

## Efecto de los corticosteroides en la leishmaniasis cutáneo-mucosa. Estudio experimental\*

por

Misael Chinchilla\*\*, Olga M. Guerrero\*\* y Elsa Portilla\*\*

(Recibido para su publicación el 21 de Noviembre de 1979)

**Abstract:** Groups of "immunized" and "non-immunized" hamsters were inoculated weekly with 2, 10 or 20 mg of cortisone acetate per 100 gr of body weight and infected with *Leishmania mexicana* or *L. braziliensis*. Doses of 10 and 20 mg of cortisone were excessive, since the animals died with bacterial infections before they developed leishmaniasis. Inflammation and necrosis were more evident in animals inoculated with cortisone and *L. mexicana*. Furthermore, this strain caused lesions in lymphatic ganglia of immunosuppressed animals, but was not observed in those inoculated with *L. braziliensis*. There was no difference between the pathological findings in nonimmune and immune hamsters. These results could indicate that passive immunization with dead antigen is not effective.

Los corticosteroides son capaces de exacerbar infecciones con toda clase de organismos intracelulares tales como hongos, bacterias y protozoarios tales como *Toxoplasma gondii* y *Trypanosoma cruzi* (Kass y Finland, 1951; Frenkel, 1960; Frenkel y Lunde 1966; Henson *et al.*, 1967, Frenkel *et al.*, 1975), siendo que ese efecto parece dirigirse contra la resistencia natural así como contra la inmunidad adquirida. Sin embargo no existe buena información acerca del efecto de drogas inmunosupresoras sobre *Leishmania* (tipo mucocutáneo) en infecciones naturales o experimentales. Además sólo existen algunos estudios indicando el aislamiento del parásito de órganos internos tales como hígado, bazo, etc. (Zeledón y Blanco, 1963; Blanco y Zeledón, 1965) en animales de laboratorio y un trabajo de Deane *et al.*, (1966) en donde se menciona el hallazgo de formas de amastigoto del género *Leishmania* en médula ósea humana. Nosotros informamos aquí acerca del efecto de un tratamiento prolongado con acetato de cortisona en hamsters inmunes y no inmunes infectados con 2 cepas de *Leishmania*. También se comunica de la invasión del parásito a órganos internos aparentemente inducida por la droga inmunosupresora.

---

\* Trabajo realizado en parte con fondos de la Universidad de Costa Rica, Vicerrectoría de Investigación, Proyecto N° 02-07-05-53 y del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

\*\* Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

## MATERIAL Y MÉTODOS

**Animales:** Hamsters hembras o machos ( $155 \pm 10$  gr) de una colonia de la Universidad de Costa Rica fueron usados en este estudio. Los animales se mantuvieron con la alimentación convencional similar para todos los grupos estudiados.

**Cepas de Leishmania y preparación del inóculo:** Una cepa virulenta de *L. mexicana*\* (OCR cortésmente cedida por Dr. Rodrigo Zeledón) fue inoculada en hamster y reaislada en cultivo para el estudio. También se usó una cepa de *L. braziliensis* recientemente aislada de un caso humano por los autores. Los organismos fueron cultivados en medio de Rugai (1941) por 15 a 20 días, los promastigotos fueron lavados por centrifugación (700–800 r.p.m. por 8 minutos) con solución salina al 0,85%. Los organismos fueron contados con hemocitómetro, inoculándose subcutáneamente  $10^6$  promastigotos en la nariz de cada uno de los hamsters.

**Preparación del antígeno:** Después de contados, los promastigotos fueron sometidos a 10 ciclos de congelación y descongelación sucesivos. Una vez ajustada la concentración de parásitos a  $10^6$  organismos por ml, se dividió el material en porciones pequeñas que se mantuvieron a  $-20$  C, constituyendo el antígeno de trabajo.

**Inmunización:** A los animales se les inyectó subcutáneamente 1 ml de una mezcla de antígeno y coadyuvante incompleto de Freund una vez por semana durante 1 mes.

**Tratamiento de corticosteroides:** En una primera parte de este trabajo grupos de 4 hamsters fueron inyectados s.c. 2 veces por semana con acetato de cortisona (Sigma Chemical Company) en dosis de 1, 5 ó 10 mg/100 gr de peso corporal (2, 10 ó 20 mg/ semana para cada animal) comenzando 2 días antes de la infección y manteniendo el tratamiento por 10 semanas. Grupos controles fueron infectados pero no tratados con la droga. Por cuanto existe un estudio muy detallado del efecto de los corticosteroides en hamsters normales (Frenkel y Havenhill, 1963) no consideramos necesario repetir tal control. Seis semanas después de la última inyección del corticosteroide, todos los hamsters sobrevivientes fueron tratados 2 veces por semana con 5 mg de acetato de cortisona (10 mg/100 gr de peso corporal por semana). Este tratamiento se mantuvo por 11 semanas completándose así un período total de 27 semanas en que el experimento fue concluido. Los animales aún sobrevivientes fueron sacrificados para hacer el correspondiente estudio histopatológico.

**Curso de la infección:** Los animales fueron observados diariamente en cuanto a la lesión inflamatoria que presentaban, anotándose el momento en que la inflamación se hizo evidente. Para ratificar esto, el diámetro de las narices en los hamsters eran medidos, comparando el dato con el diámetro promedio de las narices de 15

---

\* A través de todo el trabajo se escribirá *L. mexicana* o *L. braziliensis* para indicar a las especies de los tipos "*mexicana*" y "*braziliensis*" respectivamente.

hamsters normales. El avance de la necrosis también fue observada y comparada entre los distintos grupos. Paralelamente se llevó el control de sobrevivencia de los animales así como su curva de peso.

**Estudios histopatológicos:** Los órganos de los animales se fijaron en formalina al 10%pH 7.0 y teñidos con hematoxilina-eosina y Gallego. Frotis directo de hígado, bazo, ganglio linfático y médula ósea fueron fijados con alcohol metílico y teñidos con Giemsa (dos gotas por 1 ml de amortiguador pH 7,2) y estudiados para la presencia de amastigotos de *Leishmania*.

## RESULTADOS

El tratamiento semanal con 10 y 20 mg de cortisona por 100 gr de peso produjo la muerte de los animales en un tiempo promedio de menos de 64 días después de una notoria disminución de peso (Fig. 1) mientras que animales tratados con 2 mg semanales sobrevivieron un promedio de 64 días (Fig. 2). Tal sobrevivencia fue independiente de la cepa de *Leishmania* usada, así como de la "inmunización" o no de los animales.

En cuanto al curso de la infección en los animales, una clara inflamación de la nariz de los hamsters fue observada 26 días de la infección para el caso de la cepa OCR de *L. mexicana* y después de 34 días de infección para la cepa *L. braziliensis*. Sin embargo la evolución de la lesión producida por la cepa OCR fue más acentuada. Los animales tratados con cortisona desarrollaron una úlcera más pronunciada (Fig. 3) algunas veces exacerbada por contaminación bacteriana secundaria (*Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoeticus*). Se encontró formas de amastigotos en frotis de bazo y ganglio linfático de animales tratados con cortisona. Además, los cortes de ganglios linfáticos presentaron grandes áreas de necrosis con abundantes amastigotos (Fig. 4).

## DISCUSION

Analizar el efecto que los corticosteroides pueden ejercer en infecciones con leishmaniasis mucocutánea puede ser de utilidad desde un punto de vista clínico. Tal efecto puede ser importante si consideramos que los corticosteroides actúan sobre la inmunidad celular (Kass y Finland, 1951, 1953, 1957; Frenkel y Lunde, 1966).

Sin embargo la concentración de cortisona inyectada en este caso fue crítica, puesto que dosis altas de la droga produjeron una disminución marcada de peso (Fig. 1) lo que terminó con la muerte de los animales debido a infecciones bacterianas antes de que la lesión leishmaniásica pudiera desarrollarse (Fig. 2). La mayor gravedad de las lesiones en los animales tratados con 2 mg de cortisona que en los hamsters no tratados (Fig. 3) refleja el efecto inmunosupresor de la droga. Sin embargo no pudimos determinar diferencia alguna entre el efecto de la droga sobre animales normales y aquellos previamente inculcados con el antígeno de *Leishmania*. Llama la atención este hecho ya que para otras infecciones con organismos intracelulares tales como *Toxoplasma* (Stahl *et al.*, 1966), virus (Henson *et al.*, 1967) se informa de una acción inmunosupresora más efectiva sobre la resistencia natural (animales no inmunes). El hecho de que en nuestros experimentos la inmunización fue de tipo pasivo usando organismos muertos como antígeno podría ser la explicación de tales diferencias. En efecto la inmunidad en parásitos intracelulares es estimulada más efectivamente por la presencia del parásito vivo (Cox, 1978).

Hamsters inoculados con la cepa de *L. mexicana* presentaron más rápida evolución de las lesiones las cuales a su vez fueron más intensas. Esto concuerda con lo observado por otros autores en cuanto a la virulencia de cepas (Convit y Pinaridi, 1974; Zuckerman, 1977). También fue la cepa O.C.R. de *L. mexicana* la que aparentemente por efectos de esta droga inmunosupresora produjo lesiones en órganos internos de los animales (Cuadro 1). En los ganglios linfáticos inclusive se pudo observar una lesión extensiva con la presencia de gran cantidad de amastigotos (Fig. 4). Con relación a este hallazgo, formas evolutivas de *Leishmania* tipo mucocutáneo han sido encontradas en médula ósea de un paciente con leishmaniasis tegumentar difusa (Deane *et al.*, 1966) y en bazo e hígado de hamsters (Zeledón y Blanco, 1963; Blanco y Zeledón, 1965) bajo condiciones normales de infección experimental. Sin embargo no se informa en esos casos de lesiones visibles en tales órganos como sí sucede en nuestros estudios usando corticosteroides. No obtuvimos tales lesiones internas en los animales no tratados con la droga, lo que indica el probable papel de la misma en la inducción de leishmaniasis ganglionar.

Aunque no se pueden extrapolar directamente estos resultados experimentales al modelo humano, resulta conveniente tener en cuenta que al igual que en otras parasitosis, los corticosteroides podrían exacerbar una leishmaniasis cutánea. Además ya ha sido informado en Costa Rica de un caso de leishmaniasis cutánea diseminada aparentemente debida a la administración de corticosteroides (Ary, Zeledón e Hidalgo, 1964). Por otra parte se ha mencionado el papel de la temperatura como factor limitante en la localización de la leishmania en el hombre. Los datos obtenidos aquí nos inducen a pensar en factores de tipo inmunológico como participantes en tal limitación, ya que por medio de un efecto inmunosupresor se pudo obtener lesiones internas en donde la temperatura corporal es más alta que en

Fig. 1. Peso de hamsters inoculados con dos cepas de *Leishmania* y tratados con acetato de cortisona.

- a. *L. braziliensis*: hamsters no inoculados previamente con antígeno.
  - b. *L. braziliensis*: hamsters inoculados con antígeno.
  - c. *L. mexicana*: hamsters no inoculados previamente con antígeno.
  - d. *L. mexicana*: hamsters inoculados con antígeno.
- t.i.: tratamiento inicial con acetato de cortisona.



Inoculación previa con antígeno de *Leishmania* en b y d.



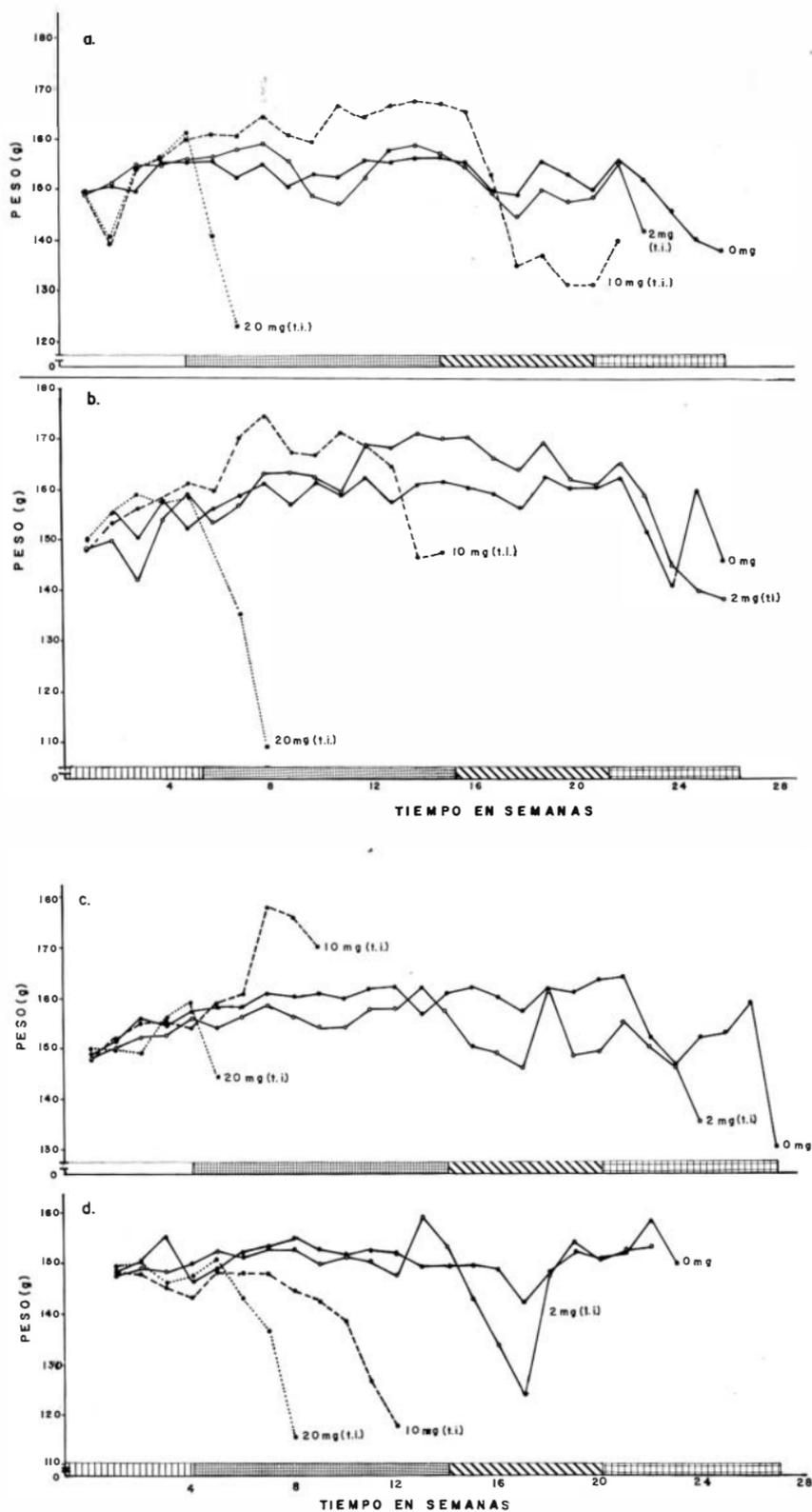
Tratamiento con la dosis inicial de cortisona.



Descanso.



Tratamiento con 10 mg semanales de acetato de cortisona en todos los grupos.



la piel. Podríamos pensar así en factores fisiológicos diferentes a la par de la temperatura como elementos limitantes de la ubicación de este parásito en el organismo.

Packanian (1979) igualmente pone en duda la importancia de la temperatura como causa única en la predilección cutánea de la *Leishmania*, ya que él obtuvo lesiones en órganos internos de ratones carentes de pelambre. Por ser estos animales inmunológicamente pobres ya que no poseen timo, una correlación puede establecerse entre los hallazgos de Packanian y los nuestros, pues en ambos casos los animales que presentaron lesiones leishmaniásicas internas eran inmunológica y quizá fisiológicamente deficientes.

### AGRADECIMIENTOS

Los autores desean agradecer la excelente labor de soporte prestada por Aleida Quirós en secretaría y Fabio Camacho en el cuidado de los animales.

### RESUMEN

Grupos de hamsters normales o inoculados previamente con un antígeno muerto de *Leishmania* fueron tratados semanalmente con 2, 10 ó 20 mg de acetato de cortisona por 100 gr de peso corporal y luego infectados con *Leishmania mexicana* o con *L. braziliensis*. Dosis de 10 y 20 mg de cortisona indicaron ser inadecuadas en este tipo de experimento ya que los animales murieron de infecciones bacterianas secundarias antes de desarrollar la leishmaniasis. La evolución de las lesiones fue más marcada en animales tratados con acetato de cortisona e inoculados con *L. mexicana*. Al mismo tiempo esta cepa produjo lesiones en ganglios linfáticos de los animales inmunosupresos lo cual no sucedió con *L. braziliensis*. No existió diferencia alguna entre los resultados obtenidos para los animales inoculados previamente con un antígeno de *Leishmania* y los no inoculados probablemente debido a que la inmunización fue de tipo pasivo a base de antígeno muerto.

### REFERENCIAS

- Ary, R., R. Zeledón, & W. Hidalgo  
1964. Un caso de leishmaniasis verrucosa diseminada por probable intervención de corticoides curado con Glucantime. Acta Méd. Cost., 7: 105-111.
- Blanco, E., & R. Zeledón  
1965. Cultivo de bazo e hígado de hamsters inoculados con *L. braziliensis* por vía subcutánea. Ier. Cong. Centroam. Microbiol. San José, Costa Rica.
- Convit, J., M.E. Pinardi, & J. Rondon  
1972. Diffuse cutaneous leishmaniasis: a disease due to an immunological defect of the host. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., 60: 526-532.

---

Fig. 2. Sobrevivencia de hamsters inoculados y no inoculados previamente con antígeno muerto e infectados con 2 cepas de *Leishmania* y tratados con acetato de cortisona. Las líneas en el centro de las barras indican la desviación estándar.

Convit, J., & M.E. Pinardi

1974. Cutaneous leishmaniasis. The clinical and immunopathological spectrum in South America, p. 159-169. *In* Trypanosomiasis and Leishmaniasis with special reference to Chagas' disease. Ciba Foundation Symposium 20. Assoc. Scient. Publ. New York.

Cox, F.E.G.

1978. Specific and nonspecific immunization against parasitic infections. *Nature*, 273: 623-626.

Deane, M., J. Chaves, J.W. Torrealba, & J.F. Torrealba

1966. Aislamiento de leishmanias de la médula ósea y de la sangre de una paciente con leishmaniasis tegumentar difusa. *Gac. Med. Caracas*, 74: 367-371.

Frenkel, J. K.

1960. Evaluation of infection-enhancing activity of modified corticoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103: 552-555.

Frenkel, J.K., & M.A. Havenhill

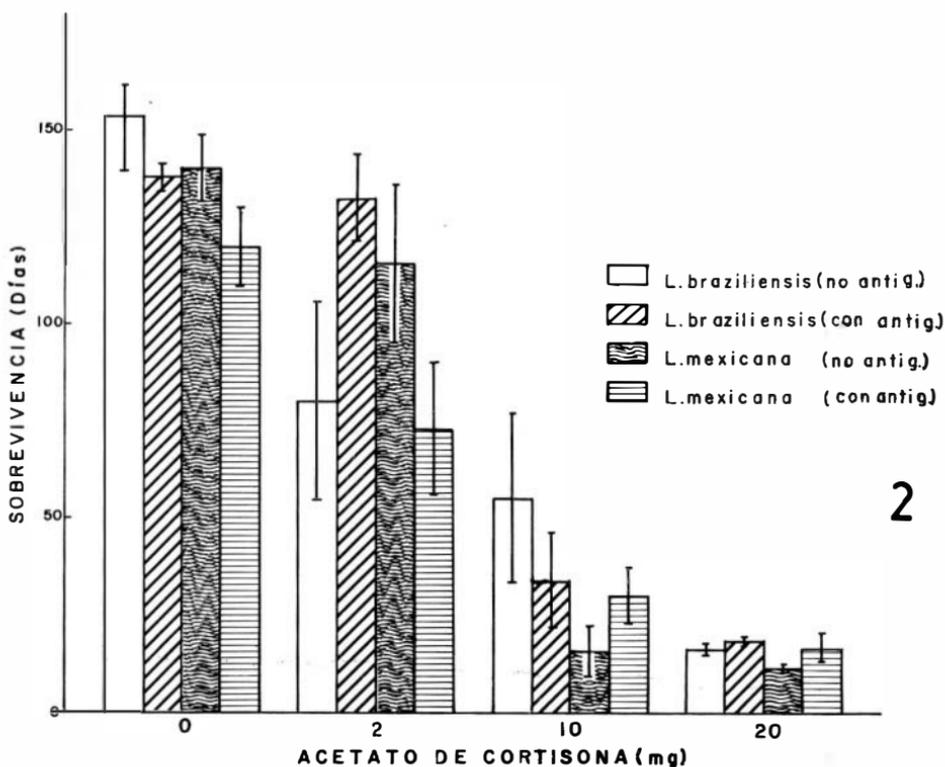
1963. The corticoid sensitivity of golden hamsters, rats, and mice. Effects of dose, time, and route of administration. *Lab. Invest.*, 12: 1204-1220.

Frenkel, J.K., & M.N. Lunde

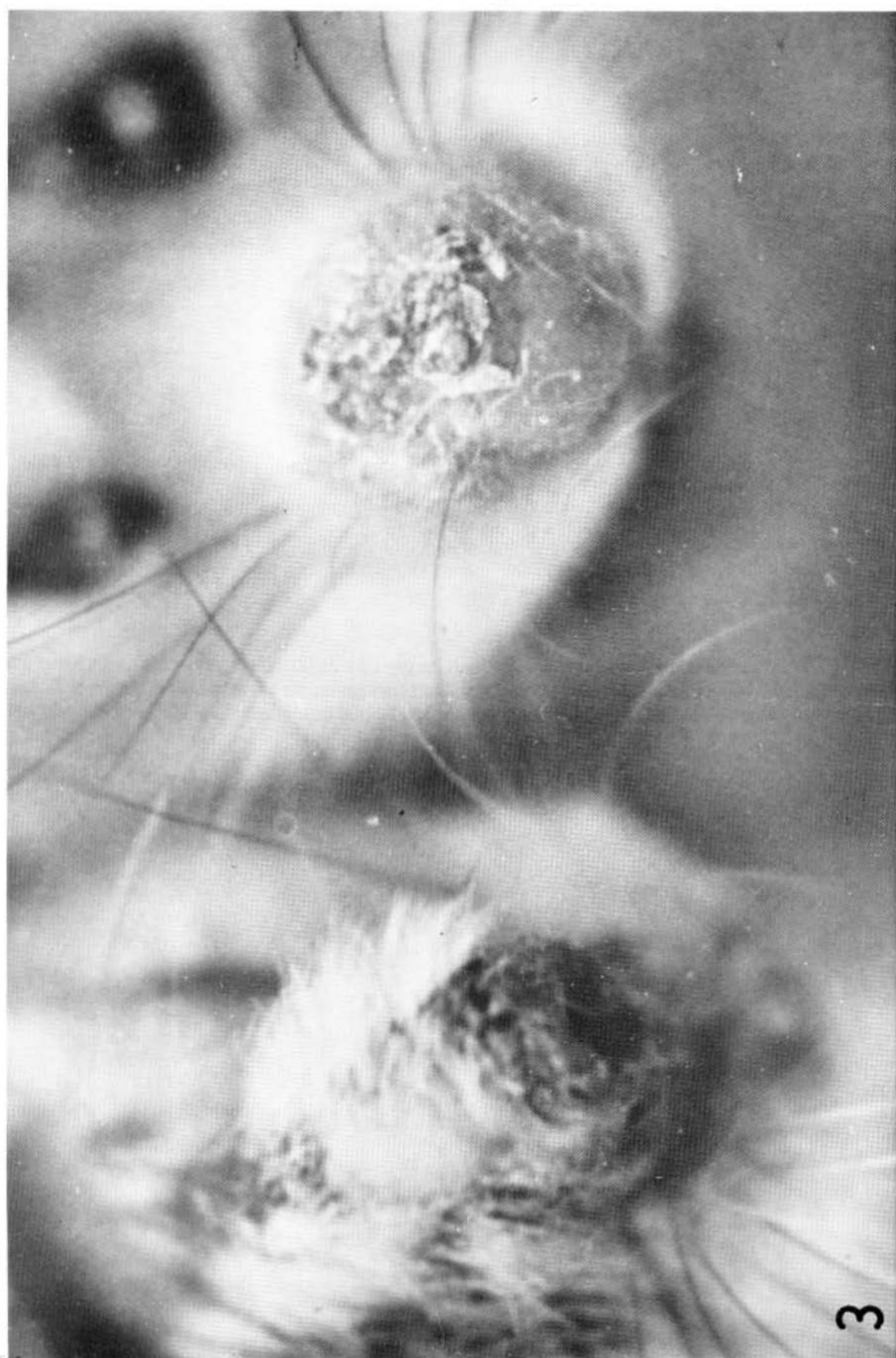
1966. Effects of corticosteroids on antibody and immunity in *Besnoitia* infection of hamsters. *J. Infect. Dis.*, 116: 414-424.

Frenkel, J.K., B. Nelson, & J. Arias-Stella

1975. Immunosuppression and Toxoplasmic encephalitis: clinical and experimental aspects. *Human Pathol.*, 6: 97-111.



- Henson, D., R.D. Smith, J. Gherke, & C. Neapolitan  
1967. Effect of cortisone on non-fatal mouse cytomegalovirus infection. *Amer. J. Pathol.*, 51: 1001-1011.
- Kass, E.H., & M. Finland  
1951. The role of adrenal steroids in infection and immunity. *New Engl. J. Med.*, 244: 464-470.
- Kass, E.H., & M. Finland  
1953. Adrenocortical hormones in infection and immunity. *Ann. Rev. Microbiol.*, 7: 361-388.
- Kass, E.H. & M. Finland  
1957. Adrenocortical hormones and the management of infection. *Ann. Rev. Med.*, 8: 1-18.
- Nakayama, I., & T. Aoki  
1972. Influence of cortisone on the treatment of acute toxoplasmosis in mice. *Jap. J. Parasitol.*, 21: 109-117.
- Packanian, A.  
1979. Experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania tropica* in albino hairless mice, *Mus musculus*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 73: 31-36.
- Pérez, H., N. Arredondo, & M. González  
1978. Comparative study of American cutaneous leishmaniasis and diffuse cutaneous leishmaniasis in two strains of inbred mice. *Immunology*, 22: 301-307.
- Preston, P.M., & D.C. Dumonde  
1976. Immunology of clinical and experimental leishmaniasis, p. 167-202. In S. Cohen and E.H. Sadun (eds). *Immunology of parasitic infections*. Blackwell Scientific Publications Oxford, England.
- Stahl, W., M. Matsubayashi, & S. Akao  
1966. Modification of subclinical toxoplasmosis in mice by cortisone 6-mercaptopurine and splenectomy. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.*, 15: 869-874.
- Zeledón, R., & E. Blanco  
1963. Infección experimental del hamster dorado con cepas costarricenses de *Leishmania braziliensis*. 7th. *Internat. Cong. Trop. Med. & Malaria*. Río de Janeiro.
- Zuckerman, A.  
1975. Current status of the immunology of blood and tissue protozoa. I. *Leishmania*. *Exp. Parasitol.*, 38: 370-400.



- Fig. 4. Presencia de amastigotos (flechas) en ganglio linfático de hamsters inoculados con *L. mexicana* y no tratados con 10 mg semanales de acetato de cortisona a.- Frotis por aposición. b.- Corte del ganglio teñido por la técnica de Gallego (1000 x).

