

**RESISTENCIA NATURAL E INMUNIDAD ADQUIRIDA A LA
INFECCION CON *TRYPANOSOMA CRUZI*. ESTUDIO EXPERIMENTAL
DEL EFECTO DE LOS CORTICOSTEROIDES EN RATONES C₃H***

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

Key Word Index: Trypanosomatidae, *Trypanosoma cruzi*, corticosteroids,
natural resistance, acquired immunity.

Resumen

Se hizo una comparación entre el proceso de infección producido por *T. Cruzi*, en animales tratados y no tratados con corticosteroides, con el fin de determinar el efecto inmunosupresor de la droga sobre la resistencia natural, y la inmunidad adquirida contra *T. cruzi*. Ratones C₃H inmunizados y no inmunizados con un antígeno muerto, fueron tratados con 2, 10 y 20 mg de acetato de cortisona por 25 gramos de peso corporal.

La inoculación a los ratones se hizo usando formas sanguíneas, o tripomastigotos obtenidos de cultivo.

La sobrevivencia de los ratones tratados con la droga fue menor, independientemente del tipo de inóculo y el grado de inmunidad de los animales. Además, las parasitemias, más acentuadas en los animales inmunosuprimidos, fueron también mayores en los animales no inmunizados. Igualmente, la diseminación del parásito fue más intensa en animales tratados con corticosteroides y además ligeramente más marcada en los ratones no inmunes. Se confirma una vez más el efecto exacerbante de la cortisona sobre infecciones con *T. cruzi*, y además se establece que el efecto inmunosupresor de la droga es más evidente en la resistencia natural, que en la inmunidad adquirida para este protozooario intracelular [Rev. Cost. Cienc. Méd. 1983, 4(Supl. 1):65—76].

Introducción

Los corticosteroides han sido usados por largo tiempo en medicina, debido a su gran poder antiinflamatorio, al cual se une su capacidad inmunosupresora (1), usualmente necesaria para el éxito de las operaciones de trasplantes. Por esta segunda razón, estos esteroides tienden a favorecer la exacerbación de las infecciones. Este efecto es muy marcado en la inmunidad celular, lo que hace aún más susceptible al animal (3), especialmente a las infecciones con organismos intracelulares (17). ya que actúan tanto sobre la resistencia natural como sobre la inmunidad adquirida (9, 10, 11). Los datos que se tienen sobre el efecto de los corticosteroides sobre infecciones con *Trypanosoma cruzi* son muy variados, según se trate de datos experimentales o no. Así, mientras Andrade y colaboradores (1) informan que el tratamiento de chagásicos con Nifurtimox y corticosteroides, tiene un efecto curativo mejor que con el Nifurtimox solamente, estudios experimentales demuestran que existe un efecto negativo de los corticosteroides, ya que su administración masiva exagera no sólo infecciones con *T. cruzi*, sino con algunas otras protozoosis intracelula-

* Presentado en el IV Congreso de Microbiología, Parasitología y Patología Clínica, San José, Costa Rica, 28 Nov. — 1º Dic. 1982.

** Centro de Investigación y Diagnóstico en Parasitología, Departamento de Parasitología, Facultad de Microbiología, Universidad de Costa Rica.

res tales como toxoplasmosis (5, 6, 12, 16) leishmaniasis (2), entre otras. Este estudio es una contribución al conocimiento del efecto que pueden tener los corticosteroides, sobre los mecanismos de defensa del huésped contra *T. cruzi*.

Material y Métodos

Animales: Para realizar este estudio se usaron ratones, hembras y machos (con un peso de 20 a 25 gramos) de la línea C₃H, los cuales fueron mantenidos en el laboratorio bajo un sistema *ad libitum* de alimentación.

Organismos e infección: Se usó una cepa de *T. cruzi* aislada por nosotros de un *Triatoma dimidiata* capturado en Barva de Heredia, Costa Rica. La cepa fue aislada originalmente por inoculación en ratones C₃H, luego cultivada *in vitro* en el medio de Rugai (15) y se ha mantenido simultáneamente en animales. La infección de los animales en los grupos experimentales fue llevada a cabo subcutáneamente con 10⁶ tripomastigotos de cultivo (no se toman en cuenta los epimastigotos, que fueron descartados al hacer el cómputo total y diferencial de formas de cultivo), o con 10⁶ formas sanguíneas, según el caso.

Preparación del antígeno e inmunización: Las formas de epimastigoto obtenidas de un cultivo de 16 días fueron lavadas 5 veces con solución salina al 0,85 por ciento por centrifugación a 700—800 g durante 10 minutos. Tales formas de cultivo fueron contadas con hemocitómetro y luego sometidas a 8 ciclos de congelación a —70°C y descongelación a 37°C. El antígeno que contenía 10⁷ formas por ml fue mantenido a —20° C hasta su uso, no más de 30 días después de su preparación.

Para la inmunización, los animales fueron inyectados subcutáneamente una vez por semana con 1 ml del antígeno durante 4 semanas. Después de un periodo de otras 2 semanas, los animales fueron inoculados con tripomastigotos de *T. cruzi*. Todos los sobrevivientes se consideraron inmunes para los fines de nuestros experimentos.

Tratamiento con acetato de cortisona: Se establecieron grupos de ratones inmunizados y no inmunizados. Cada grupo contenía 5 hembras y 5 machos. Un grupo fue tratado con 2 mg, otro con 10 y otro con 20 mg de cortisona (Sigma) por 25 g de peso corporal, por semana, por un período máximo de 90 días en aquellos que sobrevivieron al tratamiento. El tratamiento se inició 2 días antes de la infección, tiempo recomendado para que el efecto de la cortisona se manifieste mejor (Chinchilla y Frenkel, en preparación). Grupos de animales infectados pero no tratados fueron usados como testigos.

Evaluación de los resultados

a. Curvas de peso y sobrevivencia: Los animales fueron pesados semanalmente, calculando el peso promedio por ratón de cada grupo de hembras o de machos, con el fin de determinar cualquier variación entre sexos.

Para efecto de obtener un resultado general, también se calculó el promedio de peso de los 10 animales (hembras y machos de cada grupo).

Cada vez que moría un animal se anotaba el tiempo calculándose la sobrevivencia media total, o para cada sexo en cada grupo.

- b. Parasitemia:** Los ratones de todos los grupos fueron sangrados de la cola semanalmente en el mismo día; cuando la cantidad de tripomastigotos fue suficiente, se hizo cómputo en hemocitómetro indicándose los resultados como tripanosomas por mm³, determinándose el número máximo promedio encontrado en cada grupo de ratones.
- c. Estudio histopatológico:** Los órganos de los ratones moribundos o recientemente muertos fueron fijados en formol al 10 por ciento, pH 7,0, cortados y teñidos con hematoxilina y eosina y por la técnica de Gallego. Luego todos los órganos fueron estudiados por presencia de amastigotos de *T. cruzi*.

Resultados

No existieron diferencias considerables de acuerdo al sexo en las curvas de peso, sobrevivencia de los animales o disminución de la parasitosis debido a la cortisona. Por ello, los datos que se dan a continuación son el promedio obtenido en todos los animales de cada grupo. Los animales tratados con acetato de cortisona mostraron una disminución considerable de peso, la cual fue similar en animales no inmunizados e inmunizados. Esa disminución de peso tampoco varió de acuerdo al tipo de inóculo, ya que fue prácticamente igual en animales inoculados con formas de cultivo o con formas sanguíneas de *T. cruzi* (Figura 1). La sobrevivencia de los animales disminuyó proporcionalmente al aumento de la dosis de cortisona usada en el tratamiento, y la mayoría de animales tratados con 10 y 20 mg de cortisona por semana, murieron rápidamente, incluso antes de que se acentuara la infección con *T. cruzi* (Figura 2).

No hubo diferencias estadísticamente significativas en la sobrevivencia de los animales inmunizados y los no inmunizados, al tratárseles con acetato de cortisona y tampoco se apreciaron diferencias considerables en la sobrevivencia de animales inoculados con formas sanguíneas, o con tripomastigotos de cultivo (Figura 2).

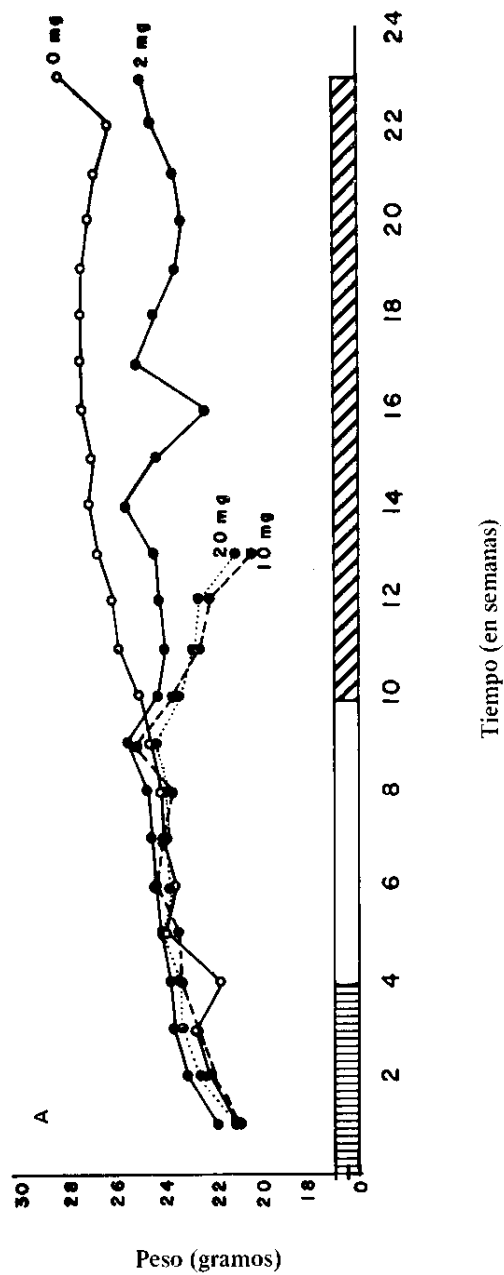
Con el objeto de determinar las variaciones de parasitemia en animales inmunes y no inmunes, debidas al efecto de la cortisona, se analizó el número máximo promedio de tripomastigotos encontrados en la sangre de los ratones inoculados.

De los datos obtenidos (Cuadro 1) se deduce que la parasitemia fue más elevada, cuanto más alta fue la dosis de cortisona. Además, se encontró un mayor número de tripomastigotos en los animales no inmunes que en los inmunes, independientemente de si en el inóculo se usó formas sanguíneas o formas de cultivo de *T. cruzi*.

Ya que la principal patología producida por este parásito se origina en su capacidad de invadir tejidos, determinamos, por estudio de cortes histológicos, los órganos invadidos por el parásito en cada caso.

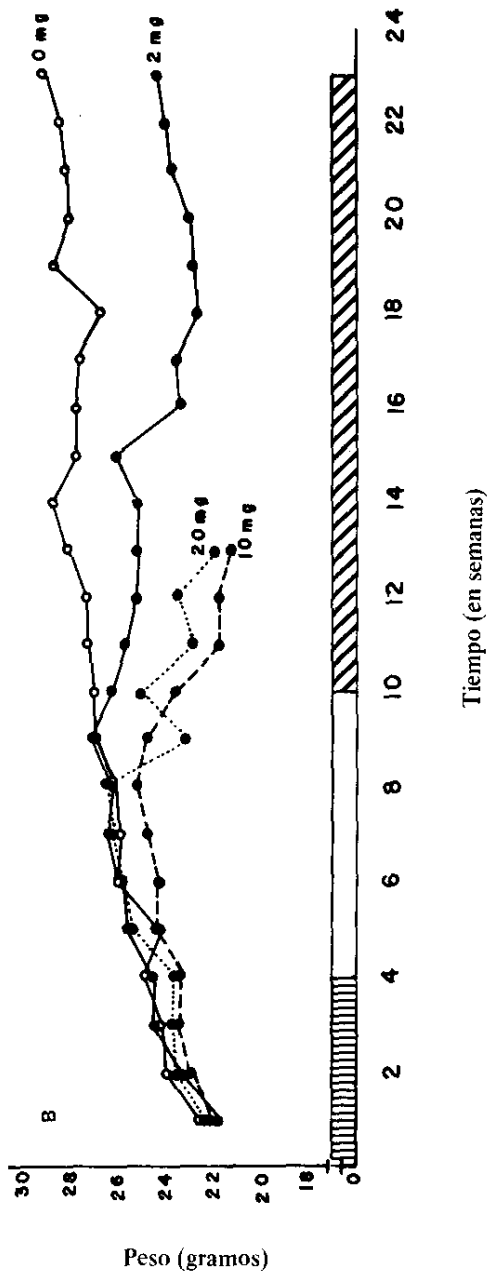
Para facilitar la interpretación de los resultados se analizó en cada grupo de estudio, el porcentaje de animales con diseminación a varios órganos además del miocardio. En el Cuadro 2 se ve que cuando a dosis de cortisona inyectada fue de 10 ó 20 mg, aumentó el porcentaje de animales en que el parásito invadió otros órganos diferentes del corazón. Además, se notó una tendencia de mayor invasión a órganos por las formas sanguíneas que por las formas de cultivo. Por otro lado, el número de órganos invadidos por el parásito en ratones inmunizados fue ligeramente menor que en aquellos no inmunizados.

FIGURA 1
 PESO DE RATONES C₃H INOCULADOS CON *TRYPANOSOMA CRUZI* Y
 TRATADOS CON ACETATO DE CORTISONA



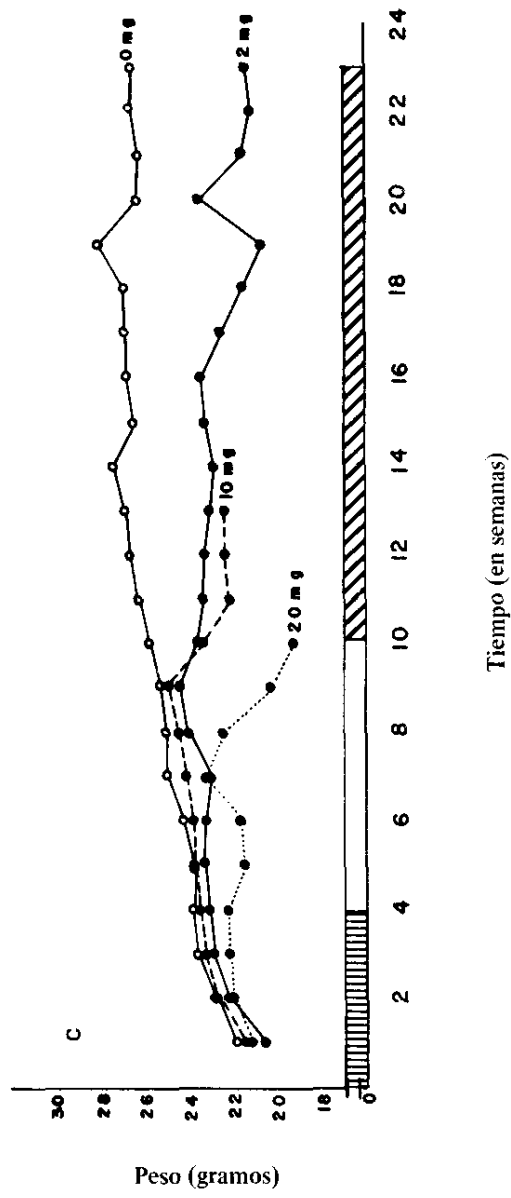
A. Inoculados con formas de cultivo, no inmunizados.

Continuación Figura 1



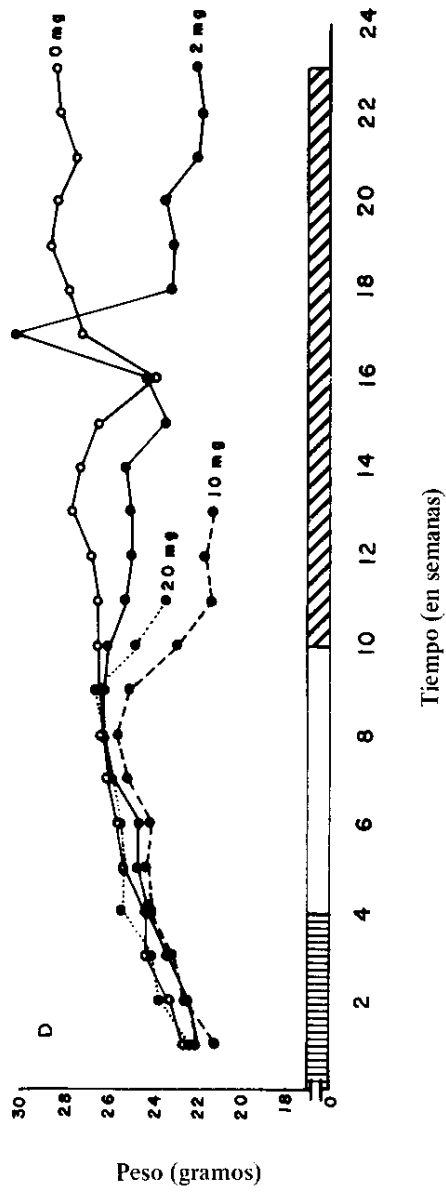
B. Inoculados con formas de cultivo, inmunizados.

Continuación Figura 1



C. Inoculados con formas sanguíneas, no inmunizados.

Continuación Figura 1

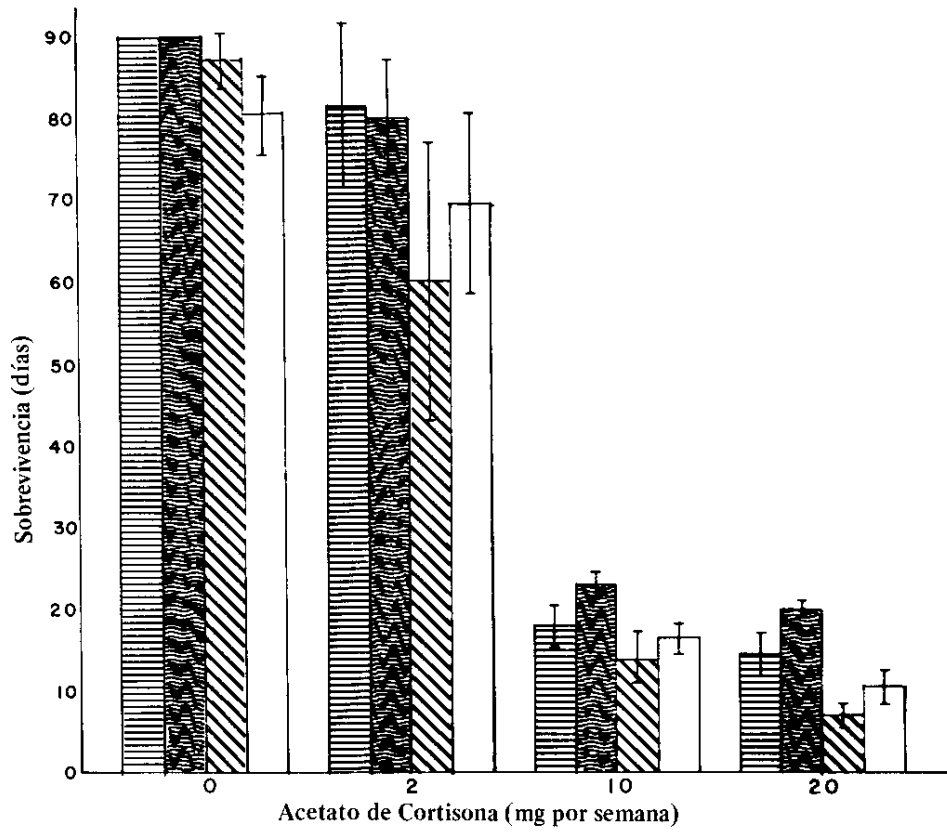


D. Inoculados con formas sanguíneas, inmunizados.

- ○ No tratados.
- ● Tratados con 2 mg de acetato de cortisona por 25 g de peso.
- ● 10 mg.
- ● 20 mg.
- ▨ Período de inmunización.
- ▨ Tratamiento con corticosteroide.

FIGURA 2

SOBREVIVENCIA DE RATONES C₃H INMUNIZADOS Y NO INMUNIZADOS, INOCULADOS CON *T. CRUZI* Y TRATADOS CON ACETATO DE CORTISONA



La línea en el centro de las barras indican la desviación estándar.



Inoculados con formas de cultivo. No inmunizados.



Inoculados con formas de cultivo. Inmunizados.



Inoculados con formas sanguíneas. No inmunizados.



Inoculados con formas sanguíneas. Inmunizados.

Discusión

En estudios previos (no publicados) habíamos observado que el tratamiento con cortisona producía una elevada parasitemia en animales inoculados con *T. cruzi*. En la presente investigación, donde se mantuvieron condiciones cuidadosamente controladas, fue demostrado nuevamente. Este aumento en el número de organismos intracelulares se ha observado en otros parásitos tales como *Toxoplasma gondii* (5, 6, 8, 12, 16) *Besnoitia jellisoni* (7), y *Leishmania* del tipo mucocutáneo (2). En este trabajo, se trató de establecer el efecto de los corticosteroides sobre infecciones con *T. cruzi*, un parásito en que la inmunidad celular es muy marcada (13, 14), y si tal efecto era diferente para animales inmunizados y no inmunizados. Además, el uso de diferentes dosis de la droga se hizo con el objeto de contar con una gama más amplia de efectos sobre los animales inoculados. El efecto del acetato de cortisona se reflejó en una pérdida de peso mayor en los animales tratados, cuanto más alta era la concentración del corticosteroide (Figura 1).

Sin embargo, tales resultados fueron muy similares tanto en animales inmunizados como en los no inmunizados e independientemente de las formas evolutivas infectantes con que fueron inoculados. En cuanto a sobrevivencia de los ratones, tampoco se notaron diferencias entre animales inmunizados y no inmunizados. Este hecho podría explicarse, en parte, debido a que el proceso de inmunización se hizo con antígeno muerto, el cual parece no inducir adecuadamente la respuesta inmunológica, especialmente en parasitosis intracelulares (4). Sin embargo, al estudiar las parasitemias observadas en todos los grupos (Cuadro 1), se pudo comprobar que en los animales previamente inmunizados, las

CUADRO 1
PARASITEMIA EN RATONES TRATADOS O NO CON CORTISONA

INOCULO	FORMAS DE CULTIVO				FORMAS SANGUINEAS			
	0	2*	10	20	0	2	10	20
Dosis de cortisona	0	2*	10	20	0	2	10	20
Animales no inmunizados	NC	NC	8.100**	47.150	NC	100	8.950	muerte
Animales inmunizados	NC	NC	450	28.083	NC	NC	175	575

* Dosis semanales de acetato de cortisona en mg por 25 g de peso.

** Tripomastigotos mm³. Número más alto promedio de 10 ratones estudiados.

NC = No se hizo cómputo por bajo número de organismos.

parasitemias fueron considerablemente menores que en los animales no inmunes, independientemente de las formas del parásito inyectadas. Esto indica que, aún cuando la cortisona puede influir en que una infección crónica por *T. cruzi* se transforme en una de tipo

agudo, tal como sucede en otros organismos intracelulares, su efecto es menor sobre la inmunidad adquirida que sobre la resistencia natural, como se ha probado en otras parasitosis (6, 7, 8, 16). Los resultados obtenidos fueron semejantes cuando se inocularon formas de tripomastigotos sanguíneos que cuando el inóculo provenía de cultivos. Esto es explicable ya que el porcentaje de formas de tripomastigotos presentes en el inóculo de cultivo fue tal que proporcionalmente correspondió al número de tripanosomas sanguíneos inoculados; además, los cultivos eran de reciente aislamiento, evitando así cualquier pérdida de virulencia. En cuanto a la diseminación del parásito debido al efecto de la droga inmunosupresora, pudimos observar que la presencia de amastigotos de *T. cruzi* en miocardio y otros órganos fue más evidente en los animales tratados con la droga (Cuadro 2). El porcentaje de animales en los que se diseminó el parásito fue ligeramente más alto

CUADRO 2
PORCENTAJE DE ANIMALES CON AMASTIGOTOS
EN MIOCARDIO Y OTROS ORGANOS

INOCULO	FORMAS DE CULTIVO				FORMAS SANGUINEAS			
Dosis de cortisona	0	2*	10	20	0	2	10	20
Animales no inmunizados	0	12,5	83,3	83,3	0	57,1	100,0	100,0
Animales inmunizados	0	12,5	75,0	75,0	0	25,0	85,7	90,0

* Dosis semanales de acetato de cortisona en mg por 25 g de peso.

en animales no inmunizados. Se debe comprender que las formas de amastigotos estarían en varios órganos, encontrándose esos parásitos tanto en animales no inmunes, como inmunes. Puesto que la inmunidad, en este caso, se manifiesta por la presencia de parásitos en algunos órganos en forma latente, siempre existirán organismos en los animales inmunes; así, al aplicar la droga inmunosupresora, los parásitos se desarrollan en forma similar. Sin embargo, es posible que también influyera en esta similitud de resultados en animales inmunes y no inmunes, el hecho de que la inmunización fue hecha con antígeno muerto.

Queda demostrado que el acetato de cortisona hace que se exacerbe una infección con *T. cruzi*, disminuyendo la resistencia natural más notoriamente que la inmunidad adquirida, con lo que se provoca en ambos casos diseminación muy marcada del parásito.

Este hecho, experimentalmente observado, nos debe hacer meditar sobre el peligro de la aplicación de corticosteroides indiscriminadamente. Como ya hemos demostrado experimentalmente (2) es posible también inducir lesiones internas con *Leishmania* del tipo mucocutáneo, por medio del tratamiento de hamsters con acetato de cortisona. Dado que estos dos protozoarios intracelulares son de gran importancia en la patología de Centro y Sudamérica, y el tratamiento con corticosteroides está muy generalizado, nos parece conveniente divulgar los datos experimentales anteriormente expuestos.

Agradecimientos

Este trabajo fue realizado en parte con fondos de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica (Proyecto No. 02-97-05-61) y el Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT).

Los autores desean agradecer la labor secretarial de las Sras. Aleida Quirós y Zayda Umaña además al Sr. Fabio Camacho en el cuidado de los animales.

ABSTRACT

The pathology produced by T. cruzi was studied in cortisone-treated and non-treated C₃H mice. In order to determine the immunosuppressive effect of the drug against natural resistance and acquired immunity, immune and non-immune animals were treated with 2, 10 and 20 mg of cortisone acetate per 25 g of body weight, per week.

Tripomastigote forms from an infected mouse or from laboratory cultures were used as inoculae.

Mice treated with the drug showed a shorter survival time as compared with controls. However, there was an increase in the number of organisms in the immunosuppressed animals, especially in non-immune and cortisone treated mice. It has been shown again that corticosteroids exacerbate T. cruzi infections, and we also demonstrate that the immunosuppressive effect is more evident against natural resistance than to acquired immunity in these intracellular organisms.

Bibliografía

1. Andrade, S. G., Andrade, Z.A., Sadigurski, M. Tratamiento combinado da doença de Chagas experimental em caes com Nifurtimox e corticoide. Correlações electrocardiográficas e histopatológicas. V Congreso Latinoamericano de Parasitología. Libro de resúmenes. 1979; 372.
2. Chinchilla, M., Guerrero, O. M., Portilla, E. Efecto de los corticoesteroides en la leishmaniasis cutáneo mucosa. Estudio experimental. *Rev. Biol. Trop.* 1980; 28:109—119.
3. Claman, H. N. Corticosteroids and lymphoid cells. *New Eng. J. Med.* 1972; 287:388-397.
4. Cox, F. E. G. Specific and non-specific immunization against parasitic infections. *Nature* 1978; 273:623-626.
5. Frenkel, J.K. Evaluation of infection-enhancing activity of modified corticoids. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 1960; 103:552-555.
6. Frenkel, J.K., Elwell, M., Chinchilla, M. Effect of cortisone on immune responses of mice, hamsters and guinea pigs to *Toxoplasma gondii*. *Fed. Proc.* 1979; 38:3.
7. Frenkel, J. K., Lunde, M. N. Effect of corticosteroids on antibody and immunity in *Besnoitia* infection of hamsters. *J. Infect. Dis.* 1966; 116:414—424.
8. Frenkel, J. K., Nelson, B., Arias-Stella, J. Immunosuppression and toxoplasmic encephalitis: clinical and experimental aspects. *Human Pathol.* 1975; 6:97—111.
9. Kass, E. H., Finland, M. The role of adrenal steroids in infection and immunity. *New Eng. J. Med.* 1951; 244:464—470.
10. Kass, E. H. Finland, M. Adrenocortical hormones in infection and immunity. *Ann. Rev. Microbiol.* 1953; 7:361—388.
11. Kass, E. H. Finland, M. Adrenocortical hormones and the management of infection. *Ann. Rev. Med.* 1957; 8:1—18.

12. Nakayama, I., Aoki, T. Influence of cortisone on the treatment of acute toxoplasmosis in mice. *Jap J. Parasitol.* 1972; 21:109—117.
13. Pizzi, T. Inmunología de la enfermedad de Chagas: estado actual del problema. *Bol. Of. Sanit. Panam.* 1961;51:450—464.
14. Pizzi, T., Rubio, M., Knierim, F. Inmunología de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasitol.* 1954; 9:35—47.
15. Rugai, E. Cultura das leishmanias. *Rev. Inst. Adolfo Lutz* 1941; 1:153—159.
16. Stahl, E., Matsubayashi, M., Akao, S. Modification of subclinical toxoplasmosis in mice by cortisone, 6—mercaptapurine and splenectomy. *Am. J. Trop. Hgy.* 1966; 15:869— 874.
17. Zurier, R. B., Weissmann, G. Anti-immunologic and antiinflamatory effects of steroid therapy. *Med. Clin. North American.* 1973; 57:1295—1307.