en el Jardín Zoológico de Cali y en La Umbría, en la carretera a Pance, Municipio de Cali, Departamento del Valle. Los tubos fueron centrifugados por diversos tiempos en una centrifuga para microhematocrito, separándose el látex en varias capas según la gravedad específica de sus componentes. Las distintas fracciones fueron separadas, rompiéndose los tubos en el sitio de la interface, y fueron estudiadas individualmente para determinar la distribución de los flagelados y la toxicidad de cada una para ratones de laboratorio.

Para la prueba de inmovilización se empleó: A: suero de 2 chuchas comunes (*Didelphis marsupialis*) infectadas experimentalmente con *T. cruzi*, usando una cepa aislada de una chucha de Carimagua, Meta, (Llanos Orientales de Colombia). La cepa se mantuvo en medio difásico de Tobie con repiques mensuales. El aislamiento original demostró ser *T. cruzi* por su comportamiento en cultivo de tejidos, en *Rhodnius prolixus* y en animales. Tenía 14 meses de aislamiento cuando se utilizó en esta investigación; B: suero de chuchas no infectadas con *T. cruzi*; y C: solución salina. Como antígeno se emplearon *Phytomonas* aisladas del látex de plantas y de las glándulas salivares de *O. cingulifer*.

Para la prueba cutánea se utilizaron 2 adultos de *D. marsupialis* inoculado 60 días antes con un millón de *T. cruzi* de 15 días de cultivo. Se comprobó la infección por hemocultivo. Se emplearon como control 2 chuchas libres de *T. cruzi*.

RESULTADOS Y DISCUSION

Distribución de los flagelados en el látex:

El látex centrifugado se separó en 3 capas o fracciones: una capa superior líquida e incolora, sin flagelados; una capa inferior gelatinosa, presente sólo en látex de plantas altamente infectadas, y donde se concentraron la mayoría de los flagelados, y una capa inferior, densa y blanca, también con flagelados en todos los niveles, pero especialmente en la zona más vecina a la capa intermedia.

El tiempo óptimo para la concentración de flagelados es 2

1. Departamento de Biología

2. Departamento de Microbiología, Universidad del Valle, Cali, Colombia.

horas. Al cabo de este tiempo la capa intermedia consiste casi exclusivamente de flagelados y en la capa inferior sólo hay escasos. Sin embargo, después de los 15 minutos de centrifugación el número de flagelados en movimiento empieza a disminuir progresivamente.

Toxicidad de las fracciones del látex para los ratones:

Se inocularon intraperitonealmente grupos de 3 ratones (machos de 15 gr, cepa CFW) con 0.03 ml. de suspensión de látex de cada fracción diluidas en solución salina. La fracción superior y la intermedia fueron diluidas 1:4 y la inferior 1:5. Los ratones inoculados con la fracción inferior murieron dentro de los 20 minutos de ser inoculados, aparentemente debido al glucósido presente en el látex, conocido como tóxico para los vertebrados¹⁰. En cambio, las dos fracciones superiores no tuvieron efecto aparente en los ratones. Por tanto se utilizó en las inoculaciones la fracción intermedia del látex sin purificación.

Prueba subcutánea:

Dos *D. marsupialis* infectados con *T. cruzi* y 2 controles libres de infección recibieron subcutáneamente 0.05 y 0.07 ml. de la suspensión de flagelados del látex concentrados por centrifugación durante 2 horas, y diluidos 1:5 en solución salina.

La observación de la zona inoculada a 1, 24, 48 y 72 horas después de la inoculación de 0.05 ml. de la suspensión látex-*Phytomonas* en las 2 chuchas control y en una de las infectadas con *T. cruzi* mostró a la hora una reacción eritematosa indurada que persistió por 48 horas. La otra chucha infectada con *T. cruzi*, inoculada con 0.07 ml. de la misma suspensión, no manifestó ninguna reacción. La reacción cutánea observada fue interpretada como inespecífica y posiblemente producida por el látex. Es posible que los resultados fueran distintos si se consiguiera cultivar las *Phytomonas* y luego utilizarlas libres de látex en estos experimentos.

Prueba de inmovilización:

El látex fue centrifugado durante 15 minutos y luego 0.01 ml. de la zona intermedia fue suspendida en a: tres parte de suero de chucha infectada con *T. cruzi*; b: suero de chucha no infectada y c: en solución salina. No hubo diferencia apreciable en los movimientos de los flagelados en las 3 suspensiones durante las 2 horas de observación. Lo mismo se observó con los flagelados obtenidos de las glándulas salivares de *O. cingulifer*.

Estos ensayos fueron realizados a temperatura de 37°C, 23°C y 10°C, sin observarse diferencias. En cambio, a 39°C los flagelados murieron rápidamente.

En resumen, esta limitada experiencia indica que en las condiciones de estos experimentos no se pueden emplear *Phy-*

tomonas elmassiani vivas como antígeno en el diagnóstico de *T. cruzi* de la chucha *Didelphis marsupialis*.

AGRADECIMIENTOS

Este estudio formó parte del curso de "Investigación Independiente" del Departamento de Biología de la Universidad del Valle. La cepa de *T. cruzi*, los hemocultivos, y una parte del suero de chucha infectado fueron obtenidos gracias a la colaboración del Dr. Antonio D'Alessandro y de la Sra. Olivia de Hincapié del Centro Internacional de Entrenamiento e Investigaciones Médicas de la Universidad de Tulane. Carmen H. Varela, Stella Guerrero, Humberto Carvajal, Libia de Echeverri y Ernesto Gómez ayudaron en la recolección del látex.

SUMMARY

Phytomonas elmassiani, from the milkweed plant *Asclepius curassavica* around Cali, was concentrated by centrifugation of the latex or isolated from the salivary glands of its insect host to test its utility for diagnosing *Trypanosoma cruzi* infections in the common opossum.

The subcutaneous inoculation of a latex-*Phytomonas* suspension in *T. cruzi* infected and non-infected opossums did not show specific reactions, nor were *Phytomonas* immobilized by *T. cruzi* immune serum from the same animal.

REFERENCIAS

1. Zeledón, R. y Ponce, C.: A skin test for the diagnosis of Chagas disease. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* 68: 414-415, 1974.
2. Navarrete, F. y Biagi, F.: Leishmaniasis cutánea: especificidad de la reacción intradérmica de Montenegro. *Prensa Med Mex* 25: 2-4, 1960.
3. Zeledón, R., Hidalgo, W. y Hidalgo, H. X.: Intradermo-reacción de Montenegro con antígeno de *Strigomonas oncopelti*. *Rev Biol Trop* 8: 145-146, 1969.
4. Zeledón, R., Hidalgo, W. y Hidalgo, H. X.: Consideraciones cuantitativas sobre la intradermo-reacción de Montenegro con antígeno homólogo (leishmania) y antígeno *Strigomonas oncopelti*. 2o. Congreso Latinoamericano de Microbiología. San José, Costa Rica, Pg. 155, 1961.
5. Souza, M. C. M. y Rotman, I.: Protective effect of *Leptomonas pessoai* against the infection of mice by *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Microbiol* 4: 187-189, 1971.
6. Souza, M. C. M.: Estudio dos mecanismo inmunológicos en camundongos inoculados con *Leptomonas pessoai* e da susceptibilidade desses animais a infeccao por *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Pat. Trop* 3: 291-332, 1974.
7. Ayala, S. C., Quintero, O. y Barreto, P.: Trypanosomas de plantas lactificeras y sus hemipteros transmisores. *Acta Med. Valle* 5: 24, 1974.
8. Ayala, S. C., Quintero, O. y Barreto, P.: Trypanosomátidos de plantas lactificeras y sus hemipteros transmisores de Colombia y Costa Rica. *Rev. Biol. Trop* 23: 5-15, 1975.
9. Weinstein, P.P.: Immunologic aspects of the parasitic infections on the parasite. Immunologic aspects of parasitic infections. Pan-American Health Organization, *Scientific Publi No.150*: 91-163, 1967.
10. Bower, L.P.: Ecological Chemistry. *Sci Amer* 220: 22-29, 1962.

can como los más importantes. Además, se deben mencionar otros cambios que siguen a un acelerado proceso de urbanización como el mejoramiento de los niveles de vida de la población y una indiscutible caída de las tasas de fecundidad y fertilidad. Estos son factores decisivos para reducir la frecuencia del carcinoma invasivo de cérvix. No sólo la incidencia ha disminuído, también la mortalidad ha caído drásticamente. En 1962 la mortalidad por cáncer de cérvix fue de 31x100.000 mujeres de 15 y más años, una década más tarde cayó a 13.8.³⁰ Riesgo mucho menor que el de morir por enfermedades circulatorias y otros padecimientos crónicos.³¹

REFERENCIAS:

- Rigoni-Stern (1842), citado por Rotkin, I. D., y King, R. W.: "Environmental Variables Related to Cervical Cancer". *Amer J. Obstet Gynec* 83: 720-728.
- Jones, E. G., Mc. Donald, L. y Breslow, L. A.: A study of Epidemiological factors in carcinoma of the uterine cervix. *Amer J. Obstet Gynec* 76: 1-10, 1958.
- Rotkin, I. D.: Relation of Adolescent coitus' to Cervical Cancer Risk. *JAMA* 179: 486-491, 1962.
- Wynder E. L., Cornfield, J., Schroff, P. D. y Doraiswami, K. R.: A study of environmental factors in cancer of the cervix. *Amer J. Obstet Gynec* 68: 1016-1052, 1954.
- Guzmán, N. y Guerrero, R.: Cáncer de Cérvix Uterino en Cali, Colombia. *Ant. Med* 21: 765-786, 1971.
- Boyd, J. T. y Doll, R.: A study of the aetiology of carcinoma of the cervix uterine. *Brit J. Cancer* 18: 419-434, 1964.
- Terris, M. y Oalman, M. C.: Carcinoma of the cervix an Epidemiologic study. *JAMA* 174: 1847-1851, 1960.
- Abou-Daoud, K. T.: Epidemiology of carcinoma of the Cervix Uterine in labanése Christians and Moslems. *Cancer* 20: 1706-1714, 1967.
- Lundin, F. E., Erickson, C. C. y Sprunt, D. H.: Socioeconomic distribution of cervical cancer. Washington. *Public Health Monograph* No. 73: 1964.
- Guzmán, N.: Cáncer de Cérvix Uterino y Migración a Cali, Colombia. *Acta Med Valle* 3: 55-58, 1972.
- Rotkin, I. D. y Cameron, J. R.: Clusters of variables influencing risk of cervical cancer. *Cancer* 21: 663-671, 1968.
- Reh. E.: La ingestión de Vitamina A en Latinoamérica y el Caribe. *Bol Ofic Sanit Panamer* 68: 53-63, 1970.
- Fernández, N. A., Burgos, I. C., Roberts, L. J. Y Asenjo, C. F.: Nutritional status in Puerto Rican Slum Area. *Amer J. Clin Nutr* 21: 646-656, 1968.
- Moghissi, L. S. y Mack, H. C.: Epidemiology of the Cervical Cancer. *Amer J. Obstet Gynec* 100: 607-612, 1968.
- Pereyra, A. J.: The relationship of Sexual activity to cancer of the Cervix: Cancer of the cervix in a Prison population. *Obstet Gynec* 17: 154-159, 1961.
- Wahi, P. N.: Luthra, U. K., Mali, S. y Shimkin, B. B.: Praelavence and distribution of cancer of the uterine cervix in Agra District, India. *Cancer* 30: 720-725, 1972.
- Truelson, F. (1949). Citado por Reid, B. L.: Cancer of the cervix uterine. Review of casual factors whit an hipotesis as to its origin. *Med. J. Aust* 1: 375-383, 1965.
- Rotkin, I. D. y King, R. W.: Environmental variables related to cervical cancer. *Amer J. Obstet Gynec*, 83: 720-728, 1962.
- Maliphant, R. G.: The incidence of cancer the uterine cervix. *Brit. Med. J.* 1: 978-982, 1949.
- Clemmensen, J.: Statistical studies in the aetiology of malignant neoplasms. *Acta Path Micro Biol. Scand Supp* 174: 1, 277-336, 1965.
- Stern, E.: Epidemiology of dysplasia. *Obstet Gynec Survey* 24: 711-723, 1969.
- Stern, E. y Dixon, W. J.: Cancer of the cervix. I: A biometric approach to etiology. *Cancer* 14: 153-160, 1961.
- Stern, E., Lachenbruch, P. A. y Divon, W. J.: Cancer of the uterine cervix II. A biometric approach to etiology. *Cancer* 20: 190, 201, 1967.
- Rawls, W. E., Tompkins W. A. y Melnick, J. L.: The association of Herpes virus type 2 and carcinoma of the uterine cervix. *Amer J. Epidem* 89: 547-554, 1969.
- Royston, I. y Aurelian, L.: The association of genital Herpesvirus whit cervical atypia and carcinoma in situ. *Amer J. Epidem* 91: 531-538, 1970.
- Guzmán, N.: Cáncer de Cérvix uterino y anticuerpos contra el virus herpes genital. (Para publicar).
- Muñoz, N., Aristizábal, N., Zafra, G., Yee, C., Rabson, A., Pearson, G. y De-The, G.: Anticuerpos contra virus herpes en pacientes con carcinoma de cuello uterino, condiloma acuminado y controles. *Acta Med Valle* 6: 103-106, 1975.
- Magge, P. N. y Schoental, R.: Carcinogenesis by nitroso compounds. *Brut Med Bull* 20: 102-106, 1964.
- Guzmán, N. y Bueno, M.: Tendencia del Cáncer de Cérvix Uterino en Cali, Colombia. *Ant. Med.* 24: 249-257, 1974.
- Bueno, M. y Guzmán, N.: (Datos no publicados).
- Puffer, R. R. y Griffith, G. W.: Características de la Mortalidad Urbana, Washington, OPS/OMS. Pub. Cient. 151, 1968.

EL EXTRACTO

Con el objeto de ayudar a nuestros colaboradores en la mejor presentación de sus trabajos, publicaremos en varios números venideros pequeños comentarios relacionados a las diferentes partes de un trabajo científico. Iniciamos hoy con El Extracto, que según la tradición de Acta Médica del Valle va colocado al comienzo del artículo. El presente trabajo es una adaptación de la parte pertinente de las recomendaciones dadas por la Royal Society de Londres* sobre la preparación de trabajos científicos. Se han incluido algunos comentarios producto de la experiencia local.

Consideraciones Generales

Es deseable que cada trabajo sea acompañado de un extracto, preferiblemente al comienzo del artículo. Este extracto no es parte del trabajo; pretende dar una breve visión del contenido del artículo; llamar la atención a toda la nueva información aparecida y a las conclusiones más importantes; debe ser factual y debe ser utilizable para reproducción en otros medios y para clasificación y archivo por parte de los servicios de información. Debe evitarse en el extracto el tratamiento vago y poco descriptivo a través de frases tales como: se hacen consideraciones sobre el tratamiento, se discuten las bases de tal teoría etc. Es preferible enumerar las consideraciones hechas sobre el tratamiento o describir brevemente las bases de la teoría.

* General notes on the preparation of Scientific Papers. The Royal Society. London 1974. 3rd. Edition.