

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE FARMACIA  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



MODELO EXPERIMENTAL DE *Trichomonas vaginalis*:  
ESTUDIOS DE QUIMIOSENSIBILIDAD, PATOGENIA E  
INMUNOMODULACIÓN

Ponente: Sr. Dr. \_\_\_\_\_

TRIBUNAL

Presidente: Sr. Dr. Alcanda  
Vocal: Sr. Dra. Rodriguez Cabeiro  
Vocal: Sr. Dra. Osboa  
Vocal: Sr. Dra. del Aguila  
Secretario: Sr. Dr. Escario

TESIS DOCTORAL

JUAN JOSÉ NOGAL RUIZ  
MADRID, 1999

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**  
**FACULTAD DE FARMACIA**  
**DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA**



**MODELO EXPERIMENTAL DE *Trichomonas vaginalis*:**  
**ESTUDIOS DE QUIMIOSENSIBILIDAD, PATOGENIA E**  
**INMUNOMODULACIÓN**

Memoria presentada por D. Juan José Nogal Ruiz con el fin de optar al grado de  
Doctor en Farmacia por la Universidad Complutense de Madrid

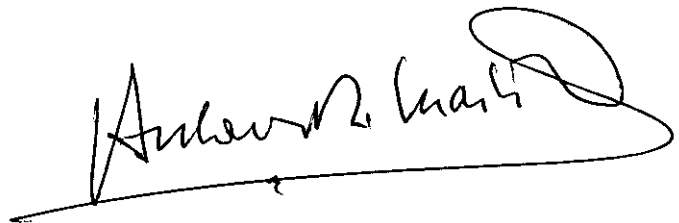
Directores: Dra. D<sup>a</sup>. Alicia Gómez Barrio y Dr. D. Antonio R. Martínez Fernández

MADRID, 1999

ANTONIO R. MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, CATEDRÁTICO Y DIRECTOR DEL  
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA DE LA FACULTAD DE FARMACIA  
DE LA UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

CERTIFICA: Que el licenciado en Ciencias Biológicas, D. Juan José Nogal Ruiz, ha realizado en este Departamento y bajo la dirección conjunta de la Dra. Alicia Gómez Barrio y del que suscribe, la presente Memoria titulada: “Modelo experimental de *T. vaginalis*: Estudios de quimiosensibilidad, patogenia e inmunomodulación”, con el fin de optar al grado de Doctor en Farmacia

Y para que así conste, expido y firmo el presente certificado en Madrid, a 4 de Octubre de 1999.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Antonio R. Martínez', with a long horizontal flourish extending to the right.

Este trabajo ha sido ha sido financiado por los laboratorios A.S.A.C.  
*Pharmaceutical International, A.I.E.*

## AGRADECIMIENTOS

*Pues ésta es la verdad: He salido de la casa de los doctores y además he dado un portazo a mis espaldas. Durante demasiado tiempo mi alma estuvo sentada y hambrienta a su mesa; pero yo no estoy adiestrado al conocer como ellos, que lo consideran un romper nueces...*

*Ellos están sentados, fríos en la sombra. En todo quieren ser únicamente espectadores, y se guardan de sentarse allí donde el sol abrasa los escalones...*

*Cuando se las dan de sabios, sus pequeñas sentencias y verdades me hacen tiritar de frío. En su sabiduría hay a menudo un olor como si procediese de la ciénaga; y, en verdad, ¡yo he oído croar en ella a la rana!*

*Son hábiles en inventar astucias pequeñas, aguardan a aquellos cuya ciencia anda con pies tullidos, aguardan igual que arañas.*

*F. Nietzsche*

Quisiera que las primeras líneas de esta Tesis Doctoral sirvan para subrayar la responsabilidad que precisa una buena formación investigadora y, en consecuencia, manifestar mi más sincero agradecimiento:

Al Prof. D. Antonio R. Martínez Fernández, Director del Departamento de Parasitología de la Facultad de Farmacia U.C.M., por su contribución decisiva en mi formación científica y cuya dirección, confianza y estímulo han permitido la realización de esta Memoria.

A la Prof<sup>a</sup>. D<sup>a</sup>. Alicia Gómez Barrio, co-directora de esta Tesis, por su dirección inteligente, disponibilidad, apoyo constante y comprensión.

Al Prof. D. José Antonio Escario G<sup>a</sup>-Trevijano, que me inició en el modelo de *Trichomonas vaginalis*, por haberme inculcado la ilusión por la investigación. Por todos los buenos, buenísimos momentos, compartidos.

A la Prof<sup>a</sup> D<sup>a</sup>. Mercedes Martínez Grueiro, por su categoría humana y profesional. Por su amistad, ánimo, y capacidad para escucharme siempre.

A los profesores D<sup>a</sup>. Carmen Cuéllar del Hoyo y D. Francisco Bolás Fernández por sus acertadas orientaciones para la realización de las experiencias de inmunomodulación y su inquebrantable paciencia conmigo.

A los demás profesores de Parasitología: D<sup>a</sup>. Carmen Cuesta Bandera, D<sup>a</sup> Catalina Castaño Fernández, D. Luis M. Zapatero Ramos, D. José Luis Guillén Llera, D. Ángel Sánchez-Covisa Villa, quienes han contribuido tanto en mi formación académica como humana. Por su interés en mi quehacer y valiosas indicaciones.

A los Dres. M<sup>a</sup> Jesús Perteguer Prieto, Francisco Ponce Gordo y Rafael A. Martínez Díaz, por su amistad y estímulo que han resultado vitales para seguir adelante. Por compartir esta Tesis y tantas pequeñas cosas...

A mis compañeras de equipo, Pilar Perteguer Prieto, Natalia Ruiz Maroselli, Ester Rodríguez Gallego, Gloria Amigo Angulo y Berta Villegas Fontela por su ayuda incondicional en diferentes fases del trabajo experimental. Y en especial a Susana Muelas Serrano, Juan J. García Rodríguez y Raúl Rodríguez Bueno por sus apreciables sugerencias, así como por su apoyo en esta última y siempre difícil etapa de elaboración de la Memoria.

A todos y cada uno de mis compañeros en el Departamento de Parasitología por las experiencias, proyectos, sueños e ilusiones que hemos vivido juntos.

A D<sup>a</sup>. Piedad Arroyo Pardo, D<sup>a</sup>. Inés Municio Serrano y D. Francisco Javier Hernández García, porque siempre pude contar con su colaboración cuando los necesite.

Finalmente también quiero destacar a las siguientes personas e instituciones ajenas a la Facultad de Farmacia:

A la Dra. D<sup>a</sup>. Carmen Ochoa de Ocáriz Herrero de la sección de Quimioterapia del Instituto de Química Médica del C.S.I.C., por su perseverancia en la síntesis de compuestos químicos y su confianza en nuestros ensayos de quimioterapia experimental antiprotozoósica.

Al Dr. D. Fernando Setién Baranda del Centro de Técnicas Inmunológicas de la Facultad de Medicina U.C.M., por su contribución en los ensayos para la determinación de citocinas.

Al Prof. D. Agustín G. Zapata González, Director del Depto. de Biología Celular de la Facultad de CC. Biológicas U.C.M., por sus orientaciones en los estudios histopatológicos e inmunológicos del modelo experimental de *T. vaginalis*.

A la empresa farmacéutica A.S.A.C. *Pharmaceutical International* A.I.E.

**A TODOS, DE CORAZÓN, MUCHAS GRACIAS**

**A mi familia por haberme permitido  
crecer en la fe y el conocimiento,  
por su comprensión y amor.**

# **ÍNDICE**

---



## ÍNDICE

<b>1.</b>	<b>INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS</b> .....	1
<b>2.</b>	<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA</b> .....	7
2.1.	TAXONOMÍA Y EVOLUCIÓN .....	9
2.2.	MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA .....	12
2.3.	MANIFESTACIONES CLÍNICAS .....	19
2.4.	MECANISMOS IMPLICADOS EN LA PATOGENIA .....	23
2.5.	EPIDEMIOLOGÍA DE LA TRICOMONOSIS .....	26
2.5.1.	Método de transmisión .....	28
2.5.2.	Factores relacionados con la supervivencia del parásito .....	30
2.5.3.	Factores relacionados con la prevalencia de la enfermedad .....	31
2.5.4.	Prevalencia de la tricomonosis en la mujer .....	33
2.6.	TRATAMIENTO DE LA TRICOMONOSIS .....	41
2.6.1.	Estructura y propiedades físico-químicas de metronidazol .....	41
2.6.2.	Espectro anti-infeccioso .....	42
2.6.3.	Uso farmacológico .....	42
2.6.4.	Mecanismo de actuación de los 5-nitroimidazoles .....	43
2.7.	CRIBADO FARMACOLÓGICO <i>IN VITRO</i> FRENTE A <i>T. vaginalis</i> ..	44
2.7.1.	Cribado farmacológico de productos de síntesis .....	44
2.7.2.	Contribución de los extractos vegetales en el desarrollo farmacológico de antiprotozoósicos .....	47
2.8.	MODELOS MURINOS DE PATOGENIA EXPERIMENTAL DE <i>T. vaginalis</i> .....	49
2.8.1.	Infecciones vaginales. ....	50
2.8.2.	Infecciones ectópicas. ....	54
2.8.2.1.	Infecciones intraperitoneales .....	55
2.8.2.1.1.	Evolución y manifestaciones patológicas. ....	56
2.8.2.1.2.	Ensayos intraperitoneales de patogenia en ratón. ....	60

2.8.2.2. Infecciones subcutáneas. ....	63
2.8.2.2.1. Evolución y manifestaciones patológicas ....	66
2.8.2.2.2. Estudios histopatológicos. ....	66
2.8.2.2.3. Ensayos subcutáneos de patogenia en ratón. ....	67
2.8.2.3. Infecciones intramusculares. ....	68
2.8.3. Correlación entre patogenia experimental y clínica. ....	69
2.9. INMUNOPARASITOLOGÍA. ....	72
2.9.1. La respuesta inmunológica frente a parásitos ....	73
2.9.1.1. Papel de los linfocitos T y las citocinas ....	73
2.9.1.2. La respuesta inmunitaria frente a protozoos ....	75
2.9.1.2.1. La activación de los linfocitos T cooperadores (Th) ....	76
2.9.1.2.2. La activación de los linfocitos T citotóxicos ....	79
2.9.1.2.3. La activación de los linfocitos B ....	80
2.9.1.3. Aspectos inmunológicos de la tricomonosis	
humana y experimental ....	80
2.9.1.3.1. Mecanismos de defensa inmunitaria no específica	
frente a <i>T. vaginalis</i> ....	80
2.9.1.3.2. Mecanismos de defensa inmunitaria específica	
frente a <i>T. vaginalis</i> ....	84
2.9.2. Inmunomodulación. ....	89
2.9.2.1. Inmunosupresión. ....	92
2.9.2.2.1. AINEs como inmunomoduladores ....	98
2.9.2.2.2. Otros fármacos inmunomoduladores: SAME ....	102
2.10. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES. ...	103
2.10.1. PAL (Extracto de <i>Polypodium leucotomos</i> ). ....	103
2.10.2. CTP. ....	113
<b>3. MATERIAL Y MÉTODOS</b> ....	<b>117</b>
3.1. MATERIAL ....	119
3.1.1. Material de laboratorio. ....	119
3.1.2. Material biológico. ....	120

3.1.2.1. <i>T. vaginalis</i> . . . . .	120
3.1.2.2. Animal de experimentación: El ratón ( <i>Mus musculus</i> , L.). . .	121
3.1.3. Medio de cultivo. . . . .	123
3.1.3.1. Medio Diamond. . . . .	123
3.1.4. Productos ensayados. . . . .	124
3.1.4.1. Extractos vegetales. . . . .	124
3.1.4.2. Productos de síntesis. . . . .	126
3.1.4.3. Farmacología experimental. . . . .	131
3.1.5. Reactivos y soluciones generales. . . . .	131
3.2. MÉTODOS. . . . .	134
3.2.1. Cribado farmacológico <i>in vitro</i> . . . . .	134
3.2.2. Modelo murino de inoculación intraperitoneal de <i>T. vaginalis</i> . . . .	137
3.2.2.1. Preparación del inóculo. . . . .	137
3.2.2.2. Pauta de inoculación. . . . .	137
3.2.2.3. Necropsia y valoración de las lesiones. . . . .	138
3.2.3. Cribado farmacológico <i>in vivo</i> . . . . .	143
3.2.4. Determinación de la patogenia de aislamientos autóctonos. . . . .	143
3.2.5. Aplicaciones del modelo experimental de <i>T. vaginalis</i> para la elucidación de la potencial actividad inmunomoduladores de los extractos PAL y CTP. . . . .	144
3.2.6. Ensayo inmunoenzimático (ELISA). . . . .	145
3.2.6.1. Infección experimental y obtención de sueros. . . . .	145
3.2.6.2. Preparación de antígenos. . . . .	146
3.2.6.3. Determinación de anticuerpos: IgG+IgM, IgG, IgG1, IgG2a, IgG2b y IgG3. . . . .	146
3.2.6.4. Determinación de citocinas: IFN- $\gamma$ e IL-4. . . . .	147
3.2.7. Análisis estadístico. . . . .	149
<b>4. EXPERIENCIAS Y RESULTADOS . . . . .</b>	<b>155</b>
4.1. CRIBADO FARMACOLÓGICO <i>IN VITRO</i> . . . . .	157
4.1.1. Dinámica de crecimiento de <i>T. vaginalis</i> en cultivo. . . . .	157

4.1.2.	Cribado farmacológico <i>in vitro</i> de productos de síntesis. . . . .	158
4.1.3.	Cribado farmacológico <i>in vitro</i> de productos naturales frente a <i>T. vaginalis</i> . . . . .	167
4.2.	MODELO MURINO DE PATOGENIA EXPERIMENTAL INTRAPERITONEAL DE <i>T. vaginalis</i> . . . . .	182
4.2.1.	Selección de la estirpe murina y duración de la infección. . . . .	184
4.2.1.1.	Susceptibilidad de ratones NMRI. . . . .	185
4.2.1.2.	Susceptibilidad de ratones CD-1. . . . .	187
4.2.1.3.	Susceptibilidad de ratones C57BL/10J. . . . .	189
4.2.1.4.	Susceptibilidad de ratones BALB/c. . . . .	191
4.2.1.5.	Análisis estadístico. . . . .	194
4.2.2.	Selección del inóculo más favorable para la infección intraperitoneal. . . . .	196
4.2.2.1.	Análisis estadístico. . . . .	201
4.2.3.	Ilustraciones. . . . .	202
4.3.	CRIBADO FARMACOLÓGICO <i>IN VIVO</i> . . . . .	209
4.4.	PATOGENIA EXPERIMENTAL DE AISLAMIENTOS AUTÓCTONOS DE <i>T. vaginalis</i> EN EL MODELO MURINO. . . . .	220
4.5.	INMUNOMODULACIÓN POR EXTRACTOS VEGETALES DE LA RESPUESTA A LA INFECCIÓN INTRAPERITONEAL CON <i>T. vaginalis</i> . . . . .	231
4.5.1.	Valoración de la necropsia. . . . .	231
4.5.1.1.	Efecto inmunomodulador del extracto de <i>P. leucotomos</i> . . . . .	231
4.5.1.1.1.	Selección de la dosis. . . . .	231
4.5.1.2.	Eficacia comparada del extracto PAL con inmunomoduladores de referencia. . . . .	239
4.5.1.2.1.	Inmunosupresores: ciclofosfamida, azatioprina y tacrólimo (FK-506). . . . .	239
4.5.1.2.2.	Inmunoestimulante: glicofosfopeptical, timoestimulina. . . . .	246
4.5.1.2.3.	Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs): piroxicam, metamizol. . . . .	253

4.5.1.2.4. Otros:	
DIFUR, S-Amet y saponinas de <i>Quillaja saponaria</i> . . . .	261
4.5.2. Efecto inmunomodulador del extracto CTP. . . . .	271
4.5.3. Evaluación serológica del tipo de respuesta inmunitaria frente a <i>T. vaginalis</i> en el modelo murino de infección intra-peritoneal. . . . .	279
4.5.3.1. Determinación sérica mediante ELISA indirecto de las subclases de inmunoglobulina G (IgG) inducidas en el modelo de inmunomodulación de <i>T. vaginalis</i> . . . . .	279
4.5.3.2. Determinación sérica mediante ELISA indirecto de las citocinas interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucina (IL-4).. .	282
<b>5. DISCUSIÓN</b> . . . . .	295
5.1. CRIBADO FARMACOLÓGICO <i>IN VITRO</i> . . . . .	297
5.1.1. Sobre el método de cribado farmacológico <i>in vitro</i> frente a <i>Trichomonas vaginalis</i> . . . . .	297
5.1.2. Sobre la actividad antiprotozoósica de los compuestos de síntesis ensayados . . . . .	299
5.1.2.1. Actividad de los derivados de tetrahidro-2H-1,3,5-tiadiazin-2-tionas. . . . .	299
5.1.2.2. Actividad de la serie CP: tieno(2,1)benzotiazepinas S,S-dióxidos y dibenzo(c,f)tiazepinas S,S-dióxidos. . . . .	301
5.1.2.3. Actividad de la serie de las aminas acomplejadas con cobre . . .	302
5.1.3. Cribado farmacológico antiprotozoósico de extractos vegetales iberoamericanos. . . . .	303
5.2. MODELO DE PATOGENIA EXPERIMENTAL DE <i>T. vaginalis</i> . . . .	306
5.3. EVALUACIÓN PATOGENICA DE LOS AISLAMIENTOS OBTENIDOS EN MADRID . . . . .	314
5.4. CRIBADO FARMACOLÓGICO <i>IN VIVO</i> . . . . .	320
5.4.1. Modelo experimental de cribado farmacológico <i>in vivo</i> frente a <i>T. vaginalis</i> . . . . .	320

5.4.2. Sobre la actividad antiprotozoósica <i>in vivo</i> de productos de síntesis frente a <i>T. vaginalis</i> .....	321
5.5. MODELO EXPERIMENTAL DE INMUNOMODULACIÓN .....	323
5.5.1. Sobre la modulación de la respuesta inmunitaria en el modelo murino de tricomonosis .....	323
5.5.2. Sobre los fármacos de referencia: inmunoestimulantes, inmunosupresores y AINEs. ....	326
5.5.3. Otros fármacos de interés: SAME .....	331
5.5.4. Sobre los extractos vegetales: PAL, CTP, DIFUR y saponinas de <i>Quillaja saponaria</i> .....	334
<b>5. CONCLUSIONES</b> .....	<b>345</b>
<b>6. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>351</b>
<b>7. ANEXO</b> .....	<b>393</b>

# **INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS**





## 1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

La tricomonosis urogenital humana, causada por *T. vaginalis*, es una de las enfermedades de transmisión sexual (E.T.S.) no vírica de mayor prevalencia en el mundo; con un total estimado de 170 millones de mujeres infectadas cada año (O.M.S., 1995).

El agente etiológico es un protozoo de ciclo directo y metabolismo anaerobio aerotolerante, que ocasiona en la mujer una enfermedad con un amplio rango de manifestaciones clínicas: desde casos asintomáticos (40 %), pasando por signos y síntomas leves, como flujo vaginal, prurito vulvar, disuria y vaginitis (Rein, 1990), hasta situaciones más graves que cursan con la invasión de los conductos genitourinarios, glándulas de Bartholin, trompas de Falopio (Sebek, 1972), glándulas de Skene o vejiga (Keith, 1988), colonización del parénquima (Gardner & Culberson, 1988; Gupta & Frost, 1988), e infertilidad (Grodstein *et al.*, 1993). Las mujeres infectadas durante el embarazo están expuestas a síndromes de ruptura prematura de las membranas placentarias y partos prematuros de bajo peso. En el varón, la infección es asintomática en el 50% de los casos, o bien se manifiesta por prostatitis, uretritis, e incluso puede llegar a ocasionar infertilidad transitoria (Rein, 1990).

Independientemente de la etiología de la enfermedad parasitaria, no hay que desestimar su posible relación con el cáncer cervical y ciertas alteraciones epiteliales, denominadas neoplasmas (Kazanowska & Kuczynska, 1988). Asimismo, *T. vaginalis* actúa como vector potencial de otros organismos concomitantes: *Candida albicans*, *Gardnerella vaginalis*, gonococos y virus. Señalándose que *T. vaginalis* puede aumentar la predisposición a la infección por el virus de la inmunodeficiencia humana (V.I.H.) (Cameron & Padian, 1990; Laga *et al.*, 1993; Kengne, 1994; Minkoff *et al.*, 1999).

La amplia variabilidad en el perfil clínico asociado a la infección con diferentes cepas del parásito es uno de los aspectos más difíciles de explicar por los expertos. Para abordar este tema parece fundamental disponer de un modelo de patogenia experimental que refleje el comportamiento intraespecífico de *T. vaginalis*.

Más allá de la adhesión célula-célula (Alderete & Garza, 1988; Costa e Silva *et al.*, 1988; Arroyo *et al.*, 1992; Alderete *et al.*, 1994; Alderete *et al.*, 1995), la hemólisis (Krieger *et al.*, 1983; Dailey *et al.*, 1990; Fiori *et al.*, 1993), y la secreción de factores solubles tales como las proteinasas extracelulares (Marczak *et al.*, 1983; Arroyo & Alderete, 1989; Garber & Lemchuk-Favel, 1994) y el factor de disgregación celular (C.D.F.) (Pindak *et al.*, 1986; Garber *et al.*, 1989), uno de los mecanismos patogénicos de *T. vaginalis* más sugestivos es la evasión de la respuesta inmunitaria del hospedador (Alderete *et al.*, 1989; Alderete *et al.*, 1992; Alderete *et al.*, 1995; Provenzano & Alderete, 1995). Sin embargo, la comprensión de la secuencia de fenómenos inmunológicos que se producen tras la infección parasitaria es muy limitada.

De otra parte, aunque la introducción del metronidazol en la década de 1960 supuso un gran avance en el tratamiento de la tricomonosis, el fármaco no está exento de efectos secundarios. Si bien su absorción oral y biodisponibilidad son bastante aceptables, la administración va seguida habitualmente de náuseas, vómitos y anorexia (Lossick, 1990). Asimismo se le ha atribuido cierto poder mutagénico (Voogd *et al.*, 1974; Speck *et al.*, 1976; Lindmark & Müller, 1976; Jhan, 1982) y carcinogénico (Di Carneri & Di Re, 1970; Mitelman *et al.*, 1976; Zhang & Begg, 1994).

También es conveniente recordar la resistencia del parásito al tratamiento clínico, a la vista de los numerosos casos refractarios que se han venido publicando (Kurnatowska, 1969; Meingassner & Turner, 1979; Forsgren & Forssman, 1979; Taylor-Robinson & Street, 1982); este problema sólo se ha resuelto parcialmente con el desarrollo de nuevos derivados 5-nitroimidazólicos. En este terreno, la variable quimiosensibilidad de las cepas de *T. vaginalis* a los fármacos justifica la prioridad que tiene la evaluación de nuevos principios activos.

En virtud de la situación descrita, los objetivos de la Tesis Doctoral realizada se enmarcan en dos líneas de trabajo básicas en Protozoología parasitaria, a saber:

1.- El cribado farmacológico *in vitro* de potenciales productos tricomonocidas, ya sean compuestos químicos (sintetizados en el Instituto de Química Médica, C.S.I.C.) o productos naturales (extractos vegetales de plantas iberoamericanas propiedad de A.S.A.C. *Pharmaceutical International*).

2.- El diseño de un modelo murino de tricomonosis, que incluye la selección de la cepa de ratón más susceptible al parásito, del tiempo de infección óptimo para el ensayo, así como el inóculo más favorable para el establecimiento del parásito. Posteriormente, este modelo experimental se aplica a:

- a. La evaluación de la patogenicidad de 18 aislamientos clínicos procedentes de la encuesta epidemiológica realizada en Madrid (1994-1996) y la validación del baremo de cuantificación establecido mediante procedimientos estadísticos (Análisis de Componentes Principales y Discriminante).
- b. La determinación de la actividad farmacológica *in vivo* de los productos que superen el cribado primario *in vitro*.
- c. La elucidación de la actividad inmunomoduladora potencial de los extractos vegetales PAL y CTP, con la determinación adicional de las citocinas IFN- $\gamma$  (Th1) e IL-4 (Th2), que caracterizan el tipo de respuesta inmunológica del ratón frente a *T. vaginalis*.

Paralelamente, el modelo de inmunomodulación se valida mediante ensayos con inmunosupresores (ciclofosfamida, azatioprina y tacrólimo), inmunoestimulantes (timoestimulina y glicofosfopeptical), antiinflamatorios no esteroideos (metamizol y piroxicam), inmunomoduladores como S-adenosilmetionina (SAME) y adyuvantes de origen natural (saponinas de *Quillaja saponaria*).



# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**



## 2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. TAXONOMÍA Y EVOLUCIÓN

*Trichomonas vaginalis*, según la revisión realizada por Levine *et al.* (1980) para la clasificación de los protozoos, presenta el siguiente encuadre taxonómico:

Reino: PROTISTA (Haeckel, 1866) Whittaker, 1977.

Subreino: PROTOZOA (Goldfus, 1818) von Siebold, 1845.

Filo I: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963.

Subfilo I: MASTIGOPHORA Diesing, 1866.

Clase II: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909.

Superorden I: PARABASILIDEA Honigberg, 1973.

Orden VII: TRICHOMONADIDA (Kirby, 1947) Mattern & Honigberg, 1974.

Familia: TRICHOMONADIDAE (Chalmers & Pekkola, 1918) Kirby, 1946.

Subfamilia: TRICHOMONADINAE Honigberg, 1963.

Género: *Trichomonas* Donné, 1836.

Especie: *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1836) Ehrenberg, 1838.

Aunque se recoge la clasificación de Levine *et al.* (1980), posteriormente Cavalier-Smith (1987) postuló que ciertos protozoos anaerobios descendientes evolutivos de los primigenios eucariotas amitocondriados requerían una revisión taxonómica. Inicialmente, se propuso un nuevo reino denominado ARCHEOZOA englobando los filos: Microsporidia, Metamonada, Archamoebae y Parabasalia.

En este sentido, los análisis filogenéticos usando secuencias de ARN ribosómico (Sogin, 1989), así como el análisis de secuencias proteicas -factor de elongación 1 $\alpha$ - (Hasegawa *et al.*, 1993) han pretendido confirmar la identidad del nuevo reino.

No obstante, una ulterior revisión más profunda de los ARCHEOZOA realizada por Cavalier-Smith (1993) conduce a la exclusión de los Archamoebae y Parabasalia del grupo, que

vuelven a pertenecer al reino PROTOZOA. En cuanto a los Parabasalia, dos son los hechos en que se fundamenta tal decisión: la presencia de aparato de Golgi (dictiosomas) excepcionalmente bien desarrollado y de hidrogenosomas.

Además, se han señalado evidencias en el análisis filogenético de secuencias de la subunidad 18S de ARNr que apoyan la teoría de que los tricomonádidos no son primitivos amitocondriados, sino que su hidrogenosoma puede haber involucionado desde una mitocondria (Cavalier-Smith, 1987; 1990). En la misma línea, nuevas contribuciones muestran la similitud de secuencias en proteínas estructurales, como las chaperoninas (cpn60), de hidrogenosomas y mitocondrias (Roger *et al.*, 1996). La polémica ubicación de los Parabasalia queda, de momento, resuelta tras el consenso alcanzado por la mayoría de los expertos en filogenia.

En cuanto a la historia evolutiva de los Parabasalia, no existen evidencias fósiles de estos parásitos, aunque en los registros del Paleozoico se han conservado antecesores de sus hospedadores, una especie de termitas de hace aproximadamente 330 millones de años. La figura 2.1. representa el árbol evolutivo de los Parabasalia (Brugerolle & Taylor, 1978).

La primera descripción científica de *Trichomonas vaginalis* se debe a Donné en 1836: "...animalículos en los materiales purulentos y en los productos de secreción de los órganos genitales del hombre y de la mujer". Recibió su nombre de Dujardin, un año más tarde ( de "Tricho": pelo y "Monas": zarandeado). Siendo *Trichomonas vaginalis* la especie tipo del género.

*T. vaginalis* ha dado su nombre al orden al cual pertenece en la Sistemática moderna: orden Trichomonadida. Este orden se caracteriza por un aparato locomotor bien desarrollado (flagelos y cinetosomas), multiplicación por fisión binaria (pleuromitosis) y nutrición fagótrofa u osmótrofa.

El orden Trichomonadida comprende varias especies que parasitan los tractos digestivos o genitales de cierto número de vertebrados. Este parasitismo es doblemente



## 2.2. MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA

La morfología del parásito es muy variable. Desde aspectos piriformes, semilunares, esferoidales en medios líquidos, con una actividad locomotriz muy intensa, hasta formas ameboides en medios sólidos (agar), que disminuyen su movilidad. Los agentes que determinan tal polimorfismo son múltiples: la flora bacteriana concomitante, pH y presión osmótica del entorno y la riqueza de nutrientes del medio.

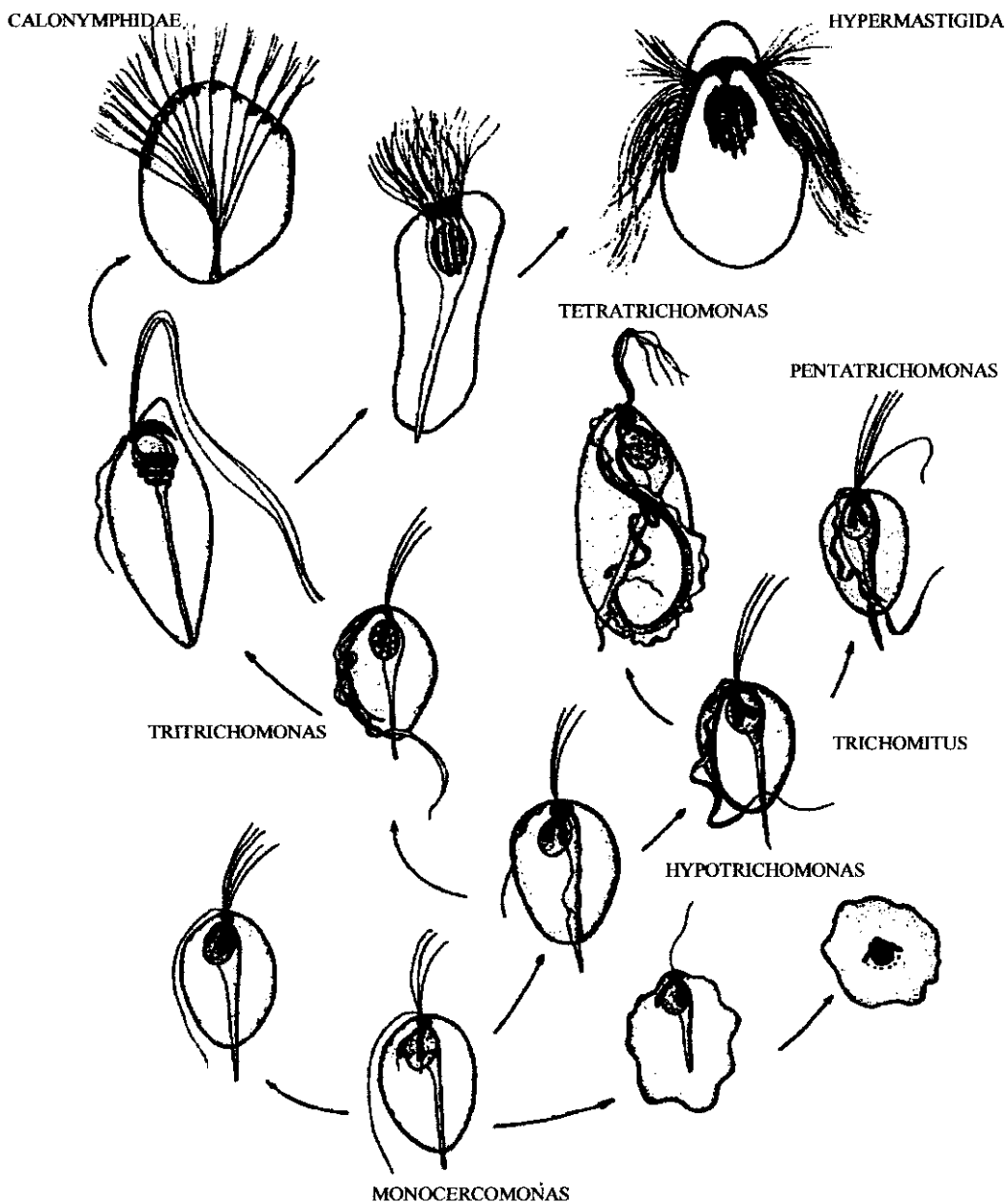
El tamaño de la especie en preparaciones fijadas y teñidas es de  $9,70 \pm 0,07 \times 7,00 \pm 0,04 \mu\text{m}$ , produciéndose un incremento de un tercio en los trofozoitos vivos (Honigberg & Brugerolle, 1990).

El aparato locomotor presenta cinco flagelos, uno de los cuales es recurrente y constituyente fundamental de un orgánulo motor complejo: la membrana ondulante. Esta alcanza la mitad del cuerpo, presentando una laminilla marginal periódica conectada al primer cinetosoma por una estructura filamentosas. Varios autores comprobaron por técnicas de microscopía electrónica que el flagelo del parásito presenta una estructura de nueve fibrillas periféricas y dos centrales rodeadas por la membrana plasmática (Inoki *et al.*, 1960; Nielsen *et al.*, 1966). Cada flagelo nace en el extremo anterior del cuerpo de un cinetosoma o corpúsculo basal. Los cuatro corpúsculos basales de los flagelos anteriores están dispuestos de forma radial alrededor del quinto cinetosoma que da origen al flagelo posterior.

El citoesqueleto, con funciones motoras, reproductoras y de transporte, está formado por microtúbulos -de naturaleza proteica: actina y tubulina-. Originando la formación de estructuras como el complejo pelta-axostilar, la costa y los filamentos parabasales. El complejo pelta-axostilar está formado por una serie de microtúbulos, que se abren en un capítulo axostilar para alojar el núcleo y el conjunto de aparatos parabasales. Los microtúbulos del complejo están interconectados por puentes microfibrilares. La pelta refuerza la pared del canal periflagelar. Los filamentos parabasales y los pequeños filamentos radiculares o laminillas pueden ejercer una importante función en preservar la integridad del tricomonádido al conectar los cinetosomas entre sí y a otras partes de la célula. La costa está asociada al cinetosoma del

específico, en cuanto al hospedador y al biotopo. Así en el hombre pueden observarse cuatro especies distintas desde el punto de vista morfológico y biológico, ubicadas en tres biotopos diferentes: *Trichomonas tenax* (Müller, 1773) en la cavidad oral, *Pentatrichomonas hominis* (Davaine, 1860) y *Trichomitus fecalis* (Cleveland, 1928) en el tracto digestivo y *Trichomonas vaginalis* Donné 1836, en el aparato genitourinario.

FIGURA 2.1. Árbol evolutivo de los Parabasalia. (Brugerolle & Taylor, 1977).



flagelo recurrente, estando relacionada con la membrana ondulante, a la que sirve de soporte mecánico. El sistema cinético y el de sostén del flagelado están unidos por fibras falciformes y sin estriaciones, asociando el cinetosoma con al menos dos fibras y el filamento parabasal.

El núcleo tiene un tamaño aproximado de  $4 \times 2 \mu\text{m}$ , es ovalado y situado en la parte anterior del cuerpo celular, un poco excéntrico con relación a su eje. Presenta gránulos de cromatina dispersos y un nucleolo. El citoplasma, presenta gran variedad de vacuolas y vesículas relacionadas con procesos de endocitosis, digestión y transporte, así como retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, polisomas y gránulos de glucógeno formando grandes rosetas.

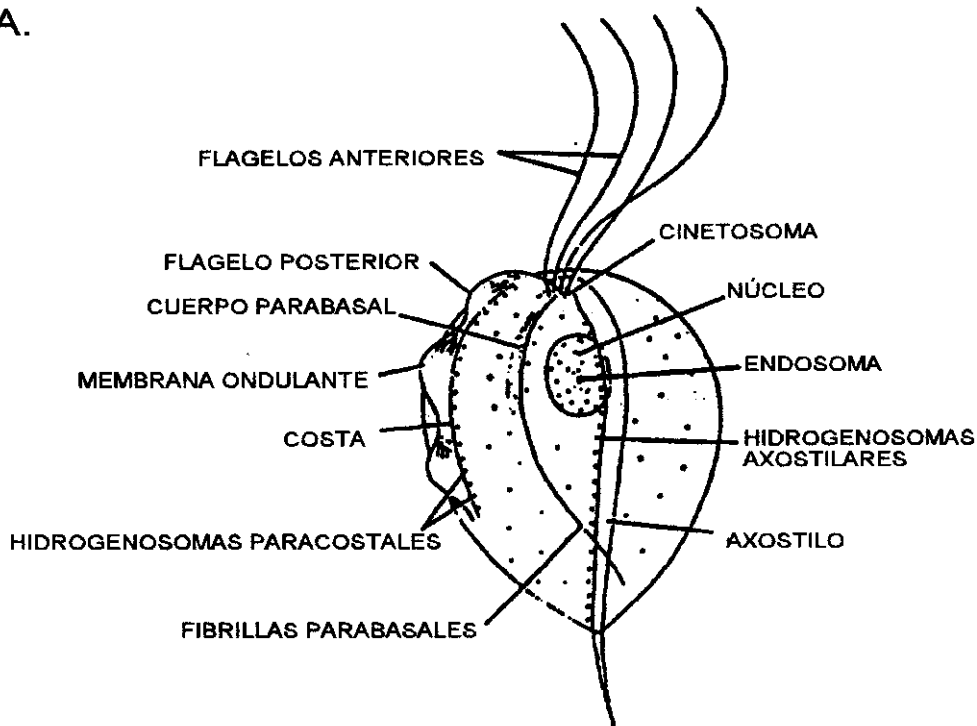
Los hidrogenosomas son los orgánulos implicados en el metabolismo energético de este grupo de protozoos, que carecen de mitocondrias por su naturaleza anaeróbica. Fueron descubiertos por Lindmark & Müller en 1973 y denominados así por encontrarse en ellos los enzimas responsables de la formación de hidrógeno molecular. Son cuerpos esféricos de 0,5 a  $1 \mu\text{m}$  que parecen formarse por división de los preexistentes (Nielsen & Diemer, 1976). Por ello, al igual que las mitocondrias y cloroplastos, son probablemente de origen endosimbionte. Los equivalentes reductores procedentes de la oxidación, se eliminan vía formación de  $\text{H}_2$  molecular, o bien vía de malato o acetato, dependiendo de la presión parcial de  $\text{CO}_2$  existente, estas reacciones metabólicas acumulan energía en forma de ATP.

La membrana plasmática es una estructura de gran interés, ya que su composición bioquímica puede estar relacionada con marcadores de patogenicidad. Se han estudiado mediante lectinas ciertas glicoproteínas relacionadas con la virulencia (Warton & Honigberg, 1983). Se ha comprobado la existencia de receptores superficiales para proteínas propias del hospedador, relacionando el hecho con su comportamiento patógeno.

Las figuras 2.2. y 2.3. muestran esquemas de la morfología microscópica del parásito y fotografías de microscopía electrónica de *T. vaginalis*.

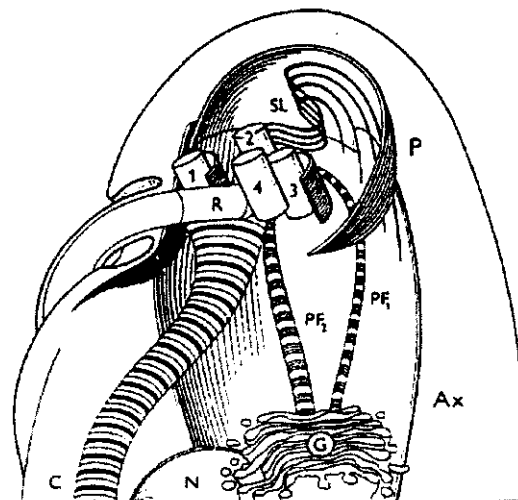
**FIGURA 2.2.** Esquema de la morfología microscópica (a) y detalle ultraestructural (b) de *T. vaginalis*.

A.

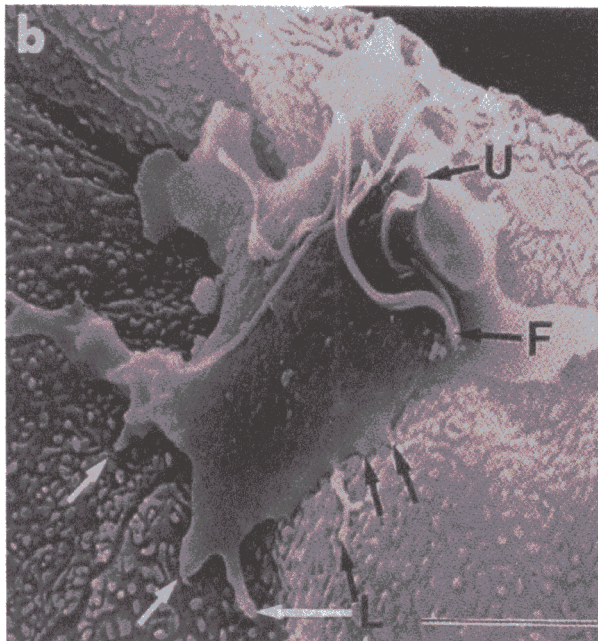
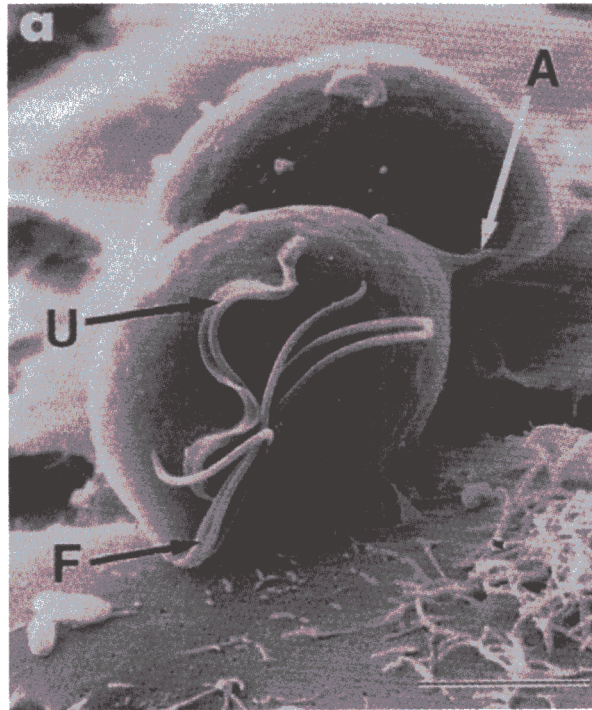


Modificado de Wenrich D. H. y Emmerson, 1993. *J. Morphol.*, 55: 195. Diseñado por Williams C. Obers para Foundations of Parasitology, (Schmidt, G. and Roberts, L. S., eds.). Times Mirror/Mosby C. P., St. Louis, Missouri.

B. Detalle de la morfología ultraestructural de *T. vaginalis*. 1-4 cinetosomas de los flagelos anteriores, R: cinetosoma del flagelo recurrente. P: pelta, Ax: axostilo, SL: lámina sigmoidea, PF1, PF2: filamentos parabasales. G: aparato de Golgi, C: costa, N: núcleo. (Tomado de Kulda, J.; Nohynkova, E. and Ludvik, J. Basic structure and function of the trichomonad cell. In: Trichomonads and Trichomoniasis, Part. I (Kulda, J. and Cérkasov, J., eds.). Acta Univ. Carolinae-Biol. 30, (1986), 1987.



**FIGURA 2.3.** Morfología elipsoidal (a) típica del trofozoito de *T. vaginalis*. En la imagen obtenida mediante microscopia electrónica se señalan el axostilo (A), los flagelos (F) y la membrana ondulante (U).



b) Transformación ameboidal de un tricomonádido en contacto con una monocapa de células HeLa. Presencia de lamelopodios (L) que facilitan la interacción entre el parásito y la célula. El cambio morfológico se culmina en 5 minutos. (Tomado de Alderete *et al.*, 1995).



*T. vaginalis* se divide mediante fisión binaria, con división nuclear pleuromitótica. El cariotipo está constituido por cinco cromosomas. Pueden existir divisiones nucleares múltiples (veinte núcleos o más en las células gigantes), antes de que ocurra la citocinesis. Es un fenómeno que se ha venido asociando a la existencia de condiciones ambientales desfavorables.

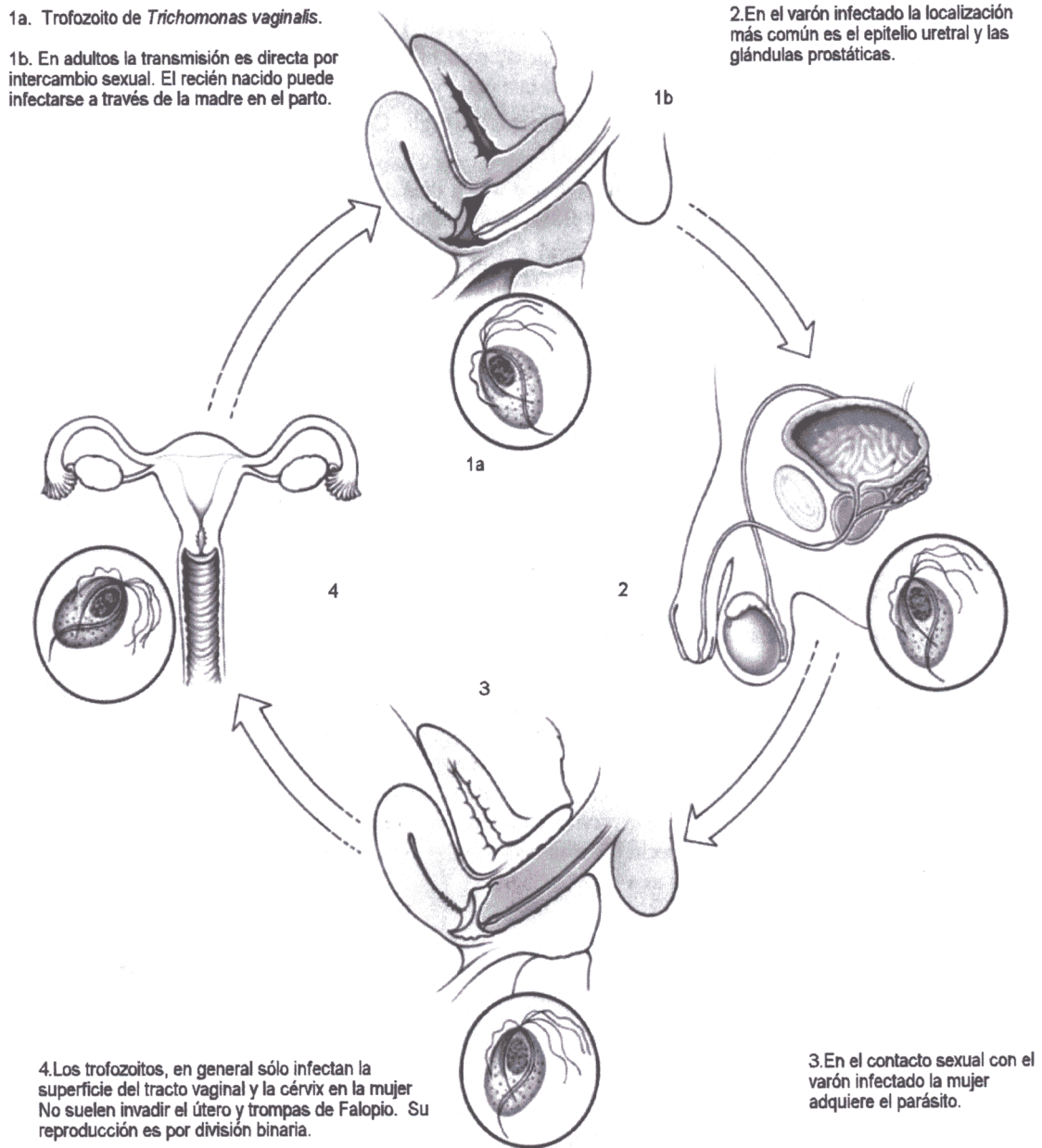
La alimentación del parásito tiene lugar por pinocitosis y fagocitosis; en el proceso se ve involucrada la estructura microtubular, formándose vacuolas alimenticias de tamaño diverso (Juliano & Bandeira, 1985). El proceso es más activo en los dos tercios posteriores de la célula. La capacidad del protozoo para ingerir bacterias ha llevado a considerar su posible papel como transportador de microorganismos incompletamente fagocitados al tracto genital superior (Keith *et al.*, 1986). La fuente esencial de energía es la glucosa que estimula fuertemente su crecimiento, siendo otros azúcares utilizados en menor grado, a excepción de la galactosa y la lactosa, que no parecen ser utilizados.

La riqueza de la cavidad vaginal en glucógeno y glucosa permiten explicar la notable multiplicación del parásito en este medio. *T. vaginalis* posee enzimas que permiten un metabolismo activo de los glúcidos tanto por la vía de Embden-Meyerhof como por el ciclo de las pentosas, siendo capaz de fijar anhídrido carbónico.

*T. vaginalis* no forma quistes de resistencia. Sin embargo, se puede observar en vagina y uretra masculina, así como en los cultivos agotados, la existencia de parásitos redondeados e inmóviles sin flagelos visibles, que algunos consideran formas de resistencia, denominadas polimastigotes (Honigberg & Brugerolle, 1990). La visión tras tinción May Grünwald Giemsa hace evocar formas parasitarias en vías de degeneración y lisis, si no encuentran condiciones de medio más favorable. No parecen, por tanto, desempeñar un papel de importancia en los mecanismos de resistencia (Kulda *et al.*, 1987).

De otra parte, los tricomonas polinucleares no pueden ser considerados como formas quísticas, dada su escasa resistencia a la desecación y a las variaciones de pH. En la figura 2.4. se presenta el ciclo epidemiológico de *T. vaginalis*.

**FIGURA 2.4.** Ciclo biológico y epidemiológico de *Trichomonas vaginalis*.



Tomado de Despommier, D. D. y Karapelou, J. W. *Parasite Life Cycles*. Springer-Verlag, New York, 1987.



### 2.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

*T. vaginalis* fue considerado como comensal, desde su descubrimiento (Donné, 1836) hasta los trabajos de Höhne en 1916, quien aisló el parásito en el flujo de una mujer que padecía colpitis aguda. Los efectos patológicos asociados con la infección son el resultado de una compleja interacción entre el parásito y el hospedador.

La tricomonosis es una enfermedad del tracto urogenital humano de transmisión venérea, que si bien no es grave, produce un cuadro clínico muy variado, desde la banalidad hasta ostensibles síndromes pelviperitoníticos (Contreras, 1984). Así, la cifra de casos asintomáticos se aproxima al 40% en la mujer, aún cuando el dato pudiera incrementarse en función de la formación higiénico-sanitaria de las pacientes, habiéndose apuntado una marcada subjetividad en la apreciación de los síntomas.

El periodo de incubación varía entre los cuatro y los veintiocho días en la mujer. La evolución de la enfermedad cursa con aumento evidente del exudado vaginal, prurito vulvar, cistitis y disuria ligera; la presentación de la vulva eritematosa oscila entre el 10-20% de los casos. La naturaleza del flujo vaginal depende de la flora bacteriana asociada, que causan habitualmente vaginitis bacterianas debidas al microentorno anaerobio que se genera. El descenso en la concentración de *Lactobacillus acidophilus* observado *in vitro* en cultivos con *T. vaginalis* (McGrory *et al.*, 1994) demuestra la interacción del parásito con la flora vaginal, y podría explicar la disminución que ocurre en la tricomonosis. El flujo verdoso maloliente clásico se produce en menos del 10% de las mujeres infectadas y las metrorragias en tan sólo el 2% del total (Fouts & Krauss, 1980). Puede haber inflamación vulvar que, en ocasiones, se extiende a la cara interna de los muslos. En algunas ocasiones se producen molestias hipogástricas (Rein, 1990) así como invasión de los conductos genitourinarios como glándulas de Bartholin, trompas de Falopio, glándulas de Skene y vejiga (Keith, 1988). Se han descrito localizaciones poco comunes, como la parte inferior del tracto urinario -uréteres y pelvis renal- (Trussell, 1947; Chappaz & Bertrand, 1965), aunque la hipótesis más extendida es considerar poco habitual la presencia del parásito en el tracto urinario (Soszka *et al.*, 1973).

A pesar de ser considerado como parásito de naturaleza no invasiva, se ha descrito la colonización del parénquima -submucosa y estroma- (Gardner, 1988); trabajo apoyado por otros posteriores que corroboran la capacidad invasiva de *T. vaginalis* (Gupta & Frost, 1988).

En infecciones latentes puede llegar al cérvix uterino e incluso hay autores que relacionan dicha presencia con el desarrollo de cierto carcinoma de útero; el 10% de las mujeres infectadas presentan algún tipo de neoplasma (Kazanowska & Kuczynska, 1986); ello sugiere una cierta relación entre la biocenosis vaginal alterada y la tricomonosis con los procesos cancerígenos. Aunque la prevalencia de la tricomonosis es más alta en mujeres con carcinoma cervical, la relación causal es confusa (Krieger, 1981). Sin embargo, en la actualidad parecen existir pruebas concluyentes que demuestran dicha relación (Zhang & Begg, 1994). Así, en más de del 40 % de pacientes con cáncer cervical invasivo se han detectado por Western Blot anticuerpos frente a *T. vaginalis* (Yap *et al.*, 1995), siendo los sueros especialmente reactivos con proteínas inmunogénicas de membrana de 92 y 115 kDa. En un intento de aclarar la posible correlación entre *T. vaginalis* y neoplasia cervical, Zhang y Begg (1994) llevan a cabo un estudio estadístico sobre casos publicados en el periodo 1966-1993. El análisis de los datos obtenidos permite a los autores indicar que el riesgo de neoplasia prácticamente se duplica en los casos de tricomonosis.

Las infecciones asintomáticas, que varían entre 9%-56% se tornan en sintomáticas en un tercio de los casos en los seis primeros meses (Rein, 1977). Esto puede deberse a una sobreinfección con cepas más virulentas o, según otras fuentes, al hecho de que la frecuencia con que los síntomas aparecen o se exacerban coincide con el periodo siguiente a la menstruación.

El conjunto de signos y síntomas de la tricomonosis vaginal humana se resumen en la TABLA 2.1. modificada de Rein (1980).

TABLA 2.1. Signos y síntomas de la tricomonosis vaginal.

DATOS CLÍNICOS		PREVALENCIA
<b>SÍNTOMAS</b>		
Ninguno		9%-56%
Flujo		50%-75%
Maloliente		10%
Irritante		23%-82%
Dispareunia		10%-50%
Disuria		30%-50%
Leve dolor abdominal		5%-12%
<b>SIGNOS</b>		
Ninguno		15%
Eritema vulvar difuso		10%-20%
Flujo abundante		50%-75%
Amarillo-verdoso		5%-20%
Espumoso		10%-50%
Inflamación de la pared vaginal		40%-75%
Cérvix en apariencia de fresa		2%

Tomado de Rein, M. F. Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. In *Trichomonads Parasitics in Humans* (Honigberg, B. M. ed.). Springer-Verlag. New York, 1990.

Existen escasos datos sobre las manifestaciones clínicas de la tricomonosis en el varón, que fue considerado como un simple portador asintomático del parásito, debido en parte a métodos de diagnóstico poco apropiados, que han conducido a señalar casos de uretritis no gonocócica, sin determinar su agente etiológico. Las consecuencias de la infección en el hombre pueden variar, entre el prurito en el pene en los casos crónicos, hasta la descarga uretral purulenta e inflamación del meato externo (uretritis y prostatitis) en procesos agudos (Gardner et al., 1988), actuando la glándula prostática como reservorio de los tricomádidos. Más del 50% de los varones infectados manifiestan tener descarga uretral, aunque en su mayoría es leve o moderadamente severa (Krieger, 1995).

En algunos casos se ha descrito irritación, dolor uretral, dolor abdominal, disuria, epididimitis y casos de infertilidad transitoria. La influencia sobre la fertilidad se debe a la probable acción letal sobre los espermatozoides (Zaremba & Szamarch, 1979).

Según Petrin *et al.* (1998), la tricomonosis en el varón puede encuadrarse en alguna de las tres categorías siguientes: 1) portador asintomático, identificado por la investigación de contactos sexuales con mujeres infectadas, 2) tricomonosis aguda, caracterizada por uretritis purulenta y 3) enfermedad sintomática leve, que es clínicamente similar a otras uretritis no gonocócicas.

Las niñas presentan flujo vaginal (92,5%), sensación de ardor en vulva y vagina (50,9%) y prurito (38,6%). En algunos casos se produce dolor y sensación de ardor en la uretra, poliuria y disuria. Los signos mayoritarios son el enrojecimiento vulvar (96,5%), colpitis difusa (51,3%), colpitis maculosa (35%) y dolor abdominal (16%). Otros signos destacados son la erosión vulvar y del cérvix uterino (Kurnatowska & Komorowska, 1990).

En recién nacidos se ha aislado *T. vaginalis*. Schares y colaboradores, en 1982, diagnostican tricomonosis urinaria en un niño de cinco semanas cuya madre presentaba infección en el momento del parto. Se ha aislado *T. vaginalis* del tracto respiratorio de dos niños de madre infectada (McLaren *et al.*, 1983).

Se ha vinculado al parásito con manifestaciones clínicas derivadas de efectos colaterales, como su capacidad de actuar como vector de otras infecciones; se ha citado *Candida* como agente habitualmente concomitante con el protozoo. En esta línea parece ser mucho más frecuente la coinfección con *Gardnerella* y gonorrea que con la levadura (John, 1988).

Por otro lado, el anclaje de bacterias a la superficie de los protozoos permiten su transporte a zonas inaccesibles del tracto urogenital (Thomason & Gelbart, 1985). Además es preciso resaltar la presencia de *Chlamydia* en el citoplasma del parásito (Naib, 1984).

También es necesario significar la existencia de virus en el interior del flagelado (Flegr *et al.*, 1987; Pindak *et al.*, 1989 ; Wang & Wang, 1991 y Kengne, 1994). Como ocurre con otras ETS, la infección por *T. vaginalis* puede aumentar la predisposición al virus de la inmunodeficiencia humana (Cameron & Padian, 1990; Laga *et al.*, 1993; 1994). Así Laga *et al.* (1994) han correlacionado la seroconversión VIH+ en prostitutas con ETSs no ulcerativas, como la tricomonosis, probablemente debido a la acumulación local de células infectadas o susceptibles al VIH, como linfocitos y macrófagos (Laga *et al.*, 1991). Por consiguiente, se perfila un potencial panorama patogénico, asociado a *T. vaginalis*, de importantes repercusiones fisiológicas, terapéuticas y epidemiológicas.

## 2.4. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA PATOGENIA

Aunque *T. vaginalis* es la causa más frecuente de ETS no vírica, los mecanismos de patogenia no han sido todavía bien caracterizados. Si se ha comprobado la implicación de diversos procesos, como la adherencia célula-célula (Arroyo *et al.*, 1992; Gold y Ofek, 1992; Alderete, 1994; 1995), la hemólisis (Krieger *et al.*, 1983; Dailey *et al.*, 1990; Fiori *et al.*, 1993). y la excreción de factores soluble, como las proteinasa extracelulares (Arroyo y Alderete, 1989; Garber y Lemchuk-Favel, 1994; Mallinson *et al.*, 1994) y CDF -factor disgregador de células- (Garber *et al.*, 1989). Además, factores generales del hospedador, como el estado endocrino (nivel estrogénico) e inmune, así como las condiciones locales del tracto urogenital (pH, flora y glucógeno vaginales), pueden modificar la expresión de la patogenicidad potencial de las cepas.

La relación parásito-hospedador es muy compleja, y el amplio rango de manifestaciones clínicas no pueden ser atribuidas a un único mecanismo de patogenia. La membrana celular del tricomonádido debe jugar un papel clave (Petrin *et al.*, 1998), puesto que interviene en la adherencia, interacción parásito-hospedador e incorporación de nutrientes, procesos en los que intervienen las proteínas y glicoproteínas superficiales.

La adherencia de los tricomonádidos a las células epiteliales de la vagina es un paso crítico en al patogenia (Alderete y Pearlman, 1984; Alderete y Garza, 1985; Krieger *et al.*,

1985). En el proceso intervienen proteínas de alto peso molecular (Alderete *et al.*, 1985) denominadas adhesinas (Arroyo *et al.*, 1992), que se expresan alternativamente con una glicoproteína muy inmunógena, P270 (Alderete, 1988; Alderete *et al.*, 1992), lo que permite al parásito utilizar la variación fenotípica como mecanismo de evasión de la respuesta inmune.

Estudios más recientes han demostrado cómo efectivamente en la colonización del tracto genito-urinario intervienen cuatro adhesinas, denominadas AP65, AP51, AP33 y AP23 (Engbring *et al.*, 1996). Los estudios de caracterización de AP33 y AP51 (Alderete *et al.*, 1998) han permitido el hallazgo de homologías significativas con la enzima succinil-CoA sintetasa, lo que refuerza la idea de que el mimetismo molecular puede jugar un importante papel en el parasitismo por *T. vaginalis*. También en el caso de AP65 se ha comprobado que los genes que codifican la proteína son similares a los que codifican al enzima málico (O'Brien *et al.*, 1996). La adherencia a las células del hospedador parece también requerir la presencia de cisteín-proteasas (Arroyo y Alderete, 1989).

Distribuidas por la membrana del parásito existen asimismo unas proteínas que actúan como receptores para laminina, glicoproteína localizada en la membrana basal del epitelio, con propiedades quimiotácticas (Costa e Silva Filho *et al.*, 1988) y fibronectina (Peterson y Alderete, 1982), de membranas basales y suero. Aunque se ha comprobado que el parásito se adhiere *in vitro* a laminina, y se recubre de fibronectina y otras proteínas séricas, lo que ocurre en el hospedador y su posible relación con la patogenia y/o nutrición no está clara. Sí se ha comprobado, por el contrario, la existencia y correlación con la virulencia de carbohidratos superficiales (Choromanski *et al.*, 1985), así como el papel en la adhesión de lectinas endógenas sobre la superficie del tricomonádido (Roussel *et al.*, 1991).

A pesar de la variabilidad en las moléculas de adhesión que exhibe el parásito, su correlación con la virulencia no está clara. Mientras algunos autores encuentran amplias diferencias en la adherencia a células del hospedador entre cepas virulentas aisladas de pacientes sintomáticos (Krieger *et al.*, 1990), otros consideran que la citoadherencia puede ser un marcador de patogenia, habida cuenta de la correlación existente entre la adherencia *in vitro* a células HeLa y la patogenia experimental en ratón (Escario y Gómez Barrio, 1990).

De otra parte, la capacidad hemolítica del parásito se ha relacionado con su virulencia. Ya que *T. vaginalis* no puede sintetizar lípidos, los eritrocitos pueden ser la fuente prioritaria de ácidos grasos. Los parásitos metabólicamente activos son capaces de lisar eritrocitos, especialmente a pH 4,5 valor normal en la vagina (Fiori *et al.*, 1993), reduciéndose esa capacidad hemolítica en presencia de inhibidores de cisteín-proteasas (Dailey *et al.*, 1990). La lisis parece mediada por receptores de membrana de eritrocitos y parásitos y ocurre en tres fases: (1) interacción ligando-receptor, que permite al protozoo unirse al eritrocito, (2) liberación de proteínas tipo perforinas -probablemente cisteín-proteasas, que abren poros en la membrana eritrocítica y (3) separación del parásito, seguida de la lisis del hematíe.

En *T. vaginalis* se han descrito entre 11 y 23 actividades cisteín-proteasas distintas, la mayoría lisosómicas (Muller *et al.*, 1988; Arroyo y Alderete, 1989; Garber y Lemchuk-Favel, 1994; Provenzano y Alderete, 1995). Es lógico pensar que esas enzimas jueguen su papel en la patogenia de la enfermedad. Además de su intervención en la lisis de eritrocitos, se ha comprobado que intervienen en la adherencia a las células epiteliales (Arroyo y Alderete, 1989), puesto que aquella se ve claramente afectada tras el tratamiento de los tricomonádidos con el inhibidor de proteasas TLCK (N- $\alpha$ -p-tosil-L-lisina clorometil cetona). Las cisteín-proteasas del parásito tienen además la capacidad de degradar IgG, IgM e IgA (Provenzano y Alderete, 1995), del hospedador, pudiendo así evadir la respuesta de anticuerpos.

Aunque los mecanismos dependientes del contacto juegan un papel significativo en la patogénesis de *T. vaginalis*, otros mecanismos independientes del contacto están también implicados. La primera observación en este sentido se debe a Hogue (1943), quien comprobó los efectos patogénicos de productos solubles liberados por el parásito. Posteriormente, otros investigadores han apoyado la hipótesis de la participación de citotoxinas solubles (Honigberg, 1978; Alderete y Garza, 1984), cuya existencia explica la hemólisis y la citotoxicidad en ausencia de contacto célula-célula, en el modelo de estudio de Pindak *et al.* (1993).

De otra parte, la descamación del epitelio vaginal en infecciones agudas (Garber *et al.*, 1989) se ha relacionado con la secreción de un factor soluble (CDF) que, *in vitro*, produce el desprendimiento de monocapas de cultivos celulares sin afectar a la viabilidad de las células.

Los autores relacionan ese factor con la patogenia, ya que *Pentatrichomonas hominis*, especie no patógena, no muestra actividad CDF. Dicha actividad se ve afectada por el pH, siendo óptima a pH 6,5, y desaparece por debajo de 4,5. Este hallazgo tiene una gran relevancia clínica, ya que el pH normal de la vagina es 4,5 y sube por encima de 5,0 durante la tricomonosis. Esta elevación en el pH vaginal puede ser crucial en la patogénesis de la enfermedad. Además, el nivel de CDF es proporcional a la severidad de la sintomatología (Garber & Lemchuk-Favel, 1990) y es inactivado por suero humano inmune (Garber *et al.*, 1989). Su producción depende asimismo de la concentración vaginal de estrógenos, disminuyendo *in vitro*, en presencia de  $\beta$ -estradiol. Esto explicaría el empeoramiento de los síntomas coincidiendo con la disminución de estrógenos, durante la menstruación, así como la mejoría tras la aplicación de *pellets* intravaginales de estradiol (Lirosi y Guarascio, 1972).

En definitiva, la variabilidad de los mecanismos implicados en la patogenia es tal, que deben ser considerados como factores determinantes para la caracterización biológica de *T. vaginalis*. El diseño de modelos de patogenia experimental permite la aproximación al conocimiento de la compleja interacción parásito-hospedador.

## 2.5. EPIDEMIOLOGÍA DE LA TRICOMONOSIS

La tricomonosis es una de las enfermedades de transmisión sexual (E.T.S.) no vírica más importante en el mundo. Su distribución es cosmopolita y afecta a todos los grupos raciales y estratos socioeconómicos. Según los datos de 1995, la Organización Mundial de la Salud (O.M.S.) estima que anualmente se infectan 170 millones de personas. No obstante, por no ser una enfermedad de declaración obligatoria, sino que incluso tiende a ocultarse dado su mecanismo de transmisión, no existen datos epidemiológicos muy precisos.

En los países desarrollados, como todas las E.T.S., ha estado sometida a un incremento constante. En EE.UU., el aumento en 14 años ha sido del 33%, pasando de dos millones de casos en 1974 a los tres millones estimados a finales de la década de los 80; en 1981, se dieron cifras aproximadas del 48 % entre jóvenes ingresadas en un centro penitenciario (Bell *et al.*, 1985) y en 1982, del 33,9 % en un internado de adolescentes embarazadas (Hardy *et al.*, 1984).



Ya en la década de los 90, la incidencia asciende a 8 millones de casos nuevos cada año (OMS, 1995). En Gran Bretaña ocupa el quinto lugar entre las enfermedades de transmisión sexual (John, 1988) manteniéndose su incidencia en clínicas de esta índole durante los últimos veinte años en torno al 30%. Según datos recabados durante más de 22 años (Krieger, 1981) en clínicas de diversos países (Checoslovaquia, Inglaterra, Japón, Suecia, Polonia y USA), la prevalencia media se situó en el 23%, con los valores extremos entre el 5 y el 65%. La incidencia de la enfermedad en mujeres en el periodo reproductivo varía desde el 2% en el sector privado al 56% entre pacientes atendidas en clínicas de enfermedades sexuales. Thomason y colaboradores (1988) aislaron *T. vaginalis* de un 42% de las mujeres sintomáticas en hospital de Milwaukee.

La prevalencia oscila, en general, entre el 5% en las mujeres con pareja estable hasta un 70% entre las pacientes con E.T.S., o incluso cifras superiores en las comunidades de alto riesgo. La susceptibilidad, aunque no la incidencia, se incrementa en las mujeres postmenopáusicas, debido posiblemente a los cambios hormonales y a las alteraciones epiteliales resultantes. Asimismo y aunque no está clara la influencia de los contraceptivos orales, sí es verdad que en infecciones experimentales en ratones por vía intravaginal se consiguen mayores niveles de infección cuando los animales han sido previamente tratados con estrógenos. En mujeres que toman contraceptivos orales, la prevalencia de la tricomonosis es menor que en aquellas que no los utilizan (Krieger *et al.*, 1985; Lossick, 1990).

Según la revisión efectuada por Kurnatowska y Komorowska (1990), durante los años 1956 a 1983 la prevalencia de la tricomonosis en niñas de edades comprendidas entre 0 y 18 años, se mantiene entre el 0 y 14% sin apreciarse incremento significativo en los últimos años; la frecuencia de la infección es mayor, como cabe esperar, en adolescentes (21%), excepción hecha de neonatos, para los que se dan cifras similares a las presentadas en jóvenes de 14-15 años (12%). En estudios llevados a cabo por las mismas autoras en Polonia entre 1960 y 1985, el porcentaje medio de prevalencia se sitúa en un 5-7%, en niñas examinadas en una clínica pediátrica ginecológica y en un centro de enfermedades parasitarias, respectivamente; la prevalencia de la infección en este grupo de población va decreciendo en los últimos años.

Es lógico pensar que la mayor difusión de información sobre este tipo de enfermedades y, sobre todo, la utilización de preservativos como medida preventiva frente al SIDA puede estar empezando a controlar la incidencia de la infección. Sin embargo, entre poblaciones de alto riesgo de adquirir ETS, persiste la necesidad de difundir más información (Fleisher *et al.*, 1994). Además, según estos autores, del estudio realizado en consultas ginecológicas y clínicas de planificación familiar en Brooklyn, se deduce que una proporción considerable de las 1400 mujeres encuestadas siguen utilizando los preservativos más como contraceptivos que para la prevención de ETS.

#### 2.5.1. Método de transmisión

La tricomonosis es una antroponosis de transmisión fundamentalmente sexual. Este mecanismo prioritario ha quedado demostrado por varios hechos. En principio por la elevada carga parasitaria en la uretra y/o próstata de las parejas sexuales de las mujeres infectadas. En tales casos, la tricomonosis vaginal recurrente sólo se cura cuando se consigue erradicar los parásitos del tracto genital de los compañeros sexuales de las pacientes. De otra parte, *T. vaginalis* es más frecuente en mujeres que acuden a clínicas de ETSs y en prostitutas que en vírgenes o postmenopáusicas. Finalmente, los flagelados tienen una supervivencia muy limitada fuera del hospedador.

Como el protozoo no produce quistes, necesariamente se transmite como trofozoito, por lo general por vía sexual, habiéndose comprobado la viabilidad de los organismos durante 3 horas en la orina y durante 6 en el semen (Gallai & Sylvestre, 1966). Sin embargo, el hecho de haberse encontrado organismos viables en inodoros, baños, piscinas, ropas húmedas -el parásito se mantiene por espacio de 24 horas a 35°C según Burch y colaboradores (1959)-, obliga a citar, aunque sea de modo teórico, estos mecanismos alternativos como posibles fuentes de contagio. Sí está comprobada la vía parenteral, como vía no venérea, durante el parto. Los neonatos suelen ser asintomáticos, aunque las niñas pueden presentar flujo vaginal o infección del tracto urinario. Como consecuencia de esta vía de transmisión, se han descrito infecciones pulmonares en niños recién nacidos (McLaren, 1983).

El principal factor de riesgo, en función de la vía de transmisión es, por tanto, la actividad sexual; teniendo la enfermedad una mayor incidencia en personas que mantienen relaciones sexuales con diferentes compañeros. En cuanto a la edad, los mayores niveles de infección se presentan en el periodo de máxima actividad sexual (25-29 años), si bien la tricomonosis afecta a mujeres de mayor edad con más frecuencia que la gonorrea (Burch *et al.*, 1959); así, la tricomonosis se mantiene en unos niveles homogéneos desde los 15 a los 30 años, mientras que la frecuencia de la gonorrea va decreciendo en este intervalo (Lossick, 1990).

Las mujeres de raza negra parecen ser más susceptibles a la infección por *T. vaginalis* y, curiosamente, presentan un mayor riesgo de contraer esta parasitosis que la gonorrea, al contrario de lo que sucede en la raza blanca (Lossick, 1990). La utilización de contraceptivos orales disminuye la incidencia de esta enfermedad, siendo el factor de riesgo, según Lossick aproximadamente la mitad. Las mujeres que han padecido algún tipo de enfermedad de transmisión sexual, presentan mayor predisposición para adquirir tricomonosis.

Siguiendo el artículo de Perea Ortiz y García-Orcóyen, "Trichomoniasis urogenital" (1971), los mecanismos de transmisión se pueden resumir:

A. A través del coito. La mujer infectada, al realizar el acto sexual con hombres sanos les transmite la infección, y éste a su vez puede transmitir el flagelado a otras mujeres sanas. Es por tanto más frecuente en personas de vida sexual más activa. El hombre es con frecuencia portador asintomático del microorganismo, y puede transmitirlo de una mujer a otra por vía sexual, sin que aparezcan en el mismo, signos o síntomas de enfermedad.

B. El contacto homosexual entre mujeres, podría ser otro mecanismo de transmisión. Este es el caso de una mujer con una historia de cuatro meses de elevado flujo vaginal y prurito vulvar. La paciente negó el uso de vibradores o de otros juguetes sexuales, pero admitió haberse masturbado con su pareja (Sivakumar *et al.*, 1989).

C. La promiscuidad, que incluye los contagios que se producen por falta de una educación higiénica. No por ser menos frecuentes son menos importantes. El uso de prendas contaminadas, toallas, esponjas u otros objetos de uso doméstico recientemente contaminados con secreciones de una mujer infectada, pueden ser la explicación de los parásitos hallados en

mujeres vírgenes y niñas (Kessel & Thompson, 1950). Para Biagi (1980) los casos registrados en niñas tienen su origen en la promiscuidad y la falta de aseo. Algunos autores consideran el agua como un importante vehículo que aumenta la frecuencia de esta enfermedad parasitaria en verano, por los baños en las piscinas o en el mar.

D. Ocasionalmente, se citan casos de lactantes que se infectan durante el parto al paso por la vagina de la madre infectada. Teóricamente son casos muy limitados. También es posible que el organismo pueda persistir de una forma asintomática durante años. Así, el diagnóstico de una tricomonosis urogenital en niños antes de la pubertad, debería completarse con una investigación de posibles abusos deshonestos en el niño, aunque no se pueda descartar una hipotética infección congénita.

#### 2.5.2. Factores relacionados con la supervivencia del parásito

1. La humedad: En 1951 Whittington habla de la capacidad de este protozoo de sobrevivir a temperaturas inferiores a 37°C, pudiendo permanecer viable en el agua durante el tiempo necesario para permitir la transmisión. Después de impregnar toallas con exudado vaginal, aisló organismos vivos a los de 10-45 minutos. En otro de sus experimentos, y tras haber infectado a mujeres con toallas que presentaban sedimento urinario con tricomonádidos, encontró que un 37% (11) de las mujeres infectadas presentaban tricomonas, pero que en tan sólo 4 de ellas (36%) pudo recuperar tricomonas viables.

Honigberg y otros (1965) encontraron con viabilidad variable del 8-100% de los parásitos, después de un largo periodo de tiempo a -196 °C. Fuera del organismo, sin embargo, Chester y colaboradores (1986) señalan que *T. vaginalis* sucumbe muy pronto a temperaturas superiores a 40 °C, no resiste la desecación o la luz solar directa, y muere en el agua en un periodo no superior a 35 ó 40 minutos. No obstante, puede sobrevivir en esponjas húmedas durante varias horas y en la orina durante más de 48 horas. Por tanto, aunque la transmisión de la infección durante el baño es poco probable, es posible un contagio venéreo en baños comunitarios, o cuando se comparten utensilios higiénicos. Atias y Neghme (1984) inciden en la posibilidad de que *T. vaginalis*, al sobrevivir en ambientes húmedos durante 6 horas, puede transmitirse a través de aguas termales, lavatorios, lavabos, toallas o ropa interior. El parásito

puede sobrevivir hasta 5 horas en aguas atemperadas entre 18 y 29 °C, y a un pH entre 4,9-7,5.

2. Anticonceptivos orales: La prevalencia de la tricomonosis en mujeres que utilizan algún tipo de contraceptivo oral, es en general menor que en aquellas que no los usan (Lossick, 1990). Parece ser que el estado hormonal de la mujer, y sobre todo de la biocenosis vaginal influyen en la supervivencia del organismo. Si la mujer se encuentra en un estado funcional endocrino normal, existirá un buen trofismo vaginal, con células ricas en glucógeno, una flora de Döderlein adecuada y un pH vaginal ácido, defensores todos ellos de cualquier intrusismo parasitario (Perea y García-Orcoyen, 1971). Si el protozoo se transmite en tales condiciones, puede morir o bien permanecer como saprófito, o en último caso hacerse débilmente patógeno, en espera de alguna ocasión en que las condiciones puedan hacerse más propicias para su desarrollo.

En el caso de existir una insuficiencia estrógenica, ya sea fisiológica o patológica, el medio vaginal se vuelve más receptivo para cualquier tipo de afección, de ahí que la prevalencia de la tricomonosis disminuya en mujeres que toman anticonceptivos orales, ya que estos aumentan los niveles estrogénicos. En este sentido, Trussell, en 1947, encontró el 28,9% de casos positivos en mujeres embarazadas, comparado con el 17,9% en mujeres no gestantes, atribuible a que la concentración de estrógenos disminuye durante el embarazo.

3. pH: Si el medio vaginal es neutro o débilmente ácido, los tricomonas encuentran el pH ideal para su desarrollo. Si es alcalino, igualmente se desarrolla, pero existirán muy frecuentemente otras floras asociadas. La acidez normal de la vagina (pH 4-4,5) evita la infección, pero una vez establecido el organismo causa un aumento de la alcalinidad (pH 5-6) que facilita su crecimiento.

### 2.5.3. Factores relacionados con la prevalencia de la enfermedad

A) Actividad sexual. Dejando al margen los posibles mecanismos de transmisión sexual en ausencia de actividades coitales, parece existir una íntima relación entre el riesgo de adquisición de E.T.S. y número de parejas sexuales. En este sentido, las mujeres que ejercen la prostitución constituyen un grupo de alto riesgo de adquirir tricomonosis, y en general

cualquier enfermedad de transmisión sexual. En un estudio realizado sobre 86 prostitutas en Soria, apareció el protozoo en 19 mujeres (22,10%) (Ulloa *et al.*, 1993).

Lossick (1985) en un estudio en el que fueron examinadas 24.529 mujeres, señala que el porcentaje de mujeres infectadas con tricomonas, -que mantuvieron relaciones con más de una pareja sexual durante los 30 días previos al examen-, fue del 21,30% y no infectadas 19,00%; mientras que los porcentajes en los casos de mujeres infectadas con una o ninguna pareja sexual estable fueron del 28,20% frente a no infectadas 80,98%.

En Sokoto (Nigeria), durante 1990 se realizó un estudio dirigido por Osisanya, sobre 432 mujeres, las 49 (11,34%) muestras positivas fueron aisladas de mujeres con una elevada actividad sexual.

B) La edad. La edad influye de manera indirecta en el índice de prevalencia de la tricomonosis, estando el hecho íntimamente relacionado con los periodos de máxima actividad sexual. Así, los picos de incidencia suelen coincidir con edades en las que se da una máxima actividad sexual heterogénea.

En el estudio realizado por Sánchez-Vega *et al.* (1993), se tomaron 800 muestras de exudado vaginal de las cuales 25 (3,1%) fueron diagnosticadas positivamente de tricomonosis, apareciendo el máximo porcentaje (32%) en el grupo de 30-39 años, seguido del de 20-29 años con 24%.

C) La raza. Algunos autores como Jirovec y Petru (1968), Caterall (1972), Rein y Müller (1984) afirman que las mujeres de raza negra muestran un grado mayor de tricomonosis que las de raza blanca. Los datos recogidos de un estudio realizado a 24.500 mujeres entre los años 1980-85, así lo corroboran. Aproximadamente el 42,3% de los casos diagnosticados positivos, se encontraron en mujeres de raza negra, un 30% en mujeres de otras razas y un 20% en mujeres de raza blanca (Lossick, 1985). En este sentido, entre las encuestas epidemiológicas realizadas hay que destacar el amplio trabajo de Miller y sus colegas (1989) en Baltimore (USA), sobre una población de 3.005 mujeres negras. En pacientes menores de 29 años la

incidencia fue del 22%; en mujeres de 30-59 años del 69% y finalmente en aquellas de más de 60 años tan sólo se encontraron tricomonas en el 9%.

D) Uso de anticonceptivos. El uso de anticonceptivos orales, se asocia a una disminución del riesgo de padecer tricomonosis (von Birnbaum y Kraussold, 1975; Bramley y Kinghorn, 1979), debido a los altos niveles de estrógenos no permiten la infección por *T.vaginalis*.

Lossick (1990) señala que la infección se da más regularmente en mujeres que no usan ningún tipo de contraceptivo (34,5%) frente a DIU (30,5%) y la píldora (20,6%) en un estudio sobre 23.526 mujeres.

No obstante, merece nuestra atención el trabajo realizado por Ganguli *et al.* (1989) que en un estudio epidemiológico realizado en India sobre 240 mujeres que usaban anticonceptivos y 80 que no los usaban sostiene las tesis contrarias. Ambos grupos presentaban un flujo vaginal excesivo y se encontraron tricomonas en el 50 y 21,7% de los casos respectivamente.

E) Infecciones previas por otras enfermedades de transmisión sexual. El padecer o haber padecido otras enfermedades de transmisión sexual aumenta el riesgo de contraer o padecer tricomonosis. Según Rein y Müller (1990), la incidencia de esta parasitosis es mucho mayor en grupos de población con un alto grado de otras E.T.S. En un estudio en Viena (Austria) publicado en 1991 por Kosian y Janisch, sobre 445 mujeres examinadas que acudían con regularidad a una clínica ginecológica, un 7% presentaron monoinfecciones, mientras que el 16% presentó infecciones concurrentes con otros microorganismos del tracto vaginal. También se encontró una interdependencia entre la infección por *T. vaginalis* y el grado de higiene vaginal de las mujeres que acudieron a la consulta.

#### 2.5.4. Prevalencia de la tricomonosis en la mujer

En la década de los 80, según datos de Rein (1990), unos 3 millones de americanas contraían cada año la tricomonosis. Aunque era previsible un descenso en la incidencia,

especialmente en EE.UU. y Europa Occidental como consecuencia de la mayor utilización de preservativos y de los antibióticos para el tratamiento de las vaginitis bacterianas. En 1995, la OMS da cifras de más de 8 millones de casos nuevos cada año sólo en EE.UU.

A pesar de la infinidad de estudios que se realizan sobre la prevalencia de esta enfermedad tanto en mujeres como en varones, prácticamente en su totalidad proceden de poblaciones dispersas o con algún tipo de problemas, tales como pacientes sintomatológicos o personas con afecciones de transmisión sexual. En mujeres asintomáticas asistidas en consultas privadas, las cifras de prevalencia, mediante cultivo, son del 3 al 15%, mientras que entre las prostitutas oscila del 50-75% (Chester *et al.*, 1986). Los datos que se obtienen al azar y en poblaciones amplias, son la excepción, y aquellos que podrían ser de alguna manera aclaratorios o válidos, son normalmente poco representativos de la situación actual. De esta forma, al realizar una revisión de la epidemiología de esta parasitosis a nivel mundial, nos encontramos con muchos estudios y una gran variedad de rangos de prevalencia. Algunos pueden ser agrupados, otros no siguen ningún patrón, por lo que es difícil encuadrarlos bajo diferentes epígrafes. Teniendo en cuenta que la incidencia depende de muchos factores, como la edad, actividad sexual, número de parejas, hábitos sexuales, ETSs, ciclo menstrual, así como la técnica de examen, recogida y diagnóstico de laboratorio. En la tabla 2.2. se dan porcentajes de prevalencia, en distintas encuestas efectuadas y las características más sobresalientes esquemáticamente:



TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana (II)

Autor	Año	Lugar	Número pacientes (Edad)	Síntomas o caracteres específicos	Prevalencia %
Sarwat, M.A.; Al-Shaiby	1987-1992	Arabia Saudí	53784	Examen orina	3,9
Radha, P.; Jaykar, P.	1988*	Visakhapatnam, India	150 (15-70)	Leucorrea (Máx. 20-29)	11,0
Meijden, W.I. <i>et al.</i>	1988*	Países Bajos	90		33,3
Atanu Ray <i>et al.</i>	1989*	India	100 50	Vaginitis Sanas	11,0 0,0
Tanaka, T.; Kaneda, Y.	1989*	Japón	224	Aleatorias	8,5
Mason, P.R. <i>et al.</i>	1989*	Zimbabwe	214	Parto reciente	19,0
Kadir, M.A.; Aziz, L.J.	1989*	Kirkuk, Iraq	646	Flujo vaginal	8,0
Ganguli, G. <i>et al.</i>	1989*	Allahabad, India	24080	Flujo vaginal Anticonc. (1*) No Anticonc.	50,0 21,7
Davies, A.G.; Clay, J.C.	1989	Birmingham, UK	110	14 ETS Víct. violación	6,0
Miller, J.M. <i>et al.</i>	1989*	Baltimore, USA	3.005 <29 30-59 >60	Mujeres de raza negra	22,0 69,0 9,0
Osisanya, J.O. <i>et al.</i>	1990*	Sokoto, Nigeria	432 20-29	Vaginitis por tricomonas Máx. actividad sexual	11,3
Damiba, A.E. <i>et al.</i>	1990*	Ougadougou, Burkina Faso	127	Prostitutas	17,0
Seller, J.P. <i>et al.</i>	1990*	Área rural de Botswana	114	Embarazadas	48,0

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana

Autor	Año	Lugar	Número pacientes (Edad)	Síntomas o caracteres específicos	Prevalencia %
Kurnatowska, A. <i>et al.</i>  (4*)	1960-	Lodz, Polonia	19024	Clínica pediátrica	4,9
	1985		33133	Centro enferm. parasitarias.	7,0
Karpdamdin, M <i>et al.</i>	1975-	Rzeszow, Polonia	18.772 (16-60)	Clínic. ginec.	5,4
	1983			Clínic. ETS	16,5
Mulcahy, F.; Lacey, C.J.N.	1978- 1985	Leeds, UK	210 (12-16)	Chicas adolescentes	16,0
Grygierczyk; Lastowka, M  (3*)	1979-	Polonia	31842 (16-82)		5,9
	1983				34,0
Kadir, M. <i>et al.</i>	1984	Iraq	300	Problemas variados (2*)	10,0
Zmirou, D. <i>et al.</i>	1984- 1985	Sureste Francia	1022		6,0
Urabe, S. <i>et al.</i>	1985	Fukuoka, Japón	161		8,7
Carneri, I. de <i>et al.</i>	1985- 1986	Lombardia, Italia	154		10,0
Urabe, S. <i>et al.</i>	1986	Fukuoka, Japón	123	Prostitutas	5,7
O'Farrell, N. <i>et al.</i>	1987	Kwa-Zulu, Suráfrica	193	Patogenia sexuales Embarazadas	49,2
Gardner, J.J.  (5*)	1987-	Perth, Australia	209	Pacientes	0,5
	1988		108 (2-15)	Controles	0,0
Carneri, I. de <i>et al.</i>	1987- 1988	Lombardia, Italia	160		3,0

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana (III)

Autor	Año	Lugar	Número pacientes (Edad)	Síntomas o caracteres específicos	Prevalencia %
Charles, S.X.	1991*	Nagercoil, India	215 (12-33)	En clínicas ETS	40,9
Omer, E.E. <i>et al.</i>	1991*	Khartoum, Sudan	393 (16-65)	Flujo vaginal	26,5
Kosian, K. <i>et al.</i>	1991*	Viena, Austria	445	Mono infección <i>T. vag.</i> + otros	7,0 16,0
Ogbonna, C.I. <i>et al.</i>	1991*	Jos, Nigeria	250250	Mujer ciudad Mujer campo (Embarazadas)	37,6 24,8
Choubisa, S. Choubisa, L.	1991*	Rajasthan, India	340	Vaginitis	70,6
Özbilgin, A. <i>et al.</i>	1992*	Turkey	100 (18-45)	Uretritis no gonocócica	12,0
Cohn, M ; Stewart, P.	1992*	Sheffield, UK	1784	Al final de embarazo	30,0
Coulibaly, S.O. <i>et al.</i>	1992	Ougadougou; Burkina Faso	167	Leucorrea	11,4
Borchardt, K.A. <i>et al.</i>	1992*	San José, Costa Rica	100 (18-70)	57 Clínc. ETS 43 Hospitales	19,0 4,6
Peer, A.K. <i>et al.</i>	1993*	Durban, Suráfrica	203 (18-70)	89 sint. 114 asint. Mujeres diabéticas	14,3
Isa, A.R. <i>et al.</i>	1993*	Malasia	130	Mujeres drogadictas	19,2
Younis, N. <i>et al.</i>	1993*	El Cairo, Egipto	509	Casadas no embarazadas	18,3
Sánchez Vega, J.T. <i>et al.</i>	1993*	México	800	Leucorrea Prurito	3,1

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana (IV)

Autor	Año	Lugar	Número pacientes (Edad)	Síntomas o caracteres específicos	Prevalencia %
Das, A. <i>et al.</i>	1994*	Calcutta, India	418	202 F. vaginal (48.32%) Prostitutas	15,1
Pal, N.K. <i>et al.</i>	1994*	Calcutta, India		Prostitutas	11,1
Krieger, J.N.	1995	Seattle (EE.UU.)	447 ♂	Población de riesgo de E.T.S. 54% descarga uretral	11,0
Jamison, J. H. <i>et al.</i>	1995	Colorado (EE.UU.)	634	Adolescentes Papilomavirus	5,4
Klufio, C. A. <i>et al.</i>	1995	Papúa Nueva Guinea	206	Pacientes Estudio Demográfico	19,0
Borchardt, K. A. <i>et al.</i>	1995	S. Francisco (EE.UU.)	204 ♂ (17-72)	Pacientes Sed. urinario	12,0
Zhang, Z. F.	1995	Jingan (China)	16.797 (>25)	Diagnóstico cervical	2,5
Alonso-Sanz, M. <i>et al.</i>	1996	Madrid (España)	133	Reclusas Otras ETS	32,0
Tanyuksel, M. <i>et al.</i>	1996	Ankara (Turquía)	225	Prostitutas legalizadas	25,0
Rivera, L. R. <i>et al.</i>	1996	Cuernavaca (México)	405	Epid. mujeres jóvenes	1,7
Ledru, S. <i>et al.</i>	1996	Bobo-Dioulasso (Burkina Faso)	223	Infecciones genitourinarias	27,8
Brito, E. B. <i>et al.</i>	1996	Amazonia (Brasil)	80	Indios brasileños	7,3

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana (v)

Autor	Año	Lugar	Número pacientes (Edad)	Síntomas o caracteres específicos	Prevalencia %
Wilson, T. E. <i>et al.</i>	1996	Nueva York (EE.UU.)	332 gestantes	Riesgos de ETS en gestantes y no gestantes	23,4
			1069 controles		17,7
Tiwara T. <i>et al.</i>	1996	Papúa Nueva Guinea	444	Ámbito rural	46,0
Wilkinson, D. <i>et al.</i>	1997	Hlabisa (Suráfrica)	189 ( $\bar{x}$ = 25)	Clínica de planificación familiar Asintomáticas	26,1
Yereli, K. <i>et al.</i>	1997	Manisa (Turquía)	207	Flujo vaginal	13,1
Morrison, C. S. <i>et al.</i>	1997	Lusaka (Zambia)	58 $\sigma$ 41 $\varphi$	Casados ETS	14,0
Dowe, G. <i>et al.</i>	1997	Kingston (Jamaica)	129	Prostitución	0,0
Spinillo, A. <i>et al.</i>	1997	Pavia (Italia)	148 (>65)	Clínica de Obstetricia y Ginecología	37,8
			1564 (<65)		53,3
Jackson, D.J. <i>et al.</i>	1997	Nairobi (Kenya)	504	Trabajadores transporte	6,0
Passey, M. <i>et al.</i>	1998	Goroka Papúa Nueva Guinea		Ámbito rural	46,0
Mayaud, P. <i>et al.</i>	1998	Mwanza (Tanzania)	660	Gestantes	16,0
Ramjee, G. <i>et al.</i>	1998	KwaZulu Natal (Suráfrica)	145	Prostitutas	41,3
Shuter, J. <i>et al.</i>	1998	Nueva York (EE.UU.)	213	Reclusas gestantes	46,9

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana

Autor	Año	Lugar	Número pacientes (Edad)	Síntomas o caracteres específicos	Prevalencia %
Schneider, H. <i>et al.</i>	1998	Johannesburgo (Suráfrica)	249	Área rural Planificación familiar	18,0
Barberis, H. <i>et al.</i>	1998	Río Cuarto (Argentina)	1060	Estudio de ETS	17,3
Minkoff, H.L. <i>et al.</i>	1999	Nueva York (EE. UU.)	292 VIH+	Prevalencia de desórdenes ginecológicos en VIH+	10,3
Fortenberry, J. D. <i>et al.</i>	1999	Indianápolis (EE.UU.)	(15-19)	ETS entre adolescentes	> 40,0

(\*) Las fechas señaladas, indican el año en que se publicó el estudio.

Datos aclaratorios de la revisión:

(1\*) Se estudiaron los frotis vaginales de 240 mujeres que usaban anticonceptivos orales, y que presentaban un alto flujo vaginal. El 50% de las mujeres examinadas tenían o padecían tricomoniasis, en comparación con el 21.7% de 80 mujeres que no usaban anticonceptivos orales. Tanto *Candida sp.* como *Trichomonas vaginalis* fueron más comunes en mujeres de bajo *status* socioeconómico y en mujeres que habían tenido tres o cuatro niños, que en mujeres de alto *status* económico y en mujeres nulíparas.

(2\*) Todas las mujeres que participaron en el estudio estaban casadas, 1/3 eran infértiles, y el resto se lamentó de un excesivo flujo vaginal durante el embarazo, o durante inusuales períodos de tiempo tras el parto.

(3\*) Las muestras de útero y uretra procedentes de 31.842 mujeres con edades comprendidas entre los 16 y los 82 años, fueron examinadas en el Hospital Byton, en Polonia, entre los años 1979 y 1983. En estos cinco años, se produjo un extraordinario aumento de la prevalencia de la tricomoniasis: de 5.9 a un 34%.

(4\*) Entre los años 1960 y 1985, se estudiaron 19.024 chicas con edades comprendidas entre 0-18 años, en una Clínica Pediátrica y Ginecológica, y en un Centro de Tratamiento de Enfermedades Parasitarias y Micóticas, en Lodz, Polonia. Se pudo observar de 2 a 6 veces menos casos de tricomoniasis, en los dos grupos en esos cinco años de estudio.

(5\*) La flora vaginal de 209 niñas, fue estudiada y comparada con un grupo control de 108 niñas, en la Unidad de Abusos Sexuales a niños, en el Hospital para niños Princess Margaret, Perth, Oeste de Australia, entre Enero de 1987 y Diciembre de 1988. De los 209 casos, tan sólo uno se reveló como positivo, y dentro de los 108 controles no apareció ninguno.

## 2.6. TRATAMIENTO DE LA TRICOMONOSIS

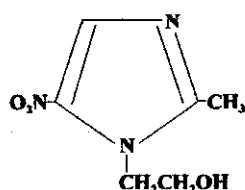
En el año 1954, el laboratorio farmacéutico francés Rhône-Poulenc encontró un nuevo agente tricomonocida al estudiar una gran variedad de antibióticos, antimaláricos y amebicidas (Lossick, 1990). Dicho agente precursor de los 5-nitroimidazoles, recibió el nombre de metronidazol (1-(2- hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol), aunque no fue hasta 1960 cuando se comercializó con el nombre de Flagyl®.

Con anterioridad, el tratamiento de la tricomonosis se reducía a la aplicación de agentes tópicos e irrigaciones vaginales de escaso valor terapéutico. Entre los compuestos empleados se encontraban: sales arsenicales (compuestos inorgánicos), ácidos y tiosemicarbazonas (compuestos orgánicos acíclicos), carbasonas (compuestos orgánicos isocíclicos) y nitrofuranos (compuestos orgánicos heterocíclicos), y sobre todo, la azomicina, aislada de *Streptomyces* y que, en virtud de su estructura, fue el verdadero precursor de los 5-nitroimidazoles.

El compuesto cabeza de serie es el metronidazol, experimentalmente ensayado en 1959 por Cosar y Julou, y llevado a ensayos clínicos de tipo II un año más tarde. El segundo nitroimidazol, el nimorazol, fue descubierto en Italia en 1969 (Carneri *et al.*, 1969), y poco después surgió el tinidazol (Miller *et al.*, 1969). Otros nitroimidazoles más recientes son el ornidazol, secnidazol, carnidazol, misonidazol y satranidazol. A pesar de ello, el metronidazol sigue siendo el más utilizado y se considera el tratamiento estándar para las infecciones de *T. vaginalis*.

La dosis habitual es 250 mg por vía oral, tres veces al día durante 7 días, o una dosis única de 2 g Tanto al paciente como a su compañero/a sexual; ya sean sintomáticos o asintomáticos deben ser tratados para prevenir la reinfección.

### 2.6.1. Estructura y propiedades fisico-químicas de metronidazol



Estructura:	1-(2-hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol.
Propiedades:	P.m.: 171,2.
Presentación:	Polvo cristalino e inodoro de color amarillo pálido o blanco.
Punto de fusión:	159-162 °C.
Solubilidad:	1/100 en agua, 1/200 en etanol, 1/250 en cloroformo, soluble en ácidos diluidos, ligeramente solubles en éter, escasamente soluble en dimetilformamida..

### 2.6.2. Espectro antiinfeccioso

Metronidazol es muy activo frente a la mayoría de las bacterias anaerobias. Es activo frente a bacilos anaerobios Gram negativos no formadores de esporas, bacilos formadores de esporas y cocos Gram positivos.

Las bacterias Gram positivas no esporuladas son bastantes resistentes. Es más activo frente a ciertos anaerobios facultativos. La mayoría de las bacterias aerobias son resistentes al compuesto nitroimidazólico.

Presenta acción antiprotozoósica frente a *T. vaginalis*, *Tritrichomonas foetus*, *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*. Es ineficaz frente a hongos y levaduras del tipo *Candida* sp.

### 2.6.3. Uso

Se emplea en el tratamiento de la tricomonosis, amebosis, giardiosis e infecciones por anaerobios. También, como profiláctico en cirugía intestinal asociado a veces con kanamicina y en caso de vaginitis no específicas. Así mismo, se utiliza como coadyuvante en radioterapia del cáncer, debido a su efecto radiosensibilizador en células hipóxicas pero no en tejidos normalmente oxigenados, junto con el hecho de que su grupo nitro es capaz de reaccionar rápidamente con radicales orgánicos libres generados por radiación. También se ha empleado en el tratamiento del alcoholismo ya que tiene un efecto semejante al disulfirano.



#### 2.6.4. Mecanismo de actuación de los 5-nitroimidazoles

Los nitroimidazoles no son citocidas *per se* por lo que requieren ser metabolizados (Heine & McGregor, 1993). Metronidazol penetra en el protozoo por difusión pasiva y es activado en los hidrogenosomas. El grupo nitro es reducido anaeróticamente por la enzima piruvato-ferredoxin oxidorreductasa, dando lugar a radicales nitro citotóxicos que reaccionan con el ADN (Tocher & Edwards, 1994), interrumpiendo la síntesis de ácidos nucleicos, lo que produce finalmente la muerte del organismo (Ings *et al.*, 1974).

La gran especificidad del metronidazol frente a microorganismos anaerobios parece ser debida a que en los organismos sensibles, la ferredoxina o proteínas similares (flavodoxina) actúan como transportadores electrónicos, y cuando se produce una interacción del grupo nitro del metronidazol con el sistema redox, la ferredoxina es oxidada y el grupo nitroimidazol es reducido. La reducción hace decrecer la concentración intracelular de producto en su forma oxidada y permite un aumento de la captación del fármaco por la célula (Ings *et al.*, 1974). Dicha captación depende, por tanto, de la concentración extracelular de metronidazol (Müller *et al.*, 1978).

*T. vaginalis* produce  $H_2$  y  $CO_2$  a partir de piruvato, tratándose de una reacción piruvato deshidrogenasa-ferredoxin oxidorreductasa, como se demostró en *Tritrichomonas foetus* (Marczak *et al.*, 1983). En este tipo de reacción el piruvato se combina con fosfato, produciendo acetil fosfato,  $H_2$  y  $CO_2$ , y requiere coenzima A y ferredoxina.

De esta forma, metronidazol y otros productos análogos en condiciones de anaerobiosis no sólo impiden la síntesis de ADN, al inhibir la captación de timidina, sino que promueven la degradación del existente por rotura de la hélice sobre los restos de adenina o timina, mayoritariamente sobre esta última. Así se explican las diferencias en cuanto a las concentraciones letales entre *T. vaginalis* o *Entamoeba histolytica* y *Rhodopseudomonas acidofila*, que requieren dosis 25 veces mayores, en virtud, probablemente del porcentaje de A+T en el ADN de estos organismos, que se sitúa en un 70% para los primeros y en un 35% para el último (Edwards *et al.*, 1974).

Se han citado varios factores que afectan al mecanismo de acción de los 5-nitroimidazoles; uno de ellos es la presencia de oxígeno que, cuando se mantiene a una determinada presión parcial, actúa como detoxificante, reoxidando al grupo nitro para regenerar el compuesto inicial, lo que retardaría la entrada al interior de la célula de más fármaco (Pérez-Rayes *et al.*, 1980). Por esta razón, los compuestos con mayor potencial redox, como son tinidazol y satranidazol, mejoran la actividad antitricomoniasis del metronidazol (Gowrishankar *et al.*, 1985).

Igualmente, los organismos que presenten oxidasas de alta afinidad retirarán el oxígeno del entorno, impidiendo la reoxidación al compuesto inicial. No obstante, el efecto inhibitor del oxígeno es menor del esperado, ya que las hidrogenasas citosólicas, NADH y NADPH, funcionan como secuestradoras de oxígeno, asegurando un ambiente más reducido en los hidrogenosomas. El nivel de intracelular de tioles, en particular de glutatión, que disminuye la citotoxicidad de los fármacos (Shrieve *et al.*, 1984) y la capacidad de reparación del ADN son otros de los factores que modifican el efecto de los nitroimidazoles.

Aunque los ensayos clínicos no han mostrado diferencias significativas de eficacia entre los distintos nitroimidazoles, tanto *in vitro* como *in vivo* los compuestos con mayor potencial redox han mostrado mayor eficacia, en especial satranidazol, el nitroimidazol más reciente.

## 2.7. CRIBADO FARMACOLÓGICO IN VITRO FRENTE A *T. vaginalis*

### 2.7.1. Cribado farmacológico *in vitro* frente a *T. vaginalis*

La creciente presencia de tricomonosis resistentes al tratamiento con metronidazol, ampliamente documentada en Europa, U.S.A. (Heyworth *et al.*, 1980; Muller *et al.*, 1980; Taylor-Robinson & Street, 1982; Dombroski *et al.*, 1987) y en Asia (Sucharit *et al.*, 1979; Sithithaworn *et al.*, 1989), los efectos secundarios como náuseas, vómitos y anorexia (Lossick, 1990) y los efectos adversos mutagénicos (Jhan, 1982) y carcinogénicos (Friedman & Selby, 1989, Zhang & Begg, 1994) que se han venido paliando, parcialmente, con el diseño de nuevos 5-nitroimidazoles, parecen justificar plenamente la incesante búsqueda de principios activos de eficacia antiparasitaria, a través del modelo experimental y la posterior elucidación de la

relación estructura-actividad. No obstante, pueden existir otras causas, de naturaleza terapéutica en los hipotéticos fracasos clínicos frente a la infección por *T. vaginalis*, como son el hecho de que ambos componentes de la pareja sexual necesitan ser tratados; o bien de naturaleza fisiológica, como parece ser la pobre absorción de metronidazol (Kane *et al.*, 1961), o la destrucción del fármaco por bacterias o levaduras presentes entre la flora intestinal o vaginal (Nicol, 1966).

Sin embargo, Meingassner *et al.* (1978), realizando ensayos de quimiosensibilidad frente a *T. vaginalis* en condiciones axénicas, demostraron que persisten las cepas refractarias al tratamiento con metronidazol.

La alta variedad de ensayos farmacológicos *in vitro* que emplean distintos medios, cepas, inóculos y, sobre todo, condiciones experimentales dificultan la comparación de resultados en diferentes condiciones de trabajo. En la tabla 2.3., a continuación, se recogen los criterios de evaluación y expresión de la actividad tricomonida más interesantes que, en mayor o menor medida, han influido en la metodología seguida en este trabajo.

Los únicos inconvenientes de los métodos de cribado farmacológico descritos parecen ser la laboriosidad del recuento microscópico directo en hemocitómetro y cierta subjetividad en la valoración de la viabilidad de los tricomonádidos.

**TABLA 2.3.** Criterios de evaluación de la actividad tricomonocida a nivel experimental

AUTORES	MEDIO	CRITERIO
Michaels & Strube (1961)	TIOGLICOLATO + 5% SUERO EQUINO (S.E.).	Concentración que inhibe el 90% del crecimiento de los flagelados respecto a los testigos.
Cavier (1969)	VARIOS (TYM).  Estudios sobre la influencia de factores como el medio de cultivo, cepa e inóculo.	1.CMI: Mínima concentración inhibe completamente el desarrollo. 2.CMC: Mínima concentración que elimina a todos los flagelados en 48 horas.
Howes <i>et al.</i> (1969)	TYM + 5% SUERO EQUINO.	Determinación de flagelados al cabo de 24 (48) horas respecto a la resiembra inicial. 1.CMI: Concentración mínima inhibitoria ( 0,5 org/ml). 2.CMC: Concentración mínima citocida.
Buchner & Edwards(1975)	TYM + 5% SUERO EQUINO.	Actividad en función de la movilidad o la lisis de flagelados.
Kurnatowska <i>et al.</i> (1981)	TYM + 5% SUERO EQUINO.	Conc. de producto que mata los protozoos tras 30 minutos.
Berthelot <i>et al.</i> (1991)	MAGARA + SUERO EQUINO.	Concentración que inhibe completamente el crecimiento de los cultivos después de 48 horas.
Bourée et Isoire(1992)	ROIRON + SUERO EQUINO.	1.CML: Concentración mínima letal a 1, 6 y 24 horas.
Loiseau <i>et al.</i> (1993)	TIOGLICOLATO + 5 % S.E.	1.CMI y 2.CML en 48 horas.
Alcalde <i>et al.</i> (1995)	DIAMOND MODIFICADO + 10% SUERO EQUINO.	1.CML: Eliminar todos los parásitos en 24 horas. 2.DL <sub>50</sub> : Mínima concentración reduce el nº de parásitos al 50%.
Debbia <i>et al.</i> (1996)	DIAMOND MODIFICADO + 10% SUERO EQUINO.	1.CML: Mínima concentración a la que no se observa la motilidad de los protozoos.
Gavini <i>et al.</i> (1997)	CACH (CM 161) + S.E.	1.CMI (Placas de microtitulación).
Danan <i>et al.</i> , (1997)	TYM + 10% SUERO EQUINO.	Inhibición del crecimiento comparado con los controles no tratados y PROBIT.

ABREVIATURAS:

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.  
CMC: Concentración Mínima Citocida.

CML: Concentración Mínima Letal.  
DL50: Dosis Letal 50.

Cerkasovová *et al.* (1988) propusieron la estandarización de las condiciones para el cribado farmacológico *in vitro*, recomendando la utilización de cepas catalogadas en la A.T.C.C. Asimismo, se sugiere que los ensayos *in vitro* deben realizarse en condiciones axénicas, en pequeño volumen (0,2 ml) y con un tiempo de exposición óptimo de 48 horas. El inóculo sugerido, para la cantidad de medio señalada, debe ser aproximadamente 75.000 organismos/pocillo. Estas premisas establecidas en condiciones aeróbicas pueden extrapolarse, según creemos, al ensayo quimioterápico en condiciones anaeróbicas.

### 2.7.2. Contribución de los extractos vegetales en el desarrollo farmacológico de antiprotozoósicos

El uso de la medicina tradicional está ampliamente extendido en todo el mundo y las plantas, componentes de excepcional protagonismo en dichas prácticas curativas, representan una importante fuente de nuevos compuestos estructurales que sirven para dirigir el desarrollo de nuevos fármacos (Heras *et al.*, 1998).

La industria farmacéutica en la actualidad dirige grandes esfuerzos al hallazgo de nuevos compuestos con actividades biológicas específicas, mediante el cribado farmacológico de extractos directos de plantas. Una vez que se determina que estos extractos cumplen los requisitos de actividad mínima adecuados, se observa si su evaluación secundaria se adapta a los requerimientos necesarios (COTEC, 1997).

Cuando se llega a este punto hay que utilizar una metodología que permita identificar, lo antes posible, los compuestos ya descritos para que el esfuerzo de aislamiento y determinación estructural se centre únicamente en las sustancias verdaderamente interesantes. Para cumplir estos objetivos se requiere una purificación rápida y simple de las muestras por cromatografía en fase sólida, y para la obtención de la información estructural es aconsejable la cromatografía de gases y la espectroscopia de masas. Los compuestos obtenidos y caracterizados, constituyen la base sobre la que se realizan *a posteriori* las modificaciones para mejorar su actividad biológica, con el fin de conseguir el agente terapéutico más apropiado.

Siguiendo esta metodología, alcaloides de la berberina (*Berberis aristata*) han demostrado su eficacia experimental y clínica frente a la leishmaniosis visceral (Das Gupta & Dikshit, 1929; Ghosh *et al.*, 1983, 1985; Vennerstrom *et al.*, 1990) y cutánea (Devi, 1929; Putzer, 1934; Neal, 1964), asimismo se ha comprobado su actividad frente a la giardiosis (Gupte, 1975) y la amebosis (Subbaiah & Amin, 1967). Recientemente, se ha evaluado el efecto de la berberina sobre cultivos axénicos de protozoos de metabolismo anaerobio (*Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* y *Trichomonas vaginalis*), mostrando su potencial actividad inhibitoria del crecimiento (Kaneda *et al.*, 1991).

González (1990) ensaya 17 extractos naturales de plantas autóctonas de Chile frente a formas sanguíneas de *T. cruzi in vitro* a 4°C por el método de Cover (1982). Entre los extractos con actividad tripanocida más relevante, en las condiciones experimentales, señalan: *Gelidium pusillum* (Gelidaceae), *Myroglia glandis* (Chordariaceae), *Bacharis boliviensis* y *Senecio graveolens* (Compositae). Por su parte, Cardoso (1990) ensaya *in vitro* 48 extractos alcohólicos de especies de plantas de la familia Compositae autóctonas de Brasil contra tripomastigotes sanguíneos de la cepa Y, obteniendo lisis total con los extractos de *Pluchea quitoc* y de *Trixis vauthieri*.

Por su parte, la recuperación de la medicina tradicional a través de la aplicación del método científico (cribado farmacológico) ha permitido restituir principios activos presentes en el acervo cultural desde siempre y completamente vigentes.

En este sentido, baste como ejemplo los estudios etnofarmacológicos de plantas guatemaltecas realizados por Cáceres *et al.* (1998), sobre los extractos vegetales de *Neurolaena lobata*, *Solanum americanum*, *Acalypha guatemalensis*, *Petiveria alliacea* y *Tridax procumbens* con propiedades antiprotozoósicas, frente a *Trypanosoma cruzi*. Tales ensayos se completan con los de Berger y colaboradores (1998), que realizan el cribado frente a formas tripomastigote y epimastigote de *T. cruzi* destacando las mismas especies vegetales.

Desde 1990, se vienen desarrollando en España, a través de ASAC Pharmaceutical International A.I.E., proyectos de I+D encaminados al estudio científico de plantas de la

medicina centenaria de los indígenas americanos procedentes de Iberoamérica, en el programa IBEROEKA 003. En particular, con el título “Cribado y aislamiento de principios farmacológicamente activos de plantas iberoamericanas” se establece un proyecto cuyos objetivos son la selección etnobotánica e identificación taxonómica; la extracción y ensayos básicos de actividad, y el fraccionamiento y valoración de actividades farmacológicas: antitumorales, antivirales, antiinflamatorias, inmunomoduladoras y antiparasitarias de extractos vegetales.

De las 60 plantas estudiadas, se encontró actividad en 12 de ellas, lo que dio origen a una segunda fase del proyecto IBEROEKA 003, cuyo objetivo es el “*Aislamiento y análisis de los principios activos seleccionados*”, el fraccionamiento de los extractos se lleva a cabo por distintas técnicas cromatográficas. En esta nueva etapa se incorporó el estudio de 30 nuevas plantas, iniciando su investigación en 1996 (COTEC, 1997). Nuestra aportación en el proyecto ha consistido en el desarrollo del cribado farmacológico antiparasitario, en particular sobre *T. vaginalis*; cuyos resultados se presentan en esta Memoria.

## 2.8. MODELOS MURINOS DE PATOGENIA EXPERIMENTAL DE *Trichomonas vaginalis*

La primera infección experimental con *T. vaginalis* se desarrolló con éxito en ratones de laboratorio (*Mus musculus*, L.) por Schnitzer *et al.* en 1950. Estos autores realizan las primeras descripciones de las lesiones provocadas en el ratón por el protozoo tras inoculaciones de tipo subcutáneo, intraperitoneal e intramuscular. Actualmente numerosos investigadores usan roedores de laboratorio en estudios de interacciones parásito-hospedador, ensayos de virulencia y cribado farmacológico. El ratón ha sido el animal más ampliamente utilizado pero también ratas, cobayos y cricetos dorados. Las rutas de inoculación más frecuentes son la intraperitoneal, subcutánea e intravaginal.

La literatura al respecto es abundante; no obstante, se puede señalar a Trusell (1947), quien recoge los datos iniciales sobre la experimentación animal con *T. vaginalis*. Después los objetivos fueron revisados (Schnitzer, 1963; Michaels, 1968; Jírovec *et al.*, 1968; Meingassner

*et al.*, 1981), pasando a utilizarse con mayor énfasis los animales de laboratorio en ensayos de quimioterapia experimental. La revisión más completa publicada pertenece a Honigberg (1978).

Sin embargo, no todos los datos obtenidos en la experimentación animal contribuyen significativamente al conocimiento de la enfermedad y del parásito. El complejo ambiente vaginal, cambiante en función del ciclo hormonal y de la respuesta del parásito, difícilmente puede encontrar comparación en la experimentación animal (excepto en algunos primates no humanos).

La elección de un modelo animal para el estudio de la tricomonosis humana es difícil de realizar satisfactoriamente. Las infecciones intravaginales de animales simulan en mayor medida la enfermedad humana, pero el parásito provoca condiciones distintas a las del tracto genitourinario humano. Las infecciones ectópicas exponen al parásito a la respuesta del hospedador que no ocurre en el sitio natural. Los modelos animales pueden proporcionarnos valiosa información, si se tienen en cuenta aspectos específicos de la localización e interacción parásito-hospedador. Por otra parte, el conocimiento del límite de los modelos nos permitirá establecer interpretaciones más adecuadas.

### 2.8.1. INFECCIONES VAGINALES

Los modelos experimentales de infección intravaginal de *T. vaginalis* proporcionan manifestaciones similares a las que se señalan en la tricomonosis urogenital humana. Esta ruta de inoculación presenta numerosas dificultades técnicas y se ha llevado a cabo, en general, con limitado éxito. Se ha realizado en mono, cobayo, criceto dorado, rata y ratón. El pretratamiento del ratón con estrógenos es esencial para que prenda la infección experimental, pero la ovariectomía no es necesaria. A pesar de todo, la susceptibilidad de los animales de laboratorio a la infección intravaginal está supeditada a su estado endocrino y la fase de su ciclo sexual. El reconocimiento erróneo de estas propiedades puede ser la fuente principal de dificultades al infectar los animales. Datos básicos sobre la fisiología reproductiva de los animales de experimentación, que pueden ser de interés para el establecimiento del parásito de forma intravaginal, se recogen en trabajos como los del UFAW (1976) o de Melby y Altman (1974).



Para el establecimiento intravaginal de la infección experimental de *T. vaginalis* en ratón (*Mus musculus*, L.) (Wildfever, 1974; Cappuccinelli *et al.*, 1974; Meingassner, 1977; Coombs *et al.*, 1987) se han utilizado diferentes formas de inoculación:

- 1.- A partir de cultivos axénicos del parásito, sobre hembras adultas y tratadas estrogénicamente.
- 2.- Por pases seriados de ratón a ratón, donde los tricomonas del inóculo proceden de lavados vaginales.
- 3.- A través de transmisión sexual, por cruces de un macho con hembras pretratadas con estrógenos, infectadas y no infectadas (Cappuccinelli *et al.*, 1974).

Sin embargo, el modelo no ha sido elaborado suficientemente, lo que impide abordar dos aspectos fundamentales, el cribado farmacológico de productos activos y el estudio de las interacciones parásito-hospedador.

Según Cappuccinelli y su equipo (1974), el tratamiento estrogénico sólo es necesario para la instauración de la infección, ya que posteriormente no es necesario un aporte exógeno de hormonas para que el proceso infeccioso siga su curso. La duración es variable, entre una semana y tres meses.

La fase del ciclo sexual y el tiempo entre la administración de los estrógenos y la inoculación de los parásitos son las circunstancias clave para el éxito en el establecimiento del parásito. El porcentaje de infección es mayor, según se ha observado, en el periodo de proestro temprano (Coombs *et al.*, 1987).

Algunos investigadores recomiendan repetidas inoculaciones (Cappuccinelli *et al.*, 1974), o bien inóculos suficientemente elevados, en torno a  $5 \times 10^5$  tricomonas, en una dosis única (Coombs *et al.*, 1987) para lograr la infección. La introducción de tampones de gelatina en la vagina permiten con menor inóculo incrementar significativamente el porcentaje de infección.

El proceso experimental se realiza previa anestesia del ratón con barbiturato (200 mg/Kg de exobarbital sódico) por vía intraperitoneal. Los protocolos de inoculación son variables dependiendo de la experiencia del grupo investigador (TABLA 2.4.).

Por lo general, se emplean hembras adultas (25-30 g), que son pretratadas con derivados de estradiol inoculados por vía subcutánea. La inoculación se produce entre los días 3° al 7° de la administración de estrógenos. El inóculo en dosis única o múltiple alrededor de  $10^5$  tricomonas en 0,02 ml de medio de cultivo Diamond y 0,03% de agar. La inoculación se realiza con una jeringuilla de insulina de aguja roma. Para examinar al ratón anestesiado, la vagina es lavada con 0,02 ml de medio de cultivo y la muestra es transferida a un pequeño volumen suplementado con antibióticos. No parece existir especificidad de hospedador, al menos para las cepas utilizadas (Cappuccinelli *et al.*, 1974; Coombs *et al.*, 1987).

El porcentaje de infección es muy variable, según las experiencias y el número de animales inoculados, entre el 15-100%. De otra parte, se ha observado la respuesta de ratones inoculados de forma repetida y sucesiva, resultando que el número que se vuelve a infectar en cada grupo es menor, alcanzando excepcionalmente de 1-3 meses algunos animales. Después de repetidas dosis elevadas,  $10^6$  tricomonas, se producen infecciones en la cavidad abdominal, que pueden causar lesiones letales en los órganos.

**TABLA 2.4.** Protocolos de trabajo para la infección vaginal de ratones de laboratorio con *T. vaginalis*.

AUTOR	TRATAMIENTO	PESO RATÓN (g)	PROTOCOLO INFECCIÓN	Nº TOTAL ANIMALES	PERIODO DE INFECCIÓN
Cappuccinelli <i>et al.</i> (1974)	Valerato de estradiol. 0,5 mg/animal. 10 días. Inoculación subcutánea.	30	3 días después de hormonas. 2 x 10 <sup>6</sup> Tric./ 0,05 ml.	48 Porcentaje de infección: 52%	> 40 días.
Meingassner (1977)	Undecilato de estradiol. 40 mg/kg. Dos dosis. I. subcutánea e intraperitoneal.	25-30	3 días después de hormonas. 10 <sup>5</sup> Tric. + <i>C. albicans</i> 0,05 ml.	27 Porcentaje de infección: 94%	No descrito.
Wildfever (1974)	Benzoato de estradiol microcristalino. 0,5 mg/animal. Semanal. I. subcutánea.	18-20	7 días después de hormonas. 1,5 x 10 <sup>5</sup> Tric. en 0,05 ml.	77 Porcentaje de infección : 26%	14-21 días.
Wildfever (1974)	Benzoato de estradiol microcristalino. 0,5 mg/animal. Semanal. I. subcutánea.	18-20	7 días después de hormonas. 1,5 x 10 <sup>5</sup> Tric. en 0,05 ml.	48 Porcentaje de infección: 62%	42 días.
Coombs <i>et al.</i> (1987)	Cipionato de estradiol. 40 mg/kg. I. subcutánea.	2-3 meses	2 días después de hormonas. 10 <sup>5</sup> Tric. en 0,02 ml.	180 Porcentaje de infección: 52%	92 días.

Tomado de Kulda, J. Experimental Animals in Studies of *T. vaginalis* infection. In *Trichomonads Parasitics in Humans* (Honigberg, B. M. ed.). Springer-Verlag, New York, 1990.

Tras un tratamiento inmunosupresor los resultados no son concluyentes:

a.- El porcentaje de infección aumenta el 100% con dexametasona (con un tratamiento de 0,1 mg/kg de dexametasona-21-isonicotina, los seis días previos a la infección). Sin embargo, el tamaño de muestra en la experiencia es demasiado pequeño para considerar válidos los resultados (Wildfever, 1974).

b.- La irradiación de ratones aparentemente no afecta a la susceptibilidad a la infección (Cappuccinelli *et al.*, 1974).

c.- Al parecer, la ciclofosfamida hace disminuir el porcentaje de infección. (Coombs *et al.*, 1987).

Las manifestaciones patológicas descritas en el modelo por Patten y su equipo (1962), se sintetizan en que la exposición a *T. vaginalis* provoca cambios epiteliales displásicos en el 22% de los animales. Los cambios fueron reversibles después de la suspensión del tratamiento. La reacción aparecía a la 3ª semana después de la exposición inicial y desaparecía completamente después de la 7ª semana de la última inyección. También se han descrito cambios celulares, que afectan principalmente al núcleo. El examen histopatológico muestra que las células inmaduras ocupan completamente la capa epitelial.

Se han realizado estudios comparativos entre los procesos patológicos derivados de la infección de *T. vaginalis* y las displasias inducidas por agentes cancerígenos químicos; siendo comparables cualitativa y cuantitativamente los cambios producidos (Reagan, 1959).

La colonización de la vagina con *Candida albicans* o *Lactobacillus acidophilus* mimetiza las condiciones del hospedador natural y ha permitido el mejor establecimiento del parásito. Meingassner (1977) consigue un 95 % de infección en el día 4º p.i. después de la administración conjunta de *T. vaginalis* y *C. albicans*. El inóculo incluye  $3,6 \times 10^7$  levaduras/ml, en la proporción 1/80 vol:vol, y la dosis estándar de  $10^5$  tricomonas/ratón.

El modelo murino de McGrory y Garber (1992), que recurre a la precolonización vaginal con lactobacilos mantiene una infección consistente durante al menos cuatro semanas. Sin embargo, Corbeil (1995) duda de la utilidad de los modelos murinos, al no ser *T. vaginalis* un parásito natural del ratón, porque los factores de virulencia pueden ser especie-específicos. El autor propone que puede resultar de mayor ayuda el seguimiento de la infección por *Tritrichomonas foetus* en el ganado, puesto que ocurre de forma natural.

### 2.8.2. INFECCIONES ECTÓPICAS

Las infecciones experimentales producidas por la inoculación de *T. vaginalis* en varias localizaciones extravaginales han sido estudiadas, por su interés, básicamente en ratón.

El uso de otros animales de experimentación parece de importancia marginal. Sin

embargo, se han realizado infecciones subcutáneas e intraperitoneales en cobayo (Newton *et al.*, 1960; Jitriphai, 1971). De otra parte, se han infectado ratas por vía subcutánea (Teras, 1954) y establecido tricomonas en la cámara anterior del ojo de un conejo (Kean & Weldt, 1955).

En el ratón se produjeron infecciones que en la cavidad peritoneal y torácica, tejido muscular y subcutáneo, así como en el escroto. De todas ellas, las infecciones intraperitoneales y subcutáneas han sido generalmente usadas en estudios de patogenia (Jírovec *et al.*, 1968; Honigberg, 1978), inmunología (Honigberg, 1978; Tsai & Price, 1973) y quimioterapia (Schnitzer, 1963; Michaels, 1968; Meingassner & Heyworth, 1981) de *T. vaginalis*.

Algunos estudios discuten la existencia de correlación entre los ensayos subcutáneos e intraperitoneales y la virulencia. Sin embargo, Kulda (1990) mantiene que aún con ciertas irregularidades, hay una correlación complementaria entre los modelos de virulencia y la infección natural. El ensayo subcutáneo puede ser de mayor utilidad para diferenciar cepas virulentas y avirulentas, pero su correlación con los datos clínicos es escasa (Garber & Lemchuk-Favel, 1990).

A continuación, se recogen las principales aportaciones de los investigadores o grupos que han trabajado con ambos modelos, así como la metodología general en cada caso.

#### 2.8.2.1. Infecciones intraperitoneales

La inoculación intraperitoneal de *T. vaginalis* en ratón causa una peritonitis fibrinopurulenta con abscesos y focos necróticos en órganos abdominales con producción de líquido ascítico.

La severidad de la infección depende de la respuesta individual del hospedador animal, que refleja la virulencia inherente de la cepa inoculada. Un patrón de cambios patológicos y porcentaje de mortalidad de los ratones infectados es generalmente reproducible bajo condiciones experimentales estándar. Sin embargo, la correlación entre la virulencia de las

cepas en ratón y la gravedad de la enfermedad en pacientes no parece ser perfecta (Kulda, 1990). En contraste con la infección intravaginal experimental, la infección intraperitoneal no presenta graves problemas técnicos, y viene siendo utilizada desde hace 30 años.

Las revisiones sobre diferentes aspectos de este tema son múltiples, pero cabe destacar dos por su esquema general (Jírovec & Petru, 1968; Honigberg, 1978). Las aplicaciones usuales de este modelo son el estudio de la patogenia de cepas de *T. vaginalis* y los ensayos de quimiosensibilidad a fármacos potencialmente tricomonicidas.

La inoculación se realiza en una dosis única de parásitos procedentes de cultivos axénicos en crecimiento logarítmico. La concentración óptima es de  $10^6$  tricomonas / 0,5 ml de medio fresco (Kulda, 1990). *T. vaginalis* puede ser mantenida por pases seriados ratón-ratón partiendo de cultivos primarios de tricomonádidos recuperados de la cavidad abdominal alrededor del 9°-10° día p.i. (Gobert *et al.*, 1971).

Cierto número de autores avalan con sus trabajos la alta capacidad infectiva de aislados frescos de *T. vaginalis* cuando son inoculados intraperitonealmente (Bogovsky & Teras, 1958; Newton *et al.*, 1960; Ivey & Hall, 1964; Gobert *et al.*, 1971). Las diferencias en su virulencia se presentan en las subsecuentes fases de la infección.

Algunas peculiaridades han sido reseñadas en la susceptibilidad a la infección de cepas consanguíneas de ratones. Landolfo y colaboradores (1979) señalan a BALB/c como la cepa más susceptible, mientras que los ratones blancos con genes de tipo A fueron los más resistentes. El porcentaje de mortalidad acumulada asciende al 60% - 80% en BALB/c, respecto al resto de cepas consanguíneas de tipo A, en las que no se alcanza el 30%.

#### 2.8.2.1.1. Evolución y manifestaciones patológicas

La mayoría de los parásitos inoculados son destruidos por citotoxicidad no específica de las células peritoneales poco después de su inoculación. En ratones inoculados con  $10^6$  tricomonas, sólo un bajo número de parásitos son observados tras 15 minutos p.i.. A las 6 h.

p.i. los parásitos desaparecen del exudado peritoneal (Kulda, 1990).

Los estudios *in vitro* indican que la citotoxicidad natural frente a *T. vaginalis* está mediada primariamente por macrófagos (Landolfo *et al.*, 1980). Los tricomonas supervivientes se fijan en los órganos abdominales (estómago, bazo, páncreas e hígado) estableciendo focos de multiplicación aislados. La infección avanza desde los focos por extensión provocando lesiones en los tejidos. Los parásitos viables están ausentes del líquido ascítico desde las fases más tempranas de la infección experimental. La reaparición en el fluido ascítico se producirá a partir del 6° día p.i. y se incrementa hasta la fase terminal de la infección.

Las lesiones iniciales se desarrollan preferentemente en el páncreas, en apenas 12 h. p.i. pueden observarse abscesos macroscópicos. Las lesiones permanecen localizadas y de pequeño tamaño o crecen progresivamente con focos necróticos que se extienden a órganos adyacentes, dependiendo de la virulencia de las cepas. También se han descrito invasiones tempranas en el hígado, habitualmente afectando la región del hilus. Al mismo tiempo, aparecen lesiones en los nódulos linfoides mesentéricos y ocasionalmente en las glándulas suprarrenales y el aparato genital.

Los tricomonas invaden también el estómago y el bazo (siendo muy frecuente la esplenomegalia). El aspecto característico de la infección avanzada es la presencia de materia necrótica caseosa, sobre el hígado, páncreas y estómago en la parte superior de la cavidad abdominal; produciéndose adherencia a la hoja peritoneal adyacente. Las vísceras se cubren de un exudado fibrinopurulento. La materia necrótica caseosa puede también presentarse sobre el mesenterio y la parte baja de la cavidad abdominal.

A medida que la infección progresa, el volumen de líquido ascítico aumenta. En la región de la cavidad abdominal se produce una ascitis amarillo-grisácea (en cantidades que exceden los 3 ml por ratón). La fase final de la infección es una peritonitis fibrinopurulenta generalizada.

La virulencia de la cepa de parásito y la susceptibilidad de los ratones hospedadores

son los dos factores principales que controlan el desarrollo del modelo experimental.

*T. vaginalis* produce tres tipos básicos de lesiones que reflejan la virulencia de las cepas usadas (Teras, 1954; Bogovsky & Teras, 1958; Roigas, 1961; Teras & Roigas, 1966). En las cepas de alta virulencia, se producen cambios inflamatorios exudativos, invasión de órganos abdominales que conducen a la necrosis del hígado y abscesos o cambios de tipo inflamatorio en otros órganos. La demarcación de las lesiones es pobre y los parásitos forman extensiones invasivas en contacto con los tejidos del hospedador. Los procesos de reparación están desorganizados, con persistentes inflamaciones.

En las cepas de moderada virulencia (tipo crónico), se destaca la organización de exudado fibrinopurulento y tejido conectivo conteniendo numerosas células permeables a focos inflamatorios (Teras & Roigas, 1966). Los órganos abdominales, incluyendo el hígado, son usualmente invadidos pero la extensión es limitada. La patología característica de este tipo de infección son los focos de peritonitis crónica con importante crecimiento de tejido conectivo. La peritonitis puede causar la muerte.

Con las cepas de baja virulencia se produce exudación mínima y escasos cambios productivos. La invasión de tejidos es mínima, el hígado no es invadido. La lesión está circunscrita por el contacto con tejido normal del hospedador. Los tricomonádidos, que están presentes en bajo número, eventualmente pueden ser eliminados, aunque pueden permanecer encapsulados por espacio de semanas (Teras & Roigas, 1966).

La lesión en el páncreas e hígado es importante en el desarrollo de la infección experimental y ha sido estudiada de forma extensa (Bogovsky & Teras, 1958; Reardon *et al.*, 1961; Teras & Roigas, 1966; Gobert *et al.*, 1969; Gobert *et al.*, 1971; Brugerolle *et al.*, 1974). La invasión del páncreas ocurre independientemente de la virulencia de la cepa. Las lesiones tempranas son pequeños abscesos, envueltos por una delicada capa fibrosa, con neutrófilos en el centro y parásitos en la zona periférica que interaccionan con leucocitos. Kalasová y Nedvedová (1977) observaron en abscesos tempranos, vasos capilares congestionados llenos de leucocitos y de tricomonas, lo que sugiere un origen vascular de la lesión. Otros



investigadores, asumen que el páncreas es invadido desde el exterior (Gobert *et al.*, 1971). En ratones infectados con cepas virulentas, los abscesos se extienden con celeridad.

La región proliferativa de tricomonádidos se encuentra en el centro de la lesión cubierta de una empalizada de leucocitos. La inflamación causa la completa desorganización de los tejidos invadidos, atrofia de los folículos glandulares y edema, así como proliferación fibrosa en el área concomitante.

En ratones infectados con cepas de baja virulencia, las lesiones pancreáticas iniciales son similares, pero el desarrollo de abscesos es limitado. Los tricomonas son incapaces de evolucionar en una zona distinta de la periferia de la lesión. Siendo separados tales abscesos por leucocitos que localizan y aíslan la infección.

El hígado puede ser invadido por cepas virulentas. La invasión comienza desde el exterior, en áreas cubiertas con membranas fibrinopurulentas que contienen numerosos tricomonádidos. Los parásitos penetran perivascularmente y pasan a través del hígado hacia áreas densas donde comienza la necrosis. Estas zonas están separadas del parénquima a través de estrechas cubiertas de leucocitos y macrófagos que no previenen el contacto directo de *T. vaginalis* con los hepatocitos. A medida que avanzan los parásitos, las regiones pobladas de leucocitos degeneran y continúa la formación de focos necróticos.

Los resultados de estudios histoquímicos indican la depleción del glucógeno en el parénquima hepático invadido; así como la acumulación de lípidos y sustancias de naturaleza proteica en las áreas parasitadas y la presencia de mucopolisacáridos neutros entre las sustancias fibrinosas presentes (Gobert *et al.*, 1971).

La observación por microscopía electrónica del hígado infectado (Brugerolle *et al.*, 1974) reveló la desorganización del parénquima hepático causada por la ruptura de los desmosomas y la degradación del colágeno en las sustancias fibrinoides. Los hepatocitos del área invadida carecen de glucógeno, contienen numerosas inclusiones de lípidos y muestran alteraciones mitocondriales.

De forma análoga a lo que ocurre en la infección humana (Nielsen *et al.*, 1975; Ovcinnikov *et al.*, 1975), los tricomonas ameboides atacan a las células del hospedador medio de extensiones citoplasmáticas agranulares ricas en microfilamentos (Kulda *et al.*, 1987).

A pesar de que las experiencias *in vitro* indican que la citotoxicidad de *T. vaginalis* es contacto-dependiente, la citolisis no dependiente de contacto puede ser demostrada *in vivo* por microscopía electrónica. Permaneciendo las membranas de los hepatocitos intactas en el lugar de ataque del parásito, que presenta un prominente aparato de Golgi y numerosas vesículas de transporte y reduciéndose los procesos de exocitosis y endocitosis al área directa de contacto con las células del hospedador.

#### 2.8.2.1.2. Ensayos intraperitoneales de patogenia en ratón

##### A. Mortalidad.

Una mayoría de los aislados aleatorios de *T. vaginalis* pueden matar un ratón después de una inoculación intraperitoneal (Roigas, 1961; Reardon *et al.*, 1961; Ivey *et al.*, 1964). Esta propiedad ha sido empleada en ensayos de laboratorio.

El número de tricomonádidos necesarios para causar infecciones letales puede diferir en función de las cepas de tricomonas, siendo la respuesta muy variable. El porcentaje de mortalidad (%M), esto es, el porcentaje de ratones que mueren al cabo de un tiempo determinado, después de la administración de un inóculo estándar, puede ser utilizado con un índice de virulencia. El día medio de muerte es como un criterio adicional en ensayos con cepas que causan alta mortalidad en el ratón (Ivey *et al.*, 1964; Laan, 1965). Con un inóculo de  $10^6$  tricomonádidos, el tiempo recomendado de observación en el test de mortalidad son tres semanas. Si se utiliza el porcentaje de mortalidad como criterio para la evaluación de la virulencia, se recomienda la realización de ensayos por duplicado, inoculando un mínimo de 30 ratones por experiencia. Entre 23 cepas examinadas (Roigas, 1961; Reardon *et al.*, 1961; Ivey *et al.*, 1964), el porcentaje de mortalidad varía del 16% al 95%.

Los ratones inoculados mueren entre el 5° y el 21° día p.i., aunque el mayor número de muertes se registra entre los días 9° - 11° después de la infección.

Las cepas de parásitos que causan alta mortalidad (90% - 100%) pueden ser usadas en ensayos farmacológicos frente a *T. vaginalis* (Kulda, 1990). El ensayo se inicia con la inoculación a un lote de ratones de una cepa virulenta, posteriormente se administra el fármaco potencial y se observa el porcentaje de mortalidad comparado con el de un lote control no tratado.

#### B. Índices de patogenia.

La estimación de las alteraciones patológicas que se producen en la cavidad abdominal de los ratones proporciona un criterio para la evaluación de la virulencia de *T. vaginalis*. Básicamente, se siguen dos modelos basados en la valoración semicuantitativa de las manifestaciones patológicas. En estas experiencias el lote de ratones infectado con un inóculo estándar es observado durante un tiempo determinado, al cabo del cual se sacrifica a los supervivientes. Los ratones que sucumben con la infección y los sacrificados son necropsiados para observar la presencia de tricomonádidos y los cambios patológicos en la cavidad abdominal. Los cambios patológicos en cada ratón son evaluados.

Teras y Roigas (1966) elaboraron un índice de virulencia con rango 0-10 (máxima virulencia-ausencia de virulencia). Los criterios de valoración fueron seleccionados sobre la base de estudios histopatológicos de la progresión de la infección intraperitoneal de ratón (Teras, 1954; Bogovsky & Teras, 1958; Roigas, 1961, Teras & Roigas, 1966). Incluyen la muerte del animal inoculado (máxima valoración) y enfatizan el daño hepático, aunque el líquido ascítico no es considerado. La experiencia se realiza con un alto inóculo de parásitos ( $4 \times 10^6$  tricomonádidos) y un corto periodo de observación (10 días), lo cual puede hacer disminuir la sensibilidad del ensayo.

Cavier y su equipo investigador (1972) propusieron el denominado índice medio de infección (I. M. I.), valorando desde nula a máxima virulencia entre 0-16. Para su

determinación, cuantifican las lesiones en hígado, páncreas y otras localizaciones de la cavidad peritoneal y la cantidad de líquido ascítico. La extensión de la lesión en cada área y el volumen de ascitis son valorados desde 0 (ausencia) hasta 4 (máximo). Si los parásitos no son detectados en el sitio examinado, la valoración de la lesión en particular es dividida entre dos. La valoración parcial es entonces totalizada para obtener el índice de infección para cada ratón. La media aritmética de los índices de todos los ratones infectados con una cepa en particular es el I. M. I. El ensayo está basado en los estudios de tricomonosis experimental en ratón realizados por Gobert y colaboradores (1969-1971), los cuales aportan datos que permiten la inclusión de las lesiones pancreáticas como criterio cualificado para la evaluación independiente. La extensión en el periodo de observación (3 semanas), permite una mejor diferenciación de los efectos patogénicos de diferentes cepas de tricomonas y la evaluación de la mortalidad.

Según Kulda (1990), la aplicación rigurosa de los dos ensayos podría producir resultados comparables. El ensayo de Cavier (1956) es más simple pero más subjetivo que el elaborado cuadro de criterios propuesto por los investigadores estonios. Según los datos de Teras y Roigas, las cepas de baja virulencia son las menos frecuentes (10%). La incidencia de cepas con alta y moderada virulencia es aproximadamente idéntica (45 %).

Toyos (1974) recoge los trabajos clásicos y propone en su Tesis Doctoral un método para determinar la patogenia de las cepas de *T. vaginalis*. Se trata de un modelo murino de inoculación intraperitoneal del parásito. Después de un periodo de observación se procede a la necropsia de los ratones supervivientes; evaluando las lesiones en hígado, bazo, páncreas, estómago y peritoneo, así como la presencia de ascitis y la mortalidad en la experiencia, que conforman un índice de patogenia (I.P.). Según el autor, el modelo no puede correlacionar la patogenia experimental y la clínica de la infección natural.

Delachambre (1981) establece un índice de virulencia de las cepas según el tiempo necesario para que los ratones mueran después de la inoculación intraperitoneal de  $4 \times 10^5$  flagelados y la severidad de las lesiones producidas en distintos órganos, correspondiendo el valor 100 a la muerte de los animales en la primera semana p.i.

Escario (1985) retoma el modelo de Toyos y modifica el baremo para favorecer el análisis estadístico de los datos obtenidos. Se concluye que la vía de inoculación intraperitoneal es de gran fiabilidad. Obteniendo, además, una gran concordancia cuando aplica el ensayo a pruebas de quimioterapia con los resultados previos *in vitro*.

### C. Cambios de virulencia.

La virulencia de *T. vaginalis* decrece después de un prolongado mantenimiento en cultivo axénico. Esto es evidente por la disminución de los índices de virulencia y la pérdida de la capacidad de aniquilar ratones inoculados intraperitonealmente. Utilizando ensayos de mortalidad, un significativo descenso de la virulencia ha sido detectado en 8 de las 12 cepas investigadas después de 3-4 meses de cultivo (Ivey *et al.*, 1964; 1975). El examen de 15 cepas del parásito, con ayuda de un ensayo intraperitoneal en ratón (Laan, 1965; 1966), muestra una sustancial atenuación de la virulencia de *stocks* mantenidos entre 8 y 32 meses *in vitro*. Probando las cepas cultivadas durante cortos periodos de tiempo (v. g. 4 meses) no se revelan cambios sobre la patogenia inicial.

En general, la atenuación de la virulencia es más pronunciada en cepas de alta virulencia. Prolongados tratamientos con antibióticos (Honigberg, 1978; Ivey *et al.*, 1978) y la resistencia inducida por osarzol (Laan, 1965), parecen favorecer la atenuación. Un incremento en la virulencia ha sido observado en cepas de baja y moderada virulencia tras dos o tres pases intraperitoneales por ratón (Laan, 1965; 1966). En estudios de virulencia con cepas mantenidas en el laboratorio, es preciso la estabilización del cultivo en fresco o su conservación en frío (Honigberg, 1978; Ivey *et al.*, 1975; Diamond *et al.*, 1965).

#### 2.8.2.2. Infecciones subcutáneas

La infección experimental subcutánea en ratón permite el estudio del desarrollo de un absceso localizado en el lugar de inyección. Esto depende de la capacidad de los parásitos para multiplicarse en el lugar de inoculación, la infiltración y muerte de leucocitos, la lisis de las paredes de los abscesos y la reanudación de la multiplicación de los parásitos acompañada por

la expansión de la lesión. Bajo condiciones controladas, el crecimiento de la lesión y la duración de la fase progresiva de su desarrollo es característica de la cepa seleccionada, reflejando su virulencia potencial. Consecuentemente, el volumen de lesión puede ser usado para estimar los niveles de virulencia de una cepa (Honigberg, 1961; Frost & Honigberg, 1962).

La infección subcutánea de ratones con tricomonádidos es fácil de establecer y produce lesiones simples de medida directa, ofreciendo un modelo muy apropiado para estudios en el laboratorio. Ha sido probada con éxito en ensayos farmacológicos y de virulencia (Schnitzer, 1963; Honigberg, 1978), así como para la obtención de sueros inmunes.

Schnitzer y colaboradores (1950) fueron los primeros en señalar la susceptibilidad del ratón a las infecciones subcutáneas. Desde entonces, las infecciones con *T. vaginalis* se han realizado por inoculación simple o múltiple, en el área ventral, dorsal (Lynch *et al.*, 1955; Paronikjan, 1958; Honigberg, 1961) o patas posteriores, con parásitos suspendidos en una variedad de medios y con un inóculo que oscila entre  $7 \times 10^3$  y  $1,4 \times 10^7$  organismos.

Honigberg (1961) y Frost y Honigberg (1962) aplicaron el modelo de infección subcutánea en ratón a estudios de patogenia y virulencia de tricomonádidos, desarrollando un procedimiento estándar que pretende obtener resultados generalmente reproducibles. Según el método de Honigberg, las lesiones subcutáneas pueden ser producidas por  $9 \times 10^5$  tricomonádidos en 0,5 ml de medio conteniendo 0,050-0,075% de agar. Esta dosis asegura altos porcentajes de infección y permite el crecimiento diferencial de los abscesos en función de la cepa del parásito. Las variaciones en la dosis entre  $6 \times 10^5$  y  $10^6$  flagelados no afectan substancialmente al tamaño de los abscesos resultantes; sin embargo, la aplicación de inóculos elevados resta sensibilidad al método y por tanto limita su aplicación para ensayos de virulencia.

La presencia de agar en el medio de inoculación favorece el establecimiento de la infección (Honigberg, 1961; Jeffries & Harris, 1967), siendo innecesaria la utilización de inmunosupresores. Según Jeffries & Harris (1967), los ratones tratados con cortisona son menos susceptibles al inóculo sin agar.

La dificultad de este ensayo radica en la valoración de las lesiones. Mientras una persona sujeta al ratón sin descomponer la lesión, otra procede a realizar las mediciones, longitud x anchura de la lesión mediante un calibre y la altura con la ayuda de una regla, para lo que se requiere cierta experiencia (Honigberg, 1961).

En las condiciones estándar, el porcentaje de infección con aislados frescos de *T. vaginalis* se aproxima al 100%, independientemente de la virulencia de la cepa. El hecho de que una cepa se muestre no infectiva es excepcional. Los ensayos realizados con un amplio número de cepas de *T. vaginalis* (Honigberg, 1961; Honigberg *et al.*, 1966; Kulda *et al.*, 1970; Honigberg *et al.*, 1984) muestran que la diferencia entre cepas está en el tamaño de las lesiones que producen y no en su porcentaje de infección. Algunas cepas con muy baja virulencia establecen infecciones pasajeras pero visibles y pequeños abscesos en los ratones inoculados.

En contraste a estos datos publicados, Krieger y su equipo (1983) examinan 7 aislados clínicos del parásito, dos de los cuales resultan no infectantes para ratones C<sub>3</sub>H. Los otros aislados causaban abscesos en un porcentaje variable de los hospedadores (5% - 71%); y los autores usan la relación lesión/infección producida para deducir la virulencia de la cepa.

Según otros investigadores, los resultados de Krieger son poco representativos por las considerables diferencias en la metodología: empleo de distintas cepas de ratón, uso de inóculo en medio libre de agar,... (Kulda, 1990).

Las distintas cepas de ratones responden de forma diferente a la infección subcutánea con tricomonádidos. La tendencia de los abscesos a la ruptura y el drenaje es más pronunciada en ciertas cepas -v.g. DBA/2- que en otras. De 8 estirpes examinadas, BALB/c ha sido señalada como la más satisfactoria. La media de los volúmenes de las lesiones y también varía de modo que las medidas absolutas obtenidas con diferentes cepas de ratón no pueden ser comparadas directamente. Sin embargo, los datos relativos obtenidos con tricomonádidos de diferente virulencia son comparables, como se ha confirmado para BALB/c, CBA y C57Bl/6 (Kulda, 1990). La mayor parte de los estudios sobre la virulencia de *T. vaginalis* han sido realizados en ratones C57Bl/6. La respuesta de esta cepa a la infección es menos pronunciada que la de

otras cepas examinadas (el volumen medio de los abscesos es aproximadamente un 30 % menor que en los ratones BALB/c). Se recomienda la estirpe C57BL/6 para ensayos de virulencia, dado que permite el estudio comparativo con trabajos previos obtenidos por otros investigadores.

#### 2.8.2.2.1. Evolución y manifestaciones patológicas

La lesión causada por la inoculación subcutánea de *T. vaginalis* en ratón es un absceso aparente que sobresale hacia la superficie externa. Dichos abscesos contienen materia purulenta y algunos tricomonádidos; crecen durante las dos primeras semanas p.i. y eventualmente la ruptura de las membranas puede producir drenajes. Los abscesos causados por cepas virulentas llegan a abrirse al final de la primera semana p.i.; las cepas con baja virulencia producen abscesos menores que no necesariamente se rompen. Después del vaciado, la lesión se cura usualmente con la formación de cicatrices. Las lesiones abiertas pueden cerrarse y producir focos secundarios; raramente los abscesos no se curan tras un periodo prolongado (Honigberg, 1961).

En contraste a la situación observada en la infección intraperitoneal, la respuesta del hospedador para la eliminación de los parásitos no es inmediata durante las fases tempranas de las infecciones subcutáneas. Los tricomonádidos comienzan a multiplicarse lentamente tras la inoculación, su número se incrementa progresivamente, hasta concentrarse en la pared de la lesión.

#### 2.8.2.2.2. Estudio histopatológico

La infección induce la migración de neutrófilos (PMN), que se acumulan en el punto de inoculación. La infiltración de leucocitos continúa mientras se multiplican los parásitos. Algunos tricomonádidos son fagocitados, pero los leucocitos no consiguen suprimir la infección. Los tricomonas aumentan en número y se intercalan con leucocitos en la zona periférica, donde se genera un manto distinto al margen colágeno. El continuo aporte de leucocitos dentro de la lesión produce una segunda capa de leucocitos, que también es



desplazada hacia el interior según avanza la zona multiplicativa de flagelados. El proceso se repite cíclicamente. La zona más profunda de leucocitos presenta degeneración celular y en el centro de los abscesos se presentan principios de necrosis. La muerte de leucocitos en el interior de la lesión, aparentemente, contribuye a procesos citolíticos nocivos para el tejido del hospedador (Frost & Honigberg, 1962).

La lesión se extiende por la lisis de la pared y libera parásitos que penetran en los espacios intersticiales del tejido edematoso circundante. El edema es más pronunciado y la fibrosis es menos efectiva en infecciones con cepas muy virulentas, en las que se suceden repetidas rupturas y diseminaciones del parásito. Finalmente, la lesión es envuelta por una fina capa de tejido granulomatoso que los tricomonas no pueden atravesar.

Este proceso es muy similar en diferentes cepas de tricomonádidos (Frost & Honigberg, 1962), siendo las diferencias más de tipo cuantitativo que cualitativo.

#### 2.8.2.2.3. Ensayos subcutáneos de patogenia en ratón

Honigberg diseñó (1961) y puso a punto (1966) un ensayo cuantitativo para el estudio de la virulencia del parásito, basado en la medida de los abscesos a los 6 días de la administración subcutánea de inóculos estándar en cepas consanguíneas de ratón.

Para ello, ratones C57BL/6, de 18-20 g de peso, son inoculados en ambos flancos con  $8 \times 10^6$  tricomonas suspendidas en 0,5 ml de medio tioglicolato con 5% de suero equino inactivado. En torno al sexto día, se miden la longitud, anchura y altura de cada lesión y se calcula el volumen de la porción prominente de los abscesos, correspondiente a la mitad de un esferoide, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$\text{VOLUMEN} = 0,5236 \times L \times A \times H$$

Para obtener datos reproducibles, es preciso determinar la media de 30 abscesos intactos. El investigador recomienda la inoculación de, al menos, 20 ratones, por la potencial

ruptura de las lesiones antes de su medición. Dicha ruptura reflejará propiedades de virulencia.

Sin embargo, los abscesos pueden romperse por razones no relacionadas con la virulencia, debiendo tomar con cautela la relación entre lesiones abiertas y virulencia.

La reproducibilidad del ensayo fue cuestionada por Delachambre (1981), quien realizó análisis estadísticos de resultados señalando la excesiva variabilidad en las respuestas de los ratones BALB/c tras la inoculación de dos clones de *T. vaginalis*. No obstante, Honigberg y su equipo (1961; 1984) muestran que la homogeneidad es satisfactoria cuando los resultados son sometidos al análisis de la varianza. La ausencia de homogeneidad estadística de los resultados puede indicar incorrecciones de tipo técnico que pueden ser identificadas y subsanadas. El desarrollo con éxito del ensayo demanda paciencia y un estricto seguimiento del protocolo descrito. El volumen medio de abscesos de 6 días en la cepa C57Bl/6 para 77 aislados frescos de *T. vaginalis* (Honigberg *et al.*, 1984; Kulda *et al.*, 1977) se sitúa en un rango continuo desde 60 mm<sup>3</sup>-230 mm<sup>3</sup>. El tamaño intrínseco de las lesiones subcutáneas indica un potencial de virulencia específico.

Desgraciadamente, al igual que ocurre con otros modelos experimentales, la patogenia en animales de laboratorio inoculados por vía subcutánea no es extrapolable a la patogenia clínica en pacientes (Honigberg *et al.*, 1984).

#### 2.8.2.3. Infecciones intramusculares.

La inoculación de cultivos axénicos de *T. vaginalis* en ratón produce abscesos localizados en el lugar de la inyección (Schnitzer *et al.*, 1950; Gavrilesco, 1962; Ivey & Hall, 1964).

El inóculo aplicado varía, según los autores, de 1,5x10<sup>5</sup> a 2,5x10<sup>6</sup> tricomonas en 0,2 ml de medio TYM con agar suplementado o no con suero (Schnitzer *et al.*, 1950; Ivey & Hall, 1964) o en 0,1 ml de solución salina (Gavrilesco, 1962); produciendo lesiones cuyo volumen y persistencia depende de la dosis infectante (Schnitzer *et al.*, 1950).

La lesión es un nódulo palpable en el tejido inoculado a los 3 días p.i.. La lesión progresa gradualmente hasta formar un amplio absceso después de 14 a 18 días. El tamaño límite que puede llegar a alcanzar es de 800-2000 mm<sup>3</sup> y contiene un material gris verdoso lleno de parásitos y leucocitos. Los abscesos disminuyen después de 8 a 12 semanas, pero conservan tricomonas viables. La posibilidad de usar infecciones intramusculares para ensayos de virulencia de tricomonas ha sido sugerida por Gavrilesco (1962).

Las diferencias en la histopatología de las lesiones (abscesos agudos o crónicos) deberían poder correlacionarse con las formas clínicas de la enfermedad en pacientes (Gavrilesco, 1962), si bien la infección intramuscular no parece adecuada para el seguimiento de la evolución de la virulencia (Ivey & Hall, 1994), dada la variación considerable en el tamaño de la lesión y la difícil accesibilidad al sitio de infección.

La infección intramuscular en ratón ha sido empleada en estudios inmunológicos (Kelly & Schnitzer, 1952; Schnitzer & Kelly, 1953; Kelly *et al.*, 1954); se ha señalado la capacidad de promover protección inmunológica efectiva (80%-100%) frente a inoculaciones múltiples por las vías intramuscular e intraperitoneal. La esplenectomía no impide que se produzca dicho efecto. Sin embargo, no se trata de una ruta de inoculación que se emplee en la actualidad.

### 2.8.3. CORRELACIÓN ENTRE PATOGENIA EXPERIMENTAL Y CLÍNICA

La correlación entre la patogenia experimental en ratón y la patogenia clínica presenta ciertas dificultades. El perfil clínico es difícil de valorar y el establecimiento de la severidad de la enfermedad en base a la sintomatología es un criterio excesivamente subjetivo. Además, las manifestaciones clínicas están afectadas por la respuesta individual del hospedador. Algunos signos como alteraciones en el cérvix uterino, revelados en los exámenes citopatológicos de frotis vaginales o estudios de biopsias cervicales, reflejan de forma más clara la virulencia potencial de una cepa de *T. vaginalis* (Honigberg, 1966; Kulda & Honigberg, 1970; Honigberg *et al.*, 1984).

Teras y Roigas (1966) estiman la virulencia comparada sobre la base de los ensayos

intraperitoneales y los perfiles clínicos de los pacientes, empleando en sus estudios 151 aislados de mujeres y 73 aislados de varones. Los resultados obtenidos indican que las cepas que muestran mayor virulencia en ratón se corresponden en mayor proporción con tricomonosis agudas y subagudas que con infecciones crónicas y latentes.

Según Reardon y colaboradores (1961), la evaluación de la mortalidad después de la inoculación intraperitoneal revela diferencias entre dos cepas de *T. vaginalis*, una procedente de una paciente con vaginitis severa y otra causante de una infección leve.

Sin embargo, en un estudio sobre 11 cepas obtenidas de pacientes que presentaban síntomas moderados, los autores no pudieron correlacionar la mortalidad del ratón con las manifestaciones clínicas asociadas. Ivey y Hall (1964) fueron incapaces de distinguir mediante ensayos de mortalidad la virulencia de 30 aislados recientes de pacientes asintomáticos/sintomáticos, si bien demostraron diferencias de virulencia en cepas probadas por ensayos subcutáneos. Honigberg (1966) y Kulda *et al.* (1970) recurren también a esta vía de inoculación. De un total de 11 cepas del parásito documentadas con un completo registro de perfiles clínicos y patológicos, 8 mostraron un alto grado de correlación positiva entre la virulencia para el ratón y varios parámetros de la enfermedad vaginal y cervical en pacientes. Menores diferencias detectaron con otras dos cepas. La última cepa, muy patógena para el ratón, procedía de una paciente con sintomatología moderada.

Estudios posteriores (Honigberg *et al.*, 1984), con 52 muestras no selectivas de cepas de *T. vaginalis*, permitieron la comparación de los ensayos subcutáneos en ratón con aspectos clínicos, citopatológicos (frotis por Papanicolaou) y biopsias cervicales. Sorprendentemente, las alteraciones celulares en el epitelio cervical fueron el único parámetro que mostraba una correlación significativa con los resultados de los ensayos experimentales. Los síntomas clínicos y signos de vaginitis y cervicitis detectados por examen citopatológico no se correlacionaron con el tamaño de las lesiones subcutáneas.

A pesar de ello, Honigberg (1978; 1979) considera este modelo como el más idóneo, porque permite la más precisa cuantificación de los resultados y parece estar menos afectado

por factores extrínsecos que puedan modificar el curso de la infección experimental. Además los datos obtenidos permiten una comparación objetiva de diferentes ensayos. Cuando se compara con el ensayo intraperitoneal, se comprueba que no hay relación entre los valores obtenidos por los dos métodos (Ivey & Hall, 1964) y se cuestiona la utilidad del ensayo intraperitoneal para la evaluación de virulencia.

Sin embargo, más recientemente, se ha estudiado la virulencia de 25 cepas de *T. vaginalis* por ensayos subcutáneos, intraperitoneales (modificados de Cavier) y de mortalidad, y se ha contrastado con la patogenia clínica mostrada en biopsias cervicales. Las cepas fueron divididas en 4 grupos de virulencia según el alcance de las lesiones; suave, moderada, alta, muy alta. Independientemente del ensayo empleado, la cepa con mayor virulencia para el ratón está dentro del grupo de aislados que causan la más severa lesión en humanos. Ninguno de los métodos parece, por tanto, claramente superior al resto (Kulda, 1990).

La discrepancia entre los resultados de varios ensayos puede ser explicada por la diferente sensibilidad a múltiples factores que controlan la virulencia de la cepa. En este sentido, Stejska y Kulda (1990) realizaron a lo largo de un año, ensayos con una cepa virulenta mantenida en cultivo sin observar atenuación de la virulencia en los ensayos subcutáneos (volumen de lesión 180 mm<sup>3</sup>); sin embargo el índice medio de infección decrece un 20%, la mortalidad desciende de 80 % a 23 %, y el tiempo medio de la muerte se incrementa de 9,8 a 17,6 días.

Pérez del Molino *et al.* (1987), en un estudio comparativo entre la sintomatología clínica y la virulencia de cepas de *T. vaginalis*, concluyen que existe una buena correlación entre el cuadro clínico y el porcentaje de mortalidad tras la infección intraperitoneal, así como con el volumen medio de los abscesos subcutáneos.

En definitiva, aunque ninguno de los modelos experimentales permite la perfecta correlación con la patogenia clínica, los datos sugieren que los ensayos de virulencia en ratón reflejan propiedades biológicas intrínsecas de *T. vaginalis* que pueden ser de importancia en la consideración de la patogenia potencial del parásito en humanos (Kulda, 1990).

## 2.9. INMUNOPARASITOLOGÍA

Clásicamente la inmunidad es un sistema de reconocimiento específico de moléculas extrañas al organismo. Hay dos niveles de defensa contra la invasión de agentes externos: la inmunidad innata o inespecífica y la inmunidad específica (adaptativa o adquirida). La diferencia principal entre las dos estriba en la especificidad y la memoria inmunológica, ambas propiedades exclusivas de la inmunidad adquirida (Stites & Terr, 1991).

El descubrimiento reciente de que las citocinas que intervienen en la inmunidad tienen una participación trascendental en estos procesos iniciales de la infección ha mitigado un poco la diferenciación entre procesos de defensa inespecíficos o específicos.

Es conveniente, de todas maneras, considerar la secuencia de reacciones que el organismo presenta ante la invasión parasitaria. Para simplificar, podemos decir que cuando un agente infeccioso invade el organismo, encuentra primero los elementos efectores de la inmunidad innata inespecífica (barreras cutánea y mucosas, lisozima y otras enzimas, proteínas de la fase aguda, fagocitos, células NK y complemento). Estos pueden ser suficientes para prevenir la enfermedad, pero, si no es así, entonces se activa además el sistema inmunitario adaptativo (linfocitos T, linfocitos B y anticuerpos), que permite la recuperación de la enfermedad y establece una memoria inmunológica específica; se dice entonces que el individuo ha adquirido inmunidad contra el agente infeccioso (Paul, 1989).

Ambos tipos de inmunidad, la innata y la adquirida, no actúan separada ni secuencialmente, sino en íntima relación. Los vertebrados usan diferentes estrategias para defenderse de las infecciones parasitarias en función de la variedad de tamaño, fisiología, localización y capacidad para evadir la respuesta inmune que presentan los parásitos. Así, los mecanismos efectores frente a los agentes infecciosos están estrechamente regulados por dos componentes fundamentales: uno de naturaleza celular (linfocitos T) y otro molecular (citocinas).

## 2.9.1. La respuesta inmunológica frente a los parásitos

### 2.9.1.1. Papel de los linfocitos T y las citocinas en las infecciones parasitarias

Los linfocitos T cooperadores (CD4+) son los principales directores de la respuesta inmune porque su participación es necesaria para la activación de las células efectoras principales de esta respuesta, es decir, los linfocitos T citotóxicos (CD8+) y los linfocitos B productores de anticuerpos (Stites & Terr, 1991). También median la respuesta de la hipersensibilidad retardada (ANEXO I), útil sobre todo frente a la infección por parásitos intracelulares y frente a algunos virus (Cher & Mossman, 1987).

Nuestro conocimiento de las funciones de los linfocitos T CD4+ y CD8+ en las infecciones parasitarias ha cambiado drásticamente en los últimos años. La división simplificada de los linfocitos T en cooperadores (Th) CD4+ y supresores/citotóxicos (Ts/Tc) CD8+ ha sido reemplazada por la comprensión de que la citotoxicidad no es una función reservada sólo a las células CD8+; por tanto, los subtipos de linfocitos T pueden ser mejor establecidos por la identificación de sus productos (citocinas/linfocinas) y por la supresión de las funciones efectoras (Scott & Sher, 1993). Un importante avance en el campo de la inmunoparasitología fue el descubrimiento, en un modelo murino, de que las células T (CD4+) se dividen en dos subtipos (Mosmann & Coffman, 1989), aunque no son los únicos:

- h) Células Th1, que producen IFN- $\gamma$ , e interleucina 2 (IL-2), IL-3, GM-CSF y linfoxina.
- i) Células Th2, las cuales producen IL-4, IL-5 e IL-10 y GM-CSF.

Por razones no muy bien comprendidas, las infecciones parasitarias están asociadas preferentemente con una de estas dos subclases. Esto ha dirigido el uso de modelos parasitarios *in vivo* no sólo para mejor comprensión de las infecciones humanas, sino también para determinar cómo se desarrollan las subclases de las células T durante la infección crónica y elucidar qué factores/mediadores son responsables de su regulación (Scott & Kauffman, 1991). Por ejemplo, en las infecciones por helmintos los elevados niveles de IgE y la eosinofilia parecen asociarse a una respuesta debida a linfocitos T CD4+ de la subclase Th2.

Análogamente, las infecciones por protozoos están a menudo asociadas con respuestas como la hipersensibilidad retardada (DTH) ó de tipo IV, que son mediadas por los linfocitos T CD4+ de la subclase Th1 (Scott & Sher, 1993).

Las células T CD4+ median la susceptibilidad y la resistencia a la infección de ciertos protozoos (Titus *et al.*, 1986; Howard, 1987). Varios laboratorios han demostrado que la presencia de citocinas Th1 se correlaciona con la resistencia, mientras que las citocinas Th2 lo hacen con la susceptibilidad (Heinzel *et al.*, 1989; Scott, 1988; Locksley & Scott, 1991). La asociación entre linfocitos Th1 y protección, y de otra parte, entre linfocitos Th2 y susceptibilidad fue rigurosamente establecida tras comprobar como líneas celulares que exhiben perfiles Th1 transfieren protección, mientras que las células con citocinas Th2 incrementan la susceptibilidad (Scott *et al.*, 1988; Holaday *et al.*, 1991).

Otro de los factores que puede influir en la respuesta inmunitaria es la dosis de antígeno inoculada (Bretscher *et al.*, 1992). De tal manera que una cepa murina susceptible puede llegar a ser resistente si los animales son previamente tratados con bajas dosis de antígenos parasitarios. Los mecanismos implicados en esta respuesta no están bien definidos, pero se postula que interviene la inducción de células T CD8+.

Por su parte, las citocinas son mediadores de naturaleza peptídica que se secretan tanto durante la respuesta inflamatoria aguda como en la crónica por distintas células inflamatorias como los macrófagos, linfocitos, células cebadas y células endoteliales. En general, se sintetizan en respuesta a estímulos de tipo inmunológico. Su síntesis tiene lugar mediante procesos que implican nueva transcripción de genes y generación de ARNm inestable, lo que unido al corto periodo de transcripción hace que se trate de una síntesis transitoria. Una vez sintetizadas no se almacenan en la célula, sino que se secretan inmediatamente actuando sobre receptores específicos de sus células diana.

La mayor parte de las acciones de las citocinas sobre sus células diana dependen también de una nueva transcripción génica, que está mediada por la activación de factores de transcripción. Estos factores de transcripción activos migran al núcleo y se unen a secuencias



de nucleótidos específicas siendo capaces de estimular o inhibir la transcripción de genes. Así pues, la actividad de las citocinas sobre las células diana favorece la síntesis de nuevas proteínas que puedan tener diversas acciones: antivíricas, inmunológicas, receptores de superficie, moléculas de adhesión, otras citocinas (Abbas *et al.*, 1995).

No obstante, la actividad de las citocinas es muy compleja, ya que:

- Una misma citocina puede estimular distintos tipos de células (pleiotropismo).
- Cada citocina es capaz de producir diferentes efectos sobre una misma célula diana.
- Pueden influir positiva o negativamente en la síntesis de otras citocinas en la célula diana.
- Pueden actuar conjuntamente produciendo efectos sinérgicos o antagónicos.
- Pueden aumentar o disminuir el número de receptores específicos para estos mediadores.

Por otra parte, las citocinas son capaces de interactuar sobre los receptores de la misma célula que las secreta (acción autocrina), -como sucede durante el proceso de activación del linfocito Th-, de células próximas (acción paracrina) -actuación en el foco inflamatorio-, o bien son secretadas a la sangre produciendo efectos sistémicos (acción endocrina).

Según su origen y sus efectos sobre las células diana (Liles & van Voorhis, 1995), se clasifican como: factores de crecimiento hematopoyético, interferones, linfocinas, monocinas y quimiocinas (ANEXO II).

#### 2.9.1.2. La respuesta inmunitaria frente a protozoos

La presencia de parásitos unicelulares en el organismo es rápidamente detectada por los macrófagos que inician procesos de fagocitosis. La activación posterior de los macrófagos acelera la fagocitosis e intensifica la degradación de los parásitos, pero no es indispensable para iniciar la actividad macrofágica. Los productos metabólicos de los protozoos, seguramente juegan un papel en la activación de estas células. La estimulación de los macrófagos,

endotelios, fibroblastos y plaquetas induce a estas células a producir una serie de moléculas activas, siendo las más comunes la interleucina 1 (IL-1), IL-6, IL-8 y el factor de necrosis tumoral (TNF). Estas moléculas, individual o colectivamente, estimulan la producción y quimiotaxis de los neutrófilos, linfocitos y macrófagos. Al mismo tiempo actúan sobre el endotelio vascular aumentando las moléculas de adhesión y la permeabilidad capilar, lo cual favorece la retención, extravasación e infiltración local de estas células.

El resultado final es la producción de un infiltrado inflamatorio alrededor del parásito, con abundancia de células fagocitarias (neutrófilos y macrófagos), factores plasmáticos (complemento, lisozima,...) y células inmunes (macrófagos y linfocitos). En infecciones generalizadas, estas linfocinas también provocan efectos sistémicos como la producción de prostaglandinas (que causan fiebre), de ACTH (que liberan corticoides), y de proteínas hepáticas de fase aguda (como la proteína C reactiva, que ejerce diversas funciones defensivas).

Los macrófagos de ratones susceptibles a protozoos como *Plasmodium*, *Babesia*, *Trypanosoma*, o *Leishmania* eliminan a los respectivos parásitos cuando son activados mediante inmunomoduladores inespecíficos. Esto prueba que los macrófagos pueden ejercer funciones parasitolíticas sin activación específica previa y sugieren que lo mismo debe suceder en el foco inflamatorio de las respuestas de fase aguda.

En previsión, sin embargo, de que esta respuesta pudiera ser insuficiente para eliminar al patógeno, la presencia de macrófagos y linfocitos en la zona permite la iniciación muy precoz de una respuesta inmune específica. Esta respuesta empieza con la activación de los precursores de linfocitos T cooperadores, continúa con la activación de los linfocitos cooperadores, y, probablemente, después se especializa hacia una respuesta mediada por células o una respuesta humoral.

#### 2.9.1.2.1. La activación de los linfocitos T cooperadores (Th)

La activación de los linfocitos Th ocurre tempranamente en el curso de la respuesta inmunitaria, y, al menos, requiere de dos señales. La primera señal proviene de la unión del

receptor del linfocito T (TCR) con el complejo antígeno-molécula de CMH de clase II de la célula presentadora (CPA). El linfocito Th estimulado primariamente por el complejo antígeno-CMH de clase II se denomina linfocito Th precursor (ThP). La estabilidad del complejo formado por el receptor del linfocito (TCR) y el antígeno-CMH de clase II se alcanza a través de las proteínas CD3 y CD4 que estabilizan la combinación con el TCR y ayudan a la transmisión de señales al interior del linfocito. Además, otra serie de proteínas de la CPA (CD22, CD54 y CD58) se acoplan con proteínas del Th (CD2, CD11a, CD18 y CD45) y refuerzan ambas funciones.

La segunda señal precisa un par de coestímulos. Estos son: la acción de las citocinas IL-1 y IL-6 producidas por la CPA activada, y la unión de la proteína de superficie B7 de la CPA con las proteínas CD28 o CTLA4 del linfocito y citocinas producidas por la CPA activada, cuya principal función es la de iniciar la respuesta inmunológica. Estas dos señales juntas inducen la expresión de receptores para IL-2, así como la producción de la propia IL-2 (Mannel *et al.*, 1985).

En este contexto, la IL-1 contribuye a la activación del Th, estimula la actividad de los macrófagos, células agresoras naturales (NK), mastocitos y linfocitos B y contribuye a la respuesta de la fase aguda. Por otra parte, La IL-6 favorece la activación del Th, promueve la proliferación y diferenciación de los linfocitos B, y participa en la activación de la fase aguda.

Esta complicada secuencia de acontecimientos necesaria para activar los linfocitos Th es característica de la respuesta inmune. Las consecuencias de una inmunidad aberrante serían tan devastadoras para el individuo que la naturaleza ha hecho esfuerzos por asegurarse de que la respuesta inmunológica esté bien regulada.

La interacción de la IL-2 con sus receptores estimula la multiplicación de las células ThP y su diferenciación hacia linfocitos Th activados (Th0). La principal función de la IL-2 es la de amplificar la respuesta iniciada por contacto del linfocito T cooperador con la CPA. Esto se va a llevar a cabo induciendo el crecimiento y la activación de las células que expresen receptores para la IL-2, incluyendo las propias células Th (Greebaum *et al.*, 1988), que son las que principalmente la producen (efecto autocatalítico), los linfocitos T citotóxicos (Malek *et*

*al.*, 1985; Morgan *et al.*, 1976) y las células NK (Trinchieri, 1989). Estas células activadas por la IL-2 son capaces de producir a su vez otras citocinas como factores de crecimiento y diferenciación de los linfocitos B, eosinófilos y mastocitos (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9), factores hematopoyéticos (IL-3, GM-CSF) que estimulan la producción en médula ósea de nuevas células inmunes mieloides que pasan a la circulación, o IFN- $\gamma$  (secretado por los linfocitos T y células NK) que tiene, entre otras funciones, la de aumentar la actividad de las propias células NK (Lamont, 1996), aumentar la expresión de los receptores de alta afinidad para la IL-2 en células del sistema monocito/macrófago, aumentar el número de moléculas CMH de clase II y de receptores para Fc y complemento en la membrana de células del sistema mononuclear fagocítico (Murray, 1990a; 1990b), y aumentar las moléculas de CMH de clase I de células diana de los linfocitos T citotóxicos (Trinchieri & Perussia, 1985). Todo ello se traduce en un aumento final en la actividad de las células NK, de los linfocitos y de las funciones del sistema macrófago-monocito (fagocítica-bactericida, presentadora de antígeno, tumoricida) (Paul, 1989); estas células macrofágicas, reclutadas y potenciadas enormemente en sus funciones por la activación inicial de los linfocitos T cooperadores, serán las principales células efectoras que medien las respuestas de hipersensibilidad retardada (inflamación crónica) (Nathan, 1987).

Los macrófagos que van siendo reclutados al foco inflamatorio presentan el antígeno a otros linfocitos T cooperadores, y segregan más IL-1 y otras citocinas como el TNF- $\alpha$  perpetuando la respuesta (Stites & Terr, 1991, Paul, 1989). Ambas citocinas, aparte de inducir la formación de IL-2 por los linfocitos T y otras células del sistema inmunitario, son también activadoras de las prostaglandinas en diferentes tejidos del organismo, y por tanto responsables directas de muchos de los signos y síntomas del proceso inflamatorio, como son el aumento de las proteínas de la fase aguda por los hepatocitos, la neutrofilia y la fiebre. Sus efectos en el cerebro, además de la fiebre, son fundamentalmente somnolencia, anorexia y aumento de la secreción hipotalámica de CRF (factor activador de ACTH), con el consiguiente estímulo del eje hipofiso-suprarrenal y aumento de esteroides (Le & Vilcek, 1987).

La activación de los células Th se produce en los dos primeros días de la infección parasitaria y constituye, simplemente, el paso inicial de la ampliación de la respuesta inmune. El fenómeno predominante, en este momento, es la promoción de un foco inflamatorio

inespecífico (como en la respuesta de la fase aguda) pero ya se inicia la expansión de linfocitos T precusores (ThP) y B que precede a la reacción inmune específica. Esta activación de las células Th parece ser un paso intermedio de organización de la respuesta inmune y el primer ataque contra el parásito. Aunque se observa una estimulación generalizada de las células inmunes (mediante IL-2 e IL-3), ya existe la estimulación concurrente pero específica de la inmunidad mediada por células (mediante IFN- $\gamma$  e IL-2) y de la inmunidad humoral (mediante las IL-4, IL-5 e IL-9).

Si el parásito (o sus antígenos) están presentes tras la primera semana de infección, los antígenos tienen la oportunidad de reestimar las células Th activadas. Esta estimulación crónica provoca la diferenciación de los linfocitos T activados en una de dos direcciones: hacia linfocitos Th1 ó Th2. Las células Th1 producen IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\beta$  que son activadores de la respuesta mediada por células (macrófagos, células NK y linfocitos T citotóxicos) e inhibidores de la inmunidad humoral. Las células Th2, en cambio, producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10 que son activadoras de la respuesta humoral (linfocitos B, IgG, IgE, IgA, mastocitos, y eosinófilos) e inhibidoras de la inmunidad mediada por células. Ambos tipos de linfocitos producen también IL-3 que mantiene el reclutamiento de las células hematopoyéticas durante la respuesta inmune. Una vez que el parásito ha sido eliminado y la estimulación por sus antígenos cesa, las células T revierten a células memoria (TM). Los linfocitos TM son células de vida larga, muy susceptibles a la estimulación antigénica y que producen sólo IL-2 (como amplificadora de la respuesta inmune) cuando son reestimuladas por su antígeno específico.

#### 2.9.1.2.2. La activación de los linfocitos T citotóxicos

Requiere, al igual que los T cooperadores, dos señales de activación. Una proviene de la interacción del receptor del linfocito T con el complejo antígeno-molécula CMH de clase I presente en la membrana de la célula diana (célula infectada por virus, célula tumoral o injerto de un tejido extraño) (Bjorkman *et al.*, 1987). La segunda señal la proporciona la IL-2 producida por el linfocito T cooperador activado (Malek *et al.*, 1985; Morgan *et al.*, 1976).

El linfocito T citotóxico activado liberará entonces sus citocinas, que son las encargadas de eliminar a la célula diana (Paul, 1989).

#### 2.9.1.2.3. La activación de los linfocitos B

La producción de anticuerpos requiere, por un lado, la activación de los linfocitos B (Paul & O'Hara, 1987), y por otro su diferenciación en células plasmáticas, que serán las que secreten las inmunoglobulinas (Kishimoto, 1985, Hirano *et al.*, 1986). Mientras el linfocito T cooperador es activado por un antígeno concreto, los linfocitos B específicos para ese mismo antígeno lo reconocen a través de sus receptores de membrana -BCR- (inmunoglobulinas de superficie). La unión con el antígeno es seguida de la internalización receptor-antígeno, y ello constituye la primera señal en la activación; que es suficiente para la activación en células CD5+, mientras que el resto de los linfocitos B necesitan una segunda señal, que reciben tras la interacción con los linfocitos Th activados. El linfocito B, una vez procesado el antígeno, actúa ahora como CPA, presentando el antígeno a los linfocitos Th activados.

La segunda señal se establece por la interacción de CD40 de la superficie del linfocito B con su ligando correspondiente (CD40l), que sólo se expresa sobre la superficie de los linfocitos Th activados. Las citocinas que intervienen en la ayuda a los linfocitos T son IL-2, IL-4 e IL-6. Las señales llevan a la proliferación y las citocinas a la diferenciación en células productoras de anticuerpos (plasmocitos).

#### 2.9.1.3. Aspectos inmunológicos de la tricomonosis humana y experimental

##### 2.9.1.3.1. Mecanismos de defensa inmunitaria no específica frente a *T. vaginalis*

###### A.- Complemento

Entre los mecanismos inmunológicos no específicos que es capaz de activar *T. vaginalis* ha sido señalada la vía alternativa del complemento. La primera declaración explícita, en este sentido, la realizaron Gillin y Sher (1981), siendo confirmada por Holbrook *et al.* (1981); esto

sólo podría ser suficiente para explicar satisfactoriamente la imposibilidad de diseminación por vía sanguínea del parásito. Ambos trabajos, que son muy similares, describen la lisis de *T. vaginalis* por sueros humanos y de cobayo libres de anticuerpos, y la prevención de la lisis por inactivación térmica, pero no por inhibición selectiva de la activación del complemento por la vía clásica. Los sueros deficientes en los dos factores C3 y C8 no lisan el parásito, mostrando que ambos son necesarios para la formación del complejo de ataque a la membrana.

*T. vaginalis*, entre otras estrategias de evasión de la respuesta inmune, es capaz de evitar la acción del complemento. En principio, el parásito cuenta con la ventaja de que se localiza en un ambiente pobre en complemento. El mucus cervical es notablemente deficiente (Demes *et al.*, 1988a; Alderete *et al.*, 1995), de modo que la sangre menstrual representa el único aporte de complemento a la vagina.

Se ha comprobado en la sangre menstrual actividad citotóxica mediada por el complemento sobre *T. vaginalis*, lo que lleva a una disminución en la carga parasitaria durante la menstruación (Demes *et al.*, 1988b). A pesar de ello, los síntomas pueden exacerbarse, debido a la activación de algunos factores de virulencia mediados por hierro.

Demes *et al.* (1988a) encuentran que algunos aislamientos resistentes al complemento se hacen susceptibles después del cultivo prolongado *in vitro*, lo que concuerda con la hipótesis de que la variación fenotípica permite al protozoo evitar la lisis mediada por el complemento. Tras el cultivo en medio suplementado con hierro, *T. vaginalis* es también capaz de resistir la lisis mediada por la activación de la vía alternativa del complemento (Alderete *et al.*, 1995). La resistencia parece ligada a la degradación del componente C3 por la acción de cisteín-proteasas, cuya expresión está regulada por el nivel de hierro.

#### B. - Neutrófilos polimorfonucleares

La actividad tricomocida de los neutrófilos está íntimamente ligada a la activación del complemento. *In vitro*, el efecto letal de estas células es observado sólo en presencia de suero complementado. Este proceso, según se cree, acontece de la siguiente manera: la fracción C3b

del complemento se une, de una parte, a *T. vaginalis* (célula diana), y de otra al receptor específico en la membrana del neutrófilo, para que se despliegue su capacidad citocida (Rein *et al.*, 1980).

El hecho de que los fragmentos C3a, también liberados por la activación del complemento, sean quimiotácticos para los neutrófilos puede, seguramente, significar que estas células (abundantes en el flujo vaginal de mujeres sintomáticas infectadas por *T. vaginalis*) jueguen un papel importante en la defensa de la tricomonosis humana (Ackers, 1983). Mason y Forman (1980; 1982) ya señalaron la presencia de una sustancia soluble producida por *T. vaginalis* que es quimiotáctica para los neutrófilos. Inicialmente, se sugirió que la molécula activa era una proteína de alto peso molecular y termolábil, pero más tarde, se demostró que se trataba de un polipéptido con un peso molecular de 900 dalton (Chikunguwo *et al.*, 1985). Los efectos quimiotácticos de los productos secretados por *T. vaginalis* han sido contrastados, al menos, por otros dos grupos experimentales (Rasmussen & Rhodes, 1985; Brasseur *et al.*, 1985). Según Mason y Forman (1982) y Brasseur *et al.*, (1985), la actividad quimiotáctica es mayor cuanto mayor sea la patogenia de los aislados del parásito. Por contra, para Chikunguwo y su equipo (1985) y para Rasmussen y Rhodes (1985), ambos factores son independientes. Ninguno de los autores ha relacionado el efecto quimiotáctico con la activación del complemento.

El hecho de que los neutrófilos del hospedador posean la capacidad de migrar al ser atraídas por el parásito, sugiere que estas células desarrollan un función muy significativa en la respuesta humana a esta infección (Gardner *et al.*, 1986).

### C.- Macrófagos

En experiencias *in vitro*, los macrófagos murinos se han mostrado muy eficaces en la eliminación de *T. vaginalis*, siendo el rendimiento variable, en función de la cepa donante de células. Sin embargo, no existe una buena correlación con la susceptibilidad a la infección intraperitoneal del parásito.



De otra parte, en estudios realizados en humanos, células macrófagos de sangre periférica de voluntarios sanos presentan apreciables niveles de citotoxicidad espontánea frente a *T. vaginalis* (Mantovani *et al.*, 1981).

Para Ackers (1990), no está claro cómo los macrófagos contribuyen a la defensa frente a patógenos extracelulares, aunque ésta se haya comprobado en la infección protozoaria.

#### D.- Anticuerpos naturales

La existencia de factores líticos (mediados por el complemento) y aglutinantes en el suero de individuos no expuestos a *T. vaginalis* ha obligado a definir el límite mínimo de positividad para los métodos diagnósticos basados en la determinación de anticuerpos séricos. La actividad lítica se ha asociado, generalmente, a la intervención de anticuerpos inespecíficos, salvo para Weld y Kean (1958) quienes la vinculan con la presencia de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) en el suero. En general, dependiendo de la técnica utilizada, títulos de 1/20 a 1/60 se consideran inespecíficos (Honigberg, 1970).

Reinsenhofer (1963) investigó la actividad lítica y aglutinante de una amplia variedad de sueros humanos frente a *T. vaginalis*, señalando que, los sueros no calentados tienen una actividad lítica importante, independiente de la edad, sexo o infecciones previas con el parásito; en los sueros inactivados (30/ 56°C), se reduce pero no se pierde dicha actividad.

La actividad aglutinante del suero humano fue modesta comparada con la del suero bovino (Reinsenhofer, 1963). Un estudio más exhaustivo de las aglutininas en suero realizado por Samuels y Chun-Hoon (1964) les llevó a la conclusión de que la aglutinación observada se debe a anticuerpos. No se conoce con certeza el origen de estos anticuerpos inespecíficos del suero, pero se relacionan con la respuesta a componentes normales de la flora intestinal, infecciones con tricomonádidos comensales o con cierta predisposición genética (Samuels y Chun-Hoon, 1964). Puesto que las infecciones por *Trichomonas tenax* y *Pentatrichomonas hominis* son relativamente raras, la primera explicación parece la más probable (Ackers & Lumsden, 1978). En cualquier caso, no está claro el papel de los anticuerpos inespecíficos en

el conjunto de los mecanismos de defensa del hospedador.

De otra parte, se sabe que los anticuerpos específicos tienen la capacidad de estimular la activación de la ruta alternativa del complemento, y ello puede contribuir a un sistema de defensa más potente frente a *T. vaginalis* (Gillin & Sher, 1981).

#### 2.9.1.3.2. Mecanismos de defensa inmune específica frente a *T. vaginalis*

##### A.- Anticuerpos específicos

El papel de la inmunidad adquirida en la tricomonosis humana no está claro. La exposición al parásito no parece conferir protección, puesto que en infecciones repetidas no se observa disminución en la duración ni en la intensidad de la sintomatología.

Mediante pruebas serológicas (Mason, 1979; Street *et al.*, 1982; Matthews & Healey, 1983; Alderete, 1984; Cogne *et al.*, 1985; Wos & Watt, 1986) se ha determinado la existencia de anticuerpos específicos IgM, IgG e IgA, aunque no de IgE. De otra parte, los resultados de Chipperfield y Evans (1972) demuestran el incremento en el conjunto de células plasmáticas secretoras de esas subclases de inmunoglobulinas, en las infecciones endocervicales por *T. vaginalis*, *N. gonorrhoeae* y *C. albicans*.

En parejas sexuales de varones infectados asintomáticos, también se ha comprobado el aumento en el número de células plasmáticas en el área endocervical, lo que relaciona la producción de anticuerpos locales con los mecanismos inmunitarios de protección .

De otra parte, el suero de pacientes infectados transfiere protección a ratones infectados intraperitonealmente por *T. vaginalis* (Teras, 1961; Honigberg, 1970). Estos resultados confirman el papel protector del suero, que debe ir ligado a la existencia de anticuerpos específicos; sin embargo, no queda claro cómo esas inmunoglobulinas, que han sido incapaces de proteger al donante del suero, hacen posible la inmunización y evitan los efectos del parásito inoculado experimentalmente.

Aunque en la actualidad sigue sin estar claro el papel que juegan los anticuerpos séricos y vaginales, Abraham *et al.* (1996) consiguen una protección significativa tras la inmunización subcutánea con el parásito en un modelo murino de infección vaginal. Sin embargo, cuando la primo-infección se efectúa por vía vaginal, tratando a continuación a los animales con metronidazol, no se aprecia protección frente a la reinfección vaginal. La presentación antigénica debe ser crucial en la inducción de una respuesta inmune y, en este sentido, la presentación sistémica resulta ventajosa sobre la presentación local (vaginal). Este hecho puede explicar por qué las infecciones humanas repetidas no inducen protección o una respuesta inmune detectable, en comparación con la inmunización experimental por vía subcutánea. Además, el sistema inmune del ratón puede responder a un antígeno diferente o puede procesarlo de modo totalmente distinto a como lo hace el sistema inmune humano.

En la infección humana, parece que la respuesta de anticuerpos no es elevada, e incluso, durante la infección activa, los títulos son bajos (Honigberg, 1987; Alderete *et al.*, 1991).

La ausencia de respuesta protectora en infecciones repetidas puede también atribuirse a la heterogeneidad antigénica de *T. vaginalis*. Además, como muchos otros protozoos, utiliza la variación fenotípica como mecanismo de la evasión inmune. Alderete *et al.* (1992) han encontrado que en su membrana se expresan alternativamente dos clases de marcadores: unas glicoproteínas altamente inmunógenas (P270) y las adhesinas (AP65, AP51, AP33 y AP23). Mientras que todos los aislamientos (tipo I y tipo II) sintetizan P270, sólo los de tipo II pueden experimentar variación fenotípica entre la expresión citoplásmica y superficial de P270. Por ello los fenotipos han sido denominados como A+B- (P270 positivo) y A+B- (P270 negativo) (Alderete, 1988). Los organismos con fenotipo positivo carecen de adhesinas y no se unen a las células del hospedador, y sólo lo hacen los fenotipo negativo. Después del cultivo prolongado *in vitro* van adquiriendo el fenotipo positivo, mientras que *in vivo* ocurre lo contrario (Alderete, 1987).

La glicoproteína P270 tiene epitopo inmunodominante, que es importante para la unión a anticuerpos (Dailey & Alderete, 1991). Su ausencia en la superficie celular y la naturaleza recesiva de las adhesinas permita a los organismos con fenotipo negativo evitar el ataque de

los anticuerpos (Alderete, 1987). Además, las adhesinas pueden mimetizar la estructura del enzima málico, lo que puede determinar su escasa inmunogenicidad (Alderete *et al.*, 1995; Engbring *et al.*, 1996), siendo este mimetismo molecular otro ejemplo de cómo los tricomonádidos pueden escapar a la detección por el sistema inmune.

Otro inmunógeno de alto peso molecular, el denominado P230, presente en la superficie de todos los organismos, puede experimentar cambios conformacionales que le permiten evadir a los anticuerpos (Alderete *et al.*, 1987). Además, la respuesta de anticuerpos está restringida a uno o unos pocos epitopos de P230 (Alderete *et al.*, 1991), lo que permite al parásito evitar la opsonización.

*T. vaginalis* dispone de otros mecanismos de evasión de la respuesta inmune. Así, Provenzano y Alderete (1995) y Min *et al.* (1997) han comprobado que muchas cisteín-proteasas secretadas por el parásito degradan IgG, IgM e IgA, y Pearson y Alderete (1982), que puede recubrirse de proteínas plasmática del hospedador, lo que impediría al sistema inmune reconocerlo como extraño.

En definitiva, el parásito ha desarrollado numerosas estrategias para evadir el sistema inmune del hospedador, lo que unido a su localización privilegiada, que, de entrada, le permite una escasa estimulación antigénica, explican la respuesta inmune moderada que desencadena, a la vez que dificulta el esclarecimiento de los mecanismos implicados. A pesar de ello, los éxitos logrados en los animales de experimentación, sometidos a diferentes pautas de inmunización, como ocurre en el modelo de Abraham *et al.* (1996) han hecho resurgir las esperanzas para el desarrollo de una vacuna. Las altas cifras de incidencia, a pesar de la disponibilidad de tratamiento, apoyan la investigación en este sentido.

#### B.- Anticuerpos locales

Al igual que ocurre con los anticuerpos séricos específicos, no está claro el papel que juegan los anticuerpos locales de la vagina en la protección. Su existencia en secreciones cervicovaginales ha sido comprobada por técnicas de radioinmunoensayo (Ackers *et al.*, 1975),

inmunoenzimáticas (Street *et al.*, 1982; Alderete, 1984) y de inmunofluorescencia (Su-Lin, 1982). En general, IgG e IgA se detectan en la mayoría de las mujeres infectadas, mientras que IgM e IgE sólo se observan en un pequeño porcentaje.

Se ha postulado que los anticuerpos locales podrían estar implicados en la escasa o nula sintomatología de la tricomonosis en el varón, pero no concuerda con los bajos títulos de anticuerpos detectados (Ackers *et al.*, 1978).

Según Goldstine *et al.* (1983), las IgA locales pueden potenciar el efecto opsonizador de IgG para la fagocitosis por leucocitos polimorfonucleares. Sin embargo, no existen evidencias de su participación en la respuesta protectora; incluso en algunos casos (Alderete *et al.*, 1991) no se detectan anticuerpos vaginales. En el trabajo de Abraham *et al.* (1996) se detectan más IgG que IgA en los lavados vaginales de ratones inmunizados por vía subcutánea con *T. vaginalis* suspendidos en adyuvante de Freund, confirmando la inducción de anticuerpos en las secreciones vaginales, cuando se utiliza una ruta sistémica para la inmunización (Thapar *et al.*, 1990; Bouvet *et al.*, 1994). Aunque Abraham *et al.* (1996) han demostrado la relación entre respuesta inmune humoral y protección, otros procesos inmunes deben estar implicados. El adyuvante completo de Freund es un estimulante de la respuesta inmune humoral y celular, mientras que el incompleto estimula principalmente la humoral (Cooper, 1994). Ambos son utilizados en el modelo de inmunización de Abraham *et al.* (1996), por lo que sugieren que la inmunización con los protozoos suspendidos en esos adyuvantes puede inducir ambas ramas del sistema inmune.

### C.- Inmunidad mediada por células

La inmunidad celular ha sido citada entre los mecanismos de protección contra la infección por *T. vaginalis* (Mason & Patterson, 1985). Aunque no hay evidencias de su eliminación directa por células T citotóxicas, sí se ha comprobado la intervención de macrófagos y neutrófilos (Ackers, 1990). Landolfo *et al.* (1980) demostraron, midiendo la liberación de timidina tritiada por organismos marcados, cómo una población celular (posiblemente macrófagos) no estimulada, procedente de la cavidad peritoneal de ratones BALB/c, era capaz

de aniquilar *in vitro* al parásito. De las 19 cepas utilizadas en los ensayos, tan sólo 4 presentaban baja citotoxicidad.

Posteriormente, Martinotti *et al.* (1985) indicaron que la citotoxicidad de los macrófagos procedentes de ratones BALB/c sanos puede incrementarse por incubación con células T de ratones previamente inmunizados con antígeno. La incubación con células T de ratones inoculados con albúmina sérica bovina produce una disminución significativa de la activación, mientras que las células T de ambos grupos inmunizados carecen por sí mismas de actividad citotóxica. En definitiva, como ocurre en una amplia variedad de infecciones microbianas, la activación de macrófagos por linfocinas producidas por células T sensibilizadas es un elemento clave en la defensa frente a patógenos.

La capacidad de los neutrófilos para eliminar al parásito ha sido comprobada *in vitro* por Rein *et al.* (1980), parece uno de los mecanismos dependiente de O<sub>2</sub> y complemento, aunque ocurre en ausencia de anticuerpos específicos, sugiriendo los autores que la activación de la vía alternativa del complemento determina la unión del componente C3b a la superficie del parásito. Posteriormente, C3b se une a los receptores específicos de los neutrófilos. Los autores presentan de forma fascinante, cómo los neutrófilos rodean y fraccionan un parásito, demasiado grande para ser ingerido entero, concluyendo con la fagocitosis por partes del tricomonádido.

Yano y su equipo (1983) estudiaron la respuesta a antígenos parasitarios de linfocitos sanguíneos de pacientes con tricomonosis. Mediante la incorporación de timidina tritiada, detectan linfoproliferación en presencia de antígenos solubles obtenidos por sonicación de parásitos mantenidos en cultivo. La respuesta depende de la presencia de linfocitos T cooperadores (Th). Con antígenos de excreción-secreción procedentes de cepas de alta o baja virulencia se consiguen resultados similares (Mason & Patterson, 1985). En ningún caso los antígenos actúan como mitógenos inespecíficos, ya que es una de las estrategias adoptadas por algunos protozoos para inducir inmunodepresión (Ackers, 1990).

### 2.9.2. Inmunomodulación

Los inmunomoduladores son productos de origen natural o sintético que modifican directamente la función inmunitaria específica y tienen un efecto neto negativo o positivo en la actividad del sistema inmunológico. Los usos clínicos contemplan desde la reconstitución de la deficiencia inmunitaria a la supresión de la función inmunitaria normal o excesiva. Los avances de la Biología Molecular han permitido la identificación de una cantidad creciente de sustancias capaces de modular, de manera específica, la respuesta inmune. Básicamente se destacarán entre ellas, los interferones, las interleucinas, los factores de necrosis tumoral y estimulantes de colonias, y de otra parte, los anticuerpos monoclonales.

Los mecanismos de inmunomodulación deben dirigirse hacia cualquiera de las células que participan en la regulación de la respuesta inmunológica: linfocitos B, T y células presentadoras de antígeno (CPA). Principalmente, hacia los células T ya que son el eje fundamental de la regulación de la respuesta humoral y celular. La mayor parte de los esfuerzos se han enfocado hacia las interleucinas, que proporcionan señales de activación para células del sistema inmunológico. En la actualidad se utilizan combinaciones de interleucinas en investigación clínica, lo mismo que combinaciones de interleucinas con anti-metabolitos o factores de necrosis tumoral, o ambos.

La presencia de receptores específicos en las superficies celulares para la mayor parte de las interleucinas, también hace posible, cuando se han identificado los receptores, examinar los efectos de los anticuerpos monoclonales dirigidos contra tales receptores. Dichos anticuerpos pueden mimetizar o inhibir los efectos de las interleucinas.

Las técnicas de ADN recombinante ha proporcionado cantidades ilimitadas de citocinas muy purificadas, lo que permite la evaluación clínica de estas sustancias en ausencia de otros agentes fisiológicamente activos.

En una etapa previa, en ausencia de compuestos purificados, se utilizaron varios inmunomoduladores inespecíficos para incrementar la respuesta del hospedador en ciertas

situaciones clínicas. Estos se pueden dividir en tres clases: productos de origen microbiano, productos derivados de mamíferos y productos de síntesis.

### **Inmunomoduladores no específicos**

#### **I. Productos de origen microbiano:**

Bacilo de Calmette-Guérin (BCG).  
Bestatin.  
Parvum.  
Endotoxina.  
Esqueleto de la pared celular de *Nocardia rubra*.

#### **III. Productos de síntesis:**

Azimecón.  
Cimetidina.  
Inosine pranobox  
Levamisol.

#### **II. Productos derivados de mamíferos:**

Timosina  $\alpha_1$ .                      Timomodulina  
Timosina fracción 5.              Timoestimulina

Los inmunomoduladores no específicos de origen microbiano, han demostrado un beneficio terapéutico limitado, baja pureza y variabilidad del producto de un lote a otro.

No obstante, dentro de los estimulantes inmunitarios no específicos de naturaleza fúngica podemos encontrar: Un glicofosfopéptido (Inmunoférón<sup>®</sup> o AM-3) que, por su acción como estimulante sobre las defensas del organismo, está indicado en inmunodeficiencias secundarias a enfermedades o fármacos, y en general como tratamiento coadyuvante de terapias específicas, en procesos neoplásicos o infecciosos en los que exista un déficit de inmunidad celular. El fármaco Inmunoférón<sup>®</sup> produce un incremento de IL-2 y la síntesis de células NK en el bazo de ratones inmunocompetentes, tratados con 30 mg/Kg/día (15 días), sin que favorezca la linfoproliferación por mitógenos de células T y B (Rojo *et al.*, 1986). Ocasionalmente puede producir hipercalcemia.

Los inmunomoduladores no específicos derivados de mamíferos incluyen timosinas, sustancias similares a hormonas producidas por el timo, las cuales tienen diversas actividades biológicas como aumento de las respuestas inmunológicas en animales normales y timentomizados. Aunque son potencialmente útiles en el tratamiento de estados de



inmunodeficiencia, aún no han demostrado en los estudios clínicos controlados una eficacia significativa.

Nikolsky *et al.* (1990) investigan la capacidad de las subpoblaciones linfocitarias para sintetizar sustancias con actividad timosina bajo la influencia de la timoestimulina, un preparado de factores tímicos. Los linfocitos T sintetizan sustancias análogas a la timosina en respuesta a la administración de timoestimulina. La administración de un factor tímico TP-1 (timoestimulina) a ratones produce un aumento en la actividad NK (Bistoni *et al.*, 1984). Por otra parte, el efecto de este fármaco sobre la hematopoyesis de ratones tratados con un agente inmunosupresor (ciclofosfamida) reduce la actividad mielosupresiva (Balleari *et al.*, 1993).

En pacientes con cáncer, la timoestimulina restablece la quimiotaxis monocítica deficiente y la capacidad de agrupamiento de las células dendríticas en presencia del tumor (Kerrebijn *et al.*, 1996). La combinación de IFN- $\gamma$  y timoestimulina es más eficaz en la regulación positiva de algunos parámetros inmunes tales como la relación CD4+/CD8+ y la actividad antibacteriana dependiente de células (Munno *et al.*, 1995). Tanto en sistemas *in vitro* como *in vivo*, la timoestimulina incrementa significativamente la producción de IL-2, IFN- $\gamma$ , la linfoproliferación y expresión de receptores para la IL-2; así como la citotoxicidad (Lin *et al.*, 1988).

El tratamiento de una inmunodeficiencia con timoestimulina favorece la reconstitución de la función de las células B en la respuesta humoral (Lin *et al.*, 1987). Además, la timoestimulina restaura las proporciones de células T deficientes en pacientes con linfoma de Hodgkin y pueden incrementar las funciones citolíticas que son potencialmente importantes en la inmunovigilancia del hospedador (Liberati *et al.*, 1985).

Los compuestos sintéticos como levamisol, fármaco antihelmíntico capaz de inhibir la actividad de las células T supresoras, constituyen la tercera clase de compuestos. El estado actual de la aplicación de inmunomodulares para el tratamiento del cáncer, debe considerarse experimental.

### 2.9.2.1. Inmunosupresión

El desarrollo de la inmunología clínica ha descubierto una serie de enfermedades causadas por respuestas inmunitarias alteradas. Esto ha llevado a la búsqueda de fármacos capaces de inhibir estas reacciones no deseadas. Estos grupos de compuestos van encaminados a alcanzar una inhibición no específica de la respuesta inmune (Ben-Yehuda *et al.*, 1988).

La inmunosupresión inespecífica disminuye o suprime la actividad del sistema inmunitario, sea cual fuere el antígeno. La mayoría de los tratamientos inespecíficos que se emplean actualmente son selectivos para el sistema inmunitario, o se utilizan de tal modo que crean una cierta selectividad. Sin embargo, los efectos secundarios de cualquier tratamiento inespecífico son difíciles de evitar en su totalidad. Entre los más destacados podemos señalar los corticosteroides, la ciclosporina y análogos, fármacos citotóxicos y anticuerpos antilinfocitarios.

Los esteroides tienen propiedades antiinflamatorias y suprimen los macrófagos activados, interfieren en la función de las CPA y reducen la expresión de los antígenos CMH. En efecto, los esteroides anulan muchas de las acciones que ejerce el IFN- $\gamma$  sobre los macrófagos y los tejidos trasplantados. Según Florez *et al.* (1992), la actividad de los corticosteroides se puede resumir en el efecto sobre la circulación leucocitaria, su capacidad para alterar funciones celulares específicas y otras actividades antiinflamatorias.

La administración intravenosa de glucocorticoides produce neutrofilia, debida a la liberación de neutrófilos maduros desde la médula ósea y una disminución concomitante del número total de linfocitos, monocitos, eosinófilos y basófilos (Claman, 1983); la quimiotaxis y liberación de enzimas lisosómicas no se ven afectadas (Behrens & Goodwind, 1989).

Los linfocitos T circulantes disminuyen marcadamente, mientras que los linfocitos B lo hacen de forma moderada. Los esteroides alteran la respuesta linfoproliferativa *in vitro* de los linfocitos T mediante el bloqueo de la síntesis y secreción de IL-2 (Zweiman, 1984). El efecto de los corticosteroides sobre los linfocitos B reduce las concentraciones séricas de IgG

e IgA, pero no de IgM, tras 3 semanas de administración (Meuleman & Katz, 1985).

Los esteroides producen numerosos cambios en las funciones monocito-macrófago, siendo capaces de suprimir la actividad bactericida de dichas células fagocíticas e interfiriendo en la función de presentación del antígeno. Otros efectos incluyen la interferencia en la migración del monocito en respuesta a factores quimiotácticos, un bloqueo de la diferenciación de los monocitos a macrófagos y supresión de la capacidad de los monocitos para expresar receptores para Fc y para el complemento (Behrens & Goodwind, 1989). Asimismo, suprimen la capacidad de las células reticuloendoteliales para fagocitar antígenos revestidos por anticuerpos, por la ausencia de los receptores citados.

La ciclosporina es un macrólido fúngico, aislado de *Tolypocladium inflatum* en USA y Noruega. Inicialmente tuvo interés como antibiótico, aunque dicha actividad es más bien mediocre, pero tiene propiedades inmunosupresoras potentes y de gran interés. Su acción principal es la de suprimir la producción de linfocinas por parte de las células Th y reducir la expresión de los receptores de IL-2 en los linfocitos que experimentan la activación (Shevach, 1985), sin afectar a las células T supresoras, linfocitos B, granulocitos o macrófagos (Florez *et al.*, 1992). De este modo, bloquea selectivamente las respuestas inmunes dependientes de linfocitos T cooperadores (Th). Al contrario que los fármacos citotóxicos, es capaz de producir inmunosupresión sin producir linfólisis.

El tratamiento prolongado con ciclosporina produce efectos secundarios como hiperplasia gingival, hirsutismo y diversas patologías del sistema nervioso central (Bennet & Norman, 1986). Otros macrólidos procedentes de hongos del suelo poseen también propiedades inmunosupresoras. Uno de ellos es el FK-506 (*Streptomyces tsukubaensis*), procedente de Japón. En modelos experimentales, FK-506 inmunosuprime la activación de linfocitos B y T en respuesta a señales mitogénicas y antigénicas (Kino *et al.*, 1987), impidiendo la producción de linfocinas por parte de las células T cooperadoras (Thomson *et al.*, 1993). En este sentido, FK-506 es unas 100 veces más potente que la ciclosporina como inhibidor selectivo de la secreción de IL-2, IL-3 e IFN- $\gamma$ .

La activación de los linfocitos B inducida por componentes bacterianos no se ve inhibida por FK-506.

A nivel molecular, el macrólido interactúa con receptores citoplásmicos (proteínas de unión a FK-506) para bloquear los factores de transcripción implicados en la regulación de la expresión de genes, que codifican para linfocinas y activan los linfocitos T (Yocum, 1996). La capacidad de FK-506 para inhibir linfocitos activados depende de la naturaleza del mitógeno. La activación linfocitaria que es dependiente de la elevación de calcio citoplásmico es bloqueada por FK-506 y ciclosporina; mientras que las respuestas que están mediadas por la proteína-quinasa C (PKC) o calcio independientes no son sensibles a estos fármacos (Kay *et al.*, 1991).

El fármaco está indicado para el tratamiento del rechazo de trasplantes (aloinjerto) de hígado, riñón y corazón, en pacientes que no hayan respondido a otros inmunosupresores (Starzl *et al.*, 1990).

Tanto FK-506 como la ciclosporina modulan la respuesta inmunitaria a nivel de la mucosa intestinal humana, lo que ha permitido su uso en el tratamiento posterior a pacientes con trasplante de hígado (Elitsur *et al.*, 1995).

A nivel experimental, Asano y su equipo (1995; 1996) demuestran la capacidad de FK-506 para regular la inmunidad protectora en infecciones por *Hymenolepis nana* sobre ratones BALB/c. En este modelo, la inmunidad protectora depende de la respuesta de los linfocitos Th1 (respuesta celular) (Asano *et al.*, 1993) y el tratamiento inmunosupresor (10 mg/Kg/día, durante 5 días), que favorece la disminución de la IL-2 e IFN- $\gamma$  en los linfocitos de los nódulos mesentéricos, bloquea la activación de dichas células T y la secreción de linfocinas a nivel transcripcional.

Los efectos adversos señalados son muy variados: alérgicos/dermatológicos (fiebre, prurito, exantema y ocasionalmente alopecia); cardiovasculares (hipertensión, edema periférico); digestivos (náuseas, vómitos, anorexia, estreñimiento y diarrea); genitourinarios

(nefrotoxicidad, infecciones urinarias); hepatobiliares (transaminasas altas, ascitis, hepatitis e ictericia); metabólicos (hiperglucemia, hiperpotasemia, hipomagnesemia); neurológicos (cefalea, temblores, parestesia); oculares (ambliopía, visión borrosa, fotofobia); osteomusculares (dolores de espalda); psicológicos/psiquiátricos (insomnio, astenia, depresión, psicosis); respiratorios (disnea, efusión pleural) y sanguíneos (anemia, leucocitosis, trombocitopenia).

La rapamicina interfiere en las vías intracelulares de expresión del receptor de IL-2 y, por consiguiente, impide la activación linfocitaria dependiente de IL-2. Otro es la rapamicina, cuyo nombre viene de *Rapa Nui*, la denominación de la isla polinésica de Pascua (Easter).

Los fármacos citotóxicos son compuestos químicos capaces de eliminar células autoreplicantes. Por tanto, los linfocitos inmunológicamente competentes representan una población susceptible al tratamiento (Black & Livingston, 1990). Si inicialmente se utilizaron en el tratamiento contra el cáncer (Balis, 1986), más tarde se comprobaron las propiedades inmunosupresoras (Clements & Davis, 1986), extendiéndose su aplicación a enfermedades causadas por respuestas inmunes aberrantes y a la supresión del rechazo de trasplantes. De entre los inmunosupresores más habituales en clínica destacan: ciclofosfamida, azatioprina, metrotexato y clorambucil.

La ciclofosfamida presenta un mayor efecto inmunosupresor sobre los linfocitos B que T, y por lo tanto, incide más eficazmente sobre las respuestas inmunes alteradas mediadas por anticuerpos que por células (Cupps *et al.*, 1982). Tal circunstancia puede producir, paradójicamente, que el tratamiento inmunosupresor sea capaz de aumentar una respuesta inmunológica específica. La toxicidad directa del fármaco sobre los linfocitos T supresores explica, en buena medida, el efecto controvertido (Cupps *et al.*, 1982; Clements & Davis, 1986). Los efectos citotóxicos predominantes, según Nashel (1985), se explican por la capacidad de unir y entrecruzar cadenas de ADN. Este efecto alquilante puede provocar la muerte inmediata de la célula diana, o bien, la célula puede recibir una lesión letal que se expresa durante la siguiente división mitótica.

No obstante, la ciclofosfamida presenta efectos colaterales adversos que incluyen la supresión de la hematopoyesis y síntomas gastrointestinales como dolor abdominal, náusea, vómito. Además se ha indicado disfunción gonadal (esterilidad permanente) y cistitis hemorrágicas. Otros efectos poco frecuentes como la alopecia también han sido señalados. Finalmente, los riesgos de infecciones oportunistas y neoplasias (linfoma no Hodgkin, carcinoma de vejiga, leucemia mielógena) son superiores en los pacientes tratados con el medicamento.

La azatioprina es un fármaco antiproliferativo. Es un derivado de la 6-mercaptopurina, cuya incorporación en el ADN de las células en división impide la ulterior proliferación. Además, bloquea por inhibición enzimática competitiva la síntesis del ácido inosínico, precursor de los compuestos púricos, impidiendo la síntesis de ADN y, en menor medida, de ARN. Este medicamento citotóxico parece inhibir preferentemente las respuestas de células T. No obstante, se pueden suprimir las respuestas celulares y humorales. En cualquier caso, la azatioprina parece capaz de reducir las células NK circulantes y las células responsables de la citotoxicidad dependiente de anticuerpos (Clements & Davis, 1986).

Los efectos linfotóxicos se dirigen hacia las células en replicación activa. Los tratamientos controlados no producen reducción en el número de linfocitos T o B en sangre periférica, pero disminuyen el número de linfocitos activados, que se encuentran en un ciclo activo proliferativo después de la exposición a un antígeno adecuado. La azatioprina no reduce los títulos de anticuerpos específicos. La cantidad de monocitos y neutrófilos se reduce, en función de la dosis, por la toxicidad del fármaco sobre los precursores hematopoyéticos, células de la mucosa gástrica y células germinales en las gónadas. Por consiguiente, los efectos secundarios atribuibles incluyen depresión de la médula ósea, toxicidad gastrointestinal e infertilidad ( Jolivet *et al.*, 1983; Fraiser *et al.*, 1991; Rossi *et al.*, 1993).

Metotrexato es un inhibidor específico de la hidrofolato reductasa, que interviene en la síntesis de la timidina e impide, por tanto, la síntesis de ADN. Inicialmente, fue uno de los primeros fármacos anticancerosos pero después se demostró su eficacia para el tratamiento de la psoriasis. Los estudios experimentales indican que es un poderoso inhibidor de la respuesta

humoral y celular, con un alto margen terapéutico. Sin embargo, no se conocen bien los mecanismos de acción mediante los cuales ejerce su acción frente a enfermedades reumáticas.

Los efectos adversos de metotrexato son principalmente fibrosis hepática, neumonitis por hipersensibilidad, mucositis y anemia megaloblástica. Estas complicaciones, generalmente, no se presentan en las dosis empleadas en el tratamiento de las enfermedades reumáticas.

Clorambucil es un fármaco de propiedades alquilantes análogo a la ciclofosfamida, posee menor toxicidad pero no es tan poderoso como inmunosupresor. Se ha usado eficazmente para el tratamiento de la artritis reumatoide y granulomatosis de Wegener, entre otras patologías inmunitarias.

Presenta la ventaja sobre la ciclofosfamida de no producir alopecia ni cistitis hemorrágica y ser menos irritante para el aparato digestivo. Aunque, de otra parte, provoque la supresión de la médula ósea, interfiera en la función gonadal e incremente el riesgo de infecciones oportunistas y cánceres.

Los anticuerpos antilinfocitarios son los agentes inespecíficos más selectivos. Se han utilizado dos tipos de preparaciones de anticuerpos:

1.- Anticuerpos policlonales, que reaccionan con determinantes de múltiples membranas, como el suero antitimocito (ATS) (Heyworth, 1982). Los efectos secundarios debidos a anticuerpos policlonales antilinfocitos comprenden entre otros: fiebre, escalofríos, erupciones y artralgias (Rossi *et al.*, 1993).

2.- Anticuerpos monoclonales especialmente dirigidos contra las moléculas de la superficie linfocitaria CD3, CD4, CD8 y el receptor de IL-2 (IL-2R); su misión es eliminar las células, o al menos, bloquear su función. Anticuerpos monoclonales como el OKT3, que posee especificidad por el antígeno CD3 presente en los linfocitos T, ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del rechazo agudo del trasplante renal, hepático y cardíaco, obteniéndose en algunos casos resultados similares a los conseguidos por terapias convencionales con

esteroides; incluyendo síntomas similares a los de un cuadro gripal, cambios en la presión arterial y disnea (Goldstein, 1987; Cosimi, 1987).

Estos agentes pueden ser eficaces empleados independientemente, aunque se requieren altas dosis, lo que aumenta las probabilidades de que surjan efectos adversos. La utilización conjunta de diferentes tipos de inmunosupresores favorece la actuación sinérgica, interfiriendo a distintos niveles. La sinergia implica que dos agentes terapéuticos trabajen siempre para producir un efecto mayor del esperado individualmente. Así, un fármaco puede: a) modificar el metabolismo del segundo, b) incrementar la actividad del segundo por interacción con su sitio activo, c) actuar independientemente con otro sobre diferentes aspectos de complejos mecanismos fisiopatológicos, entre otras posibilidades (Hlatky *et al.*, 1991).

#### 2.9.2.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

Numerosos compuestos químicos, tanto de origen natural como sintético tienen actividad antiinflamatoria *in vivo*. Esta actividad es el resultado de su interacción con las células implicadas en la respuesta inflamatoria y sobre los mediadores liberados durante el proceso.

Dentro de este grupo, los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) constituyen un grupo heterogéneo, cuya única relación química es que muchos de ellos son ácidos orgánicos, que presentan propiedades antitérmicas, analgésicas y antiinflamatorias (Lorenzo-Velázquez, 1987). Entre los mecanismos de acción identificados para los AINEs se encuentran (Navarro, 1998):

- 1.- Inhibición de los procesos de biosíntesis y liberación de mediadores inflamatorios en células diana.
- 2.- Inhibición de los procesos de activación de los leucocitos y de las funciones desarrolladas por éstos.
- 3.- Inhibición de los procesos de daño tisular asociados a la acción de las enzimas proteolíticas y radicales reactivos de oxígeno y nitrógeno.



### Inhibición de los procesos de biosíntesis y liberación de mediadores inflamatorios en células diana.

Los AINEs producen un bloqueo de la ruta biosintética de la ciclooxigenasa, al inhibir directamente esta enzima, de tal forma que disminuyen la síntesis y, por tanto, la liberación de prostanoïdes.

El descubrimiento de dos isoformas de la ciclooxigenasa, una de ellas implicada en el mantenimiento de las funciones fisiológicas importantes para el organismo (COX-1) y la otra más relacionada con el proceso inflamatorio (COX-2), ya que es inducida por mitógenos (LPS) y/o citocinas, ha renovado el interés por el diseño de nuevos fármacos inhibidores selectivos de la COX-2, que serán más eficaces y de menos efectos secundarios, especialmente a nivel gastrointestinal.

A nivel enzimático, estos inhibidores actúan mediante cuatro mecanismos diferentes (Kurumbail *et al.*, 1996):

- Inactivación irreversible de COX-1 y COX-2 mediante acetilación del sitio activo de la enzima (v.g. Ácido acetilsalicílico).
- Inhibición competitiva reversible de las dos isoenzimas. Compiten con el sustrato por el sitio activo de las enzimas (v.g. Mefenamato e ibuprofeno).
- Inhibición lenta, dependiente de tiempo, de las dos isoenzimas. El inhibidor produce un cambio conformacional en la estructura de la enzima (v.g. Flurbiprofeno e indometacina).
- Inhibición selectiva de la COX-2. Estos productos son leves inhibidores competitivos de la COX-1 pero inhiben la COX-2 de una forma lenta y dependiente del tiempo (v.g. El fármaco NS-398).

Por otra parte, se han desarrollado numerosos sistemas biológicos con el fin de investigar la selectividad de estos principios activos sobre la inhibición de ambas isoenzimas. Los resultados se expresan como el cociente entre la concentración inhibitoria 50 (CI<sub>50</sub>) entre COX-2 y COX-1.

Así, se puede obtener una clasificación de los inhibidores utilizando dicho parámetro.

Moléculas con cociente: COX-2/COX-1 alto: Indometacina, piroxicam.  
COX-2/COX-1 medio: Diclofenaco, ibuprofeno.  
COX-2/COX-1 bajo: Nimesulide, meloxicam.

De otra parte, se ha observado que algunos AINEs como el naproxeno y el ácido acetilsalicílico inhiben la expresión de la COX-2 en células endoteliales estimuladas por IL-1. Sin embargo, cuando estos estudios se llevan a cabo en macrófagos no se aprecian alteraciones en la expresión de esta enzima, con lo que se puede concluir que no actúan a este nivel, sino que sólo inhiben la actividad enzimática (Barrios-Rodiles *et al.*, 1996).

#### Inhibición de los procesos de activación de los leucocitos y de las funciones desarrolladas por éstos.

Los AINEs son moléculas planas de carácter lipófilo, capaces de insertarse en la bicapa lipídica de la membrana de leucocitos, produciendo alteraciones en su viscosidad y afectando, por tanto, a los procesos de transducción de las señales que tiene lugar a este nivel.

Como consecuencia, alteran la actividad de enzimas asociadas a estas membranas, como la fosfolipasa C en macrófagos o la NADPH oxidasa en neutrófilos, produciendo una menor activación de los leucocitos y por tanto una inhibición en la generación de radicales superóxido, así como en los procesos de degranulación de enzimas lisosomales y de agregación con otras células (Abramson & Weissmann, 1989). Esto se corrobora con el hecho de que algunos AINEs, además de actuar mediante la inhibición de las ciclooxigenasas, también alteran las funciones de los leucocitos por mecanismos independientes de la disminución de prostaglandinas.

Así, se ha observado que la indometacina, piroxicam, ibuprofeno y salicilatos inhiben la agregación de neutrófilos; que el piroxicam y la indometacina inhiben la generación de radical superóxido; y que los salicilatos son capaces de inhibir la actividad de la fosfolipasa C en monocitos (Bomalaski *et al.*, 1986; Abramson & Weissmann, 1989).

Asimismo, se ha comprobado que como consecuencia de su interacción con los procesos de transducción de señales, probablemente a nivel de proteínas G, el piroxicam produce también alteraciones en la expresión de las moléculas de adhesión en la superficie del leucocito. Este AINE previene los cambios conformacionales de las integrinas inducidos en neutrófilos, linfocitos y distintas citocinas, de tal forma que impide los procesos de adhesión de leucocitos a la célula endotelial, evitando por tanto su infiltración (García-Vicuña *et al.*, 1997).

La interacción con los procesos de biosíntesis de citocinas, que tienen lugar en algunas células inflamatorias, como macrófagos y linfocitos principalmente, limita su liberación y por tanto sus efectos proinflamatorios. Así, en modelos quirúrgicos experimentales se ha demostrado que metamizol, indometacina y diclofenac inhiben la síntesis de IL-4, IL-6 e IL-1, a través de la inhibición de la ciclooxigenasa, y por ende la disminución de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>). Finalmente, metamizol también activa la síntesis de IL-10, aunque según los modelos de forma poca significativa (García-Álvarez *et al.*, 1997).

#### Inhibición de los procesos de daño tisular asociados a la acción de las enzimas proteolíticas.

También mediante mecanismos inespecíficos se consigue inhibir la adhesión de neutrófilos a la célula endotelial activada. Así algunos AINEs, como el ácido acetilsalicílico y la indometacina, inhiben este proceso por activación de mecanismos proteolíticos que afectan a la unión de la selectina L en la membrana del leucocito, induciendo, por tanto, su eliminación (Díaz-González *et al.*, 1995).

El diclofenac, la fenilbutazona y su metabolito activo la oxifenilbutazona, inhiben a concentraciones elevadas, y por un mecanismo competitivo, la actividad de la elastasa y la catepsina G. Estas enzimas, de origen lisosomal, están ampliamente implicadas en los procesos de degradación tisular que acompañan a las enfermedades reumáticas (Steinmeyer & Kalbhen, 1996).

## 2.9.2.2.2. Otros fármacos inmunomoduladores: SAMe

La sulfoadenosil-L-metionina (S.amet<sup>®</sup>) es una molécula fisiológica que participa como donadora de grupos metilo activos en todas las reacciones de transmetilación que ocurren en el organismo, excepto las de su síntesis. Por esta acción, interviene de forma fundamental en la metilación de los ácidos nucleicos, de los aminoácidos, de los estrógenos, de la serotonina, de la fosfatidiletanolamina y de las catecolaminas (Lehninger, 1985). El metabolismo de S.amet<sup>®</sup> está conectado con la síntesis de la homocisteína, cisteína, cistina y taurina, así como con la ruta de transulfuración para la síntesis de glutatión (Viña *et al.*, 1996).

De estas propiedades se derivan los efectos metabólicos y farmacológicos de S.amet<sup>®</sup>. A nivel hepático, actúa sobre la síntesis proteica, el metabolismo lipídico hepático, la capacidad detoxificante del hígado y la función de membrana del hepatocito. Además, disminuye el cociente de lipoproteínas  $\beta/\alpha$  del plasma por aumento de la síntesis de apoproteína A y de las lipoproteínas de alta densidad (HDL). A nivel cerebral, aumenta el metabolismo de las catecolaminas cerebrales y la disponibilidad de neurotransmisores. A nivel articular, mejora la actividad biológica del cartílago articular por la adecuada sulfonación de su componente conectivo (proteoglicano).

Desde el punto de vista inmunológico, el descenso intracelular de glutatión, cisteína y cistina en el plasma han sido correlacionados con bajos niveles de células T cooperadoras CD4+ (Eck *et al.*, 1992). Más aún, la inhibición de la actividad lítica de las células T citotóxicas CD8+ ha sido correlacionada con el descenso de los niveles de glutatión intracelular (Multhoff *et al.*, 1996).

También la taurina restaura la actividad proliferativa en ratones de edad avanzada (Negoro *et al.*, 1992). De hecho, la taurolidina, un derivado de la taurina, ha sido señalado como protector frente al shock endotóxico y muerte en animales de experimentación (Bedrosian *et al.*, 1991). El tratamiento con S.amet<sup>®</sup> (14 mg/Kg) en un modelo de sepsis quirúrgica en rata induce la proliferación de linfocitos T CD8+ e inhibe la síntesis de IL-1 (García-Álvarez *et al.*, 1997).

## 2.10. ACTIVIDAD BIOLÓGICA DE LOS EXTRACTOS VEGETALES IBEROAMERICANOS PAL y CTP.

Para los ensayos realizados en esta Tesis, se han seleccionado dos extractos de plantas iberoamericanas por sus propiedades inmunomoduladoras: PAL y CTP.

### 2.10.1. PAL (EXTRACTO DE *POLYPODIUM LEUCOTOMOS*)

*Polypodium leucotomos* es un helecho perteneciente a la familia Polypodiaceae e identificado con el género *Polypodium* (*Phlebodium*). Los polipodios engloban alrededor de 250 especies cuyo hábitat más frecuente son las regiones tropicales y subtropicales.

*P. leucotomos* (Poir, 1804) también llamado *Polypodium aureum* (1810), *Phlebodium aureum* o comúnmente Calaguala, se encuentra en bosques abiertos, sobre troncos de árboles u, ocasionalmente, en el suelo o sobre rocas con musgo, y crece a una altitud entre 2000-2500 m. Sus propiedades medicinales se conocen desde la antigüedad<sup>(1)</sup>, habiendo sido ya utilizado por los mayas para el tratamiento de diversas enfermedades.

En 1967 Horvath *et al.* consiguen extraer del rizoma de este helecho una sustancia activa que, inicialmente, denominan Calagualina y posteriormente Anapsos<sup>®</sup>. La denominación PAL del extracto presente en Anapsos<sup>®</sup> es propiedad de ASAC Pharmaceutical International A.I.E.

---

1) En la *Materia Médica*, Dioscórides describe un polipodio y sus virtudes en el capítulo 187 del libro IV. Tomándolos de Laguna, se expresa en los siguientes términos: “El polipodio nace en las piedras mohosas y en los viejos troncos de los árboles, principalmente en los de los robles altos, alto de un palmo, algún tanto vellosos y semejante al helecho, empero no tan menudamente hendido. Su raíz es vellosa y llena de ciertos nudos vacíos como aquellos del pulpo; de más desto, gruesa como el dedo meñique, verde por dentro y algún tanto dulce y austera al gusto, la cual tiene virtud purgativa; y para que mejor la ejecute se da cocida con alguna gallina o con peces o con acelgas o, finalmente, con malvas. Bebida seca, pulverizada, con aguamiel, purga la fiebra y la cólera. Majada y aplicada en forma de emplastro, sirve a los miembros desconcertados y a las grietas que se hacen entre los dedos”. De Laguna, por su parte, añade a este capítulo los comentarios siguientes: “*Polypus*, en griego, quiere decir pulpo, de donde vino a llamarse *polypodio*...” (Font Quer, 1996).

## Acciones Terapéuticas

### A. Actividad antitumoral:

Los estudios sobre neoplasias humanas realizados por Horvath *et al.* (1967), utilizando Anapsos® como tratamiento, demuestran un aumento mínimo en el tiempo de supervivencia de los pacientes, con la característica de no producir efectos secundarios. La actividad metabólica de esta sustancia sobre células tumorales *in vitro*, muestra una inhibición de la síntesis de ADN y proteínas, así como una disminución del transporte de glucosa al interior celular.

No obstante, *in vivo*, parece estimular la síntesis de proteínas y la incorporación de glucosa en el hígado, riñón, bazo, cerebro y músculo de rata; lo que parece sugerir que el efecto antitumoral no se basa en la inhibición del metabolismo, sino en mecanismos de regulación de la membrana plasmática.

Vargas *et al.* (1981), basándose en los resultados precedentes, publican su trabajo sobre la síntesis de ácidos nucleicos y niveles de AMP cíclico en tumores murinos después del tratamiento con Anapsos®. De una parte, los resultados indican que sobre líneas celulares tripsinizadas, para destruir los receptores proteicos de superficie, Anapsos® presenta idéntica actividad que en las células control no tratadas con tripsina.

De otra parte, los niveles de AMP cíclico permanecen casi inalterados, por lo que consideran que el extracto pudiera penetrar al interior celular sin necesidad de receptores, por difusión pasiva a través de la membrana lipídica.. Finalmente, concluyen que Anapsos® actúa sobre diferentes neoplasias murinas inhibiendo la síntesis de ácidos nucleicos (ADN y ARN), no dependiendo su mecanismo de acción de los receptores de membrana ni de las tasas de AMP cíclico. Los autores atribuyeron el efecto antineoplásico a una interacción con receptores citoplasmáticos similar a la ejercida por los glucocorticoides (Vargas *et al.*, 1981).

## B. Actividad antipsoriásica:

Anapsos® se introduce en terapéutica antipsoriásica en 1974 a través de los ensayos realizados por Corrales y Padilla, aunque existen resultados contradictorios realizados por otros autores.

En la misma línea que Corrales y Padilla, los ensayos llevados a cabo por Piñeiro (1982) sobre 495 pacientes afectados de psoriasis revelan que alrededor del 60% de los enfermos tratados con Anapsos® presentan mejorías considerables y que tan sólo en dos pacientes se manifiestan efectos adversos o secundarios.

## C. Actividad frente a la dermatitis atópica

La etiología de la enfermedad se manifiesta por el déficit de linfocitos T con función supresora lo que parece originar respuestas exageradas frente a los alérgenos ambientales (incremento de IgE) y antígenos internos localizados en la epidermis (dermatitis) (Saxon *et al.*, 1980).

Beltrán Buitrago *et al.* (1983) realizan los primeros ensayos clínicos con Anapsos® para el tratamiento de dermatitis atópica, observando ligeras mejorías en los pacientes acompañadas de la remisión de las lesiones, sin ninguna contraindicación ni efectos secundarios. Dichos resultados son coherentes con los obtenidos por Fernández *et al.* (1984) con mejorías ostensibles en los pacientes durante periodos prolongados de tiempo.

Asimismo, Jiménez y su equipo (1987) realizan un estudio sobre 72 pacientes afectados por dermatitis atópica con un cuadro clínico grave en cuanto a la extensión, observando la mejoría más evidente en el grupo tratado con Anapsos®, a pesar de no tener tratamiento tópico con esteroides, que en los tratados con antihistamínicos, con remisión del broncoespasmo y otros síntomas respiratorios asociados.

#### D. Actividad frente a vitiligo

En 1989, Mohammad Mustafa trata a 22 enfermos de vitiligo con Anapsos<sup>®</sup>, obteniendo unos resultados excepcionales, ya que en menos de cinco meses aparece una repigmentación en todos los casos, sin ningún problema de intolerancia.

#### E. Actividad inmunomoduladora

En 1983 se describe, por primera vez, el efecto inmunomodulador de Anapsos<sup>®</sup>. La administración oral del extracto disminuye la respuesta linfoblástica a la estimulación mitogénica y los niveles séricos de inmunoglobulinas después de tres días de tratamiento. Sin embargo, cuando el tratamiento se prolonga a cinco días se produce un incremento en el índice de supresión, la respuesta linfoblástica a mitógenos y la proporción de células CD8+ frente a las CD4+, que permanecen inalteradas. Todas las experiencias fueron llevadas a cabo en individuos sanos voluntarios (Vargas *et al.*, 1983).

Cuéllar del Hoyo *et al.* (1997) investigan el efecto inmunomodulador del extracto de *P. leucotomos* en ratones BALB/c inmunizados con antígenos del tercer estadio larvario (LIII) de *Anisakis simplex*. De una parte, se observa un descenso en los anticuerpos específicos en los animales tratados antes y después de la inmunización. Este descenso fue principalmente en el isotipo IgG<sub>1</sub>. En los animales tratados antes de la inmunización, la reducción de la subclase IgG<sub>1</sub> es muy marcada en relación al grupo no tratado, mientras que la subclase IgG<sub>2b</sub> aparece tempranamente y con niveles ligeramente superiores que en el grupo control. De otra parte, en los animales tratados después de la inmunización también se observa una reducción de la subclase IgG<sub>1</sub>, aunque no es tan marcada como en el grupo tratado en el periodo preinmunización. Los niveles de anticuerpos de la subclase IgG<sub>2a</sub> fueron mayores que los de los grupos no tratados y, como en el grupo preinmunización, los anticuerpos de la subclase IgG<sub>2b</sub> aparecen muy pronto pero permanecen en niveles similares a los de los controles.

En células mononucleares humanas periféricas, co-cultivadas con el extracto PAL, en presencia de mitógenos, se produce la proliferación de linfocitos T y NK, inducidos por



citocinas Th1 como IFN- $\gamma$  e IL-2 (Sempere *et al.*, 1997).

Dea-Ayuela (1999), en ratones BALB/c demuestra que el tratamiento de PAL previo a la inmunización mediante antígeno de *Trichinella spiralis* ocasiona una disminución de las inmunoglobulinas totales a costa de las IgG<sub>1</sub> mientras que aumentan las IgG<sub>2a</sub> y IgG<sub>2b</sub>, apareciendo además IgG<sub>3</sub>.

#### F. Actividad frente a la queratitis herpética

En cuanto a la inmunidad antiviral parecen haberse demostrado varias líneas de defensa entre las que están los anticuerpos, la producción de interferón por los monocitos y la respuesta de los linfocitos T (Schrier *et al.*, 1983).

En particular, la respuesta celular va dirigida a destruir las células que están infectadas por el virus, o al mismo virus. Las células supresoras, al disminuir la replicación de los linfocitos T y B, impedirían la infección y diseminación. Así, en muchas enfermedades virales, se observa un aumento absoluto o relativo de linfocitos T CD8+ en relación con los CD4+ (Carney *et al.*, 1981; 1983; Reinherz *et al.*, 1980).

Vargas *et al.* (1983) manifiestan que Anapsos<sup>®</sup> ejerce una acción positiva sobre los linfocitos T CD8+; al incrementar el índice de dichos linfocitos se activa uno de los mecanismos más potentes conocidos de defensa antiviral.

En 1985 Monclús y su equipo realizan un estudio sobre 27 pacientes con queratitis herpética tratados con Anapsos<sup>®</sup>. Los resultados obtenidos permiten concluir que el extracto es un potenciador de los linfocitos CD8+, asignándosele, asimismo, propiedades colagenopoyéticas (Horvath *et al.*, 1972; Pérez de las Casas *et al.*, 1987). Cabe destacar, una total ausencia de recidivas y de reacciones secundarias, a excepción de molestias gástricas menores en tratamientos prolongados, así como una buena tolerancia al producto.

### G. Actividad frente a herpes zoster

Los ensayos clínicos llevados a cabo por San Martín (1986), en pacientes con herpes zoster, muestran una resolución en todos los casos tras el tratamiento con Anapsos® en menos de 15 días, destacando su rapidez y eficacia, una perfecta tolerancia y la ausencia de efectos secundarios. El tratamiento oral con Anapsos®, en pacientes herpéticos, disminuye el tiempo de evolución a la mitad y produce un marcado alivio del dolor.

Anapsos® ejerce una importante actividad inmunosupresora sin efectos colaterales en tratamientos a largo plazo. La reducción del cociente CD4+/CD8+ supone una inmunosupresión, mientras que el incremento total de CD8+ en sangre periférica, probablemente, reduzca la replicación viral y su diseminación.

Según San Martín (1986), el mecanismo de acción de Anapsos® en las infecciones virales puede consistir en la elevación de linfocitos T citotóxicos, con lo que evitaría la elevada replicación de los linfocitos B, donde se supone están instalados los virus, controlando la infección al inhibir la replicación viral mediante una acción directa de estos linfocitos T sobre los virus.

En este sentido, Vargas y Jiménez (1986), al igual que Casas Tineo *et al.* (1988) demuestran en ensayos clínicos, usando Anapsos® como único tratamiento frente a herpes zoster, que se produce una inhibición en la aparición de las lesiones y un descenso significativo en el tiempo de cicatrización de las mismas.

### H. Actividad frente a patologías oftalmológicas de origen inmunológico

La potencial actividad inmunomoduladora de Anapsos® fue investigada en procesos de queratitis rebeldes u otras patologías oftalmológicas cuya etiología es de carácter inmunológico. Los resultados obtenidos por Suero González *et al.* (1988), tras el tratamiento con Anapsos® muestran que su capacidad epitelizante y regeneradora. El mecanismo de actuación parece basarse en la migración de las células epiteliales sanas hacia la zona ulcerada,

la proliferación celular y mecanismos regeneradores de vasos sanguíneos (Leopoldo, 1981). El extracto parece haberse mostrado eficaz, también, frente a patologías de las mucosas como la estomatitis aftosa (Bagan *et al.*, 1989).

### I. Actividad frente a aloinjertos cutáneos

Pérez de las Casas *et al.* (1987) realizan ensayos quirúrgicos experimentales en ratas, observando que los injertos cutáneos realizados sin tratamiento sufren una rápida alteración de la epidermis a la vez que una afectación del tejido conjuntivo dérmico injertado, experimentando intensos fenómenos degradatorios y de homogenización. Tras el tratamiento con Anapsos<sup>®</sup>, se observa un retraso en la reacción de rechazo, e incluso algunas zonas del aloinjerto son conservadas.

Tuonimen *et al.* (1991) confirman estos resultados. Sus conclusiones ponen de manifiesto que el tratamiento provoca una disminución del rechazo del injerto en trasplantes de piel en ratones, obteniéndose mejor resultado con la administración subcutánea que con la oral. Anapsos<sup>®</sup>, además, es más eficaz en el modelo quirúrgico que la ciclosporina A.

En definitiva, Anapsos<sup>®</sup> prolonga la supervivencia del injerto de piel, retrasa los fenómenos de alteración epitelial del aloinjerto, e induce una rápida cicatrización; lo que parece sugerir que modula la respuesta inflamatoria cutánea. El efecto inmunosupresor de Anapsos<sup>®</sup> ha quedado puesto de manifiesto, lo que explicaría, parcialmente, su acción en diversos desórdenes inmunológicos.

### J. Actividad frente a patologías neurológicas

En los últimos años han cobrado inusitado vigor teorías que vinculan el sistema nervioso central con el inmunológico; nuevas disciplinas como la neuroinmunología, o conceptos como la neuroinmunomodulación adquirirán plena carta de naturaleza en la Ciencia del siglo XXI.

Así, la IL-1, IL-2 o el TNF- $\alpha$ , entre otros mediadores del sistema inmunológico, fueron identificados en el SNC (Nieto-San Pedro & Berman, 1987; Breder *et al.*, 1988; Lieberman *et al.*, 1989; Araujo *et al.*, 1989; Leachan *et al.*, 1990), postulándose una influencia de los mismos sobre las funciones del cerebro y los procesos del comportamiento.

Cacabelos y su grupo (1991) apuntan la relación entre la etiología de desórdenes mentales, como la enfermedad de Alzheimer, y niveles elevados de IL-1 y disminuidos del TNF- $\alpha$ .

Los estudios realizados en un modelo experimental de enfermedad de Alzheimer en rata (Álvarez *et al.*, 1992) señalan que el tratamiento con Anapsos<sup>®</sup> provoca una disminución de la IL-1 $\beta$  y aumenta los niveles de TNF- $\alpha$  en las regiones corticales del hipocampo y reduce la histamina del cerebro. Los animales tratados con el extracto mejoran respecto a los no tratados; lo que permite pensar en una prometedora vía de investigación del tratamiento de las enfermedades mentales degenerativas a través de Anapsos<sup>®</sup>.

Posteriormente, se ha podido comprobar que este extracto actúa como un potencial agente neurotrófico y neuroinmunoregulador modulando la producción de IL-1, IL-2, TNF- $\alpha$  en SNC de ratas tratadas con diferentes dosis (Álvarez *et al.*, 1995).

Cacabelos y Takeda (1995) observan que Anapsos<sup>®</sup> induce hipoactividad, mejorando las habilidades de aprendizaje a través de la modulación de factores inmunes en el cerebro de las ratas, favoreciendo la normalización de las disfunciones de mediadores en lesiones neurotóxicas. El mecanismo de acción de Anapsos<sup>®</sup> parece estar relacionado con el aumento de las actividades neuroinmunomoduladoras y neurotrópicas. Se ha demostrado que la administración única o prolongada de Anapsos<sup>®</sup> revierte la hiperactividad motora y el deterioro del aprendizaje, y tiende a normalizar las alteraciones neuroinmunes cerebrales observadas en un modelo animal de enfermedad de Alzheimer (Álvarez *et al.*, 1995).

La administración por vía subcutánea a ratones viejos durante once meses del extracto vegetal mejora la coordinación psicomotora, sin afectar significativamente la tasa de

supervivencia, la evolución del peso corporal, la ingesta sólida y líquida, ni la aparición de signos neurológicos (Álvarez *et al.*, 1995).

Fernández Novoa *et al.* (1997) indican que, en un modelo de degeneración neuronal por inoculación de la proteína  $\beta$ -amiloide en el hipocampo cerebral de ratas, Anapsos<sup>®</sup> fue capaz de modificar la actividad de la enzima superóxido dismutasa (Cu-Zn-SOD), que disminuye en el hígado, bazo, hipotálamo e hipocampo mientras que en la corteza cerebral se produce un significativo incremento dosis-dependiente. La conclusión extraída de este complejo modelo fisiológico es que el extracto parece participar en los mecanismos de reparación tisular después de una lesión cerebral.

Asimismo, se ha demostrado que Anapsos revierte la sobreexpresión de IL-1 $\beta$  en ratas con lesiones neurotóxicas producidas por ácido iboténico y controla las alteraciones en su comportamiento (Álvarez *et al.*, 1997). Estos resultados confirman la implicación de IL-1 $\beta$  en la neurodegeneración asociada con déficits colinérgicos y la potencial utilidad de los compuestos con actividad neuroinmunotrófica como futura estrategia terapéutica en desórdenes neurodegenerativos.

#### K. Actividad fotoprotectora

Las reacciones agudas de la piel humana a la radiación ultravioleta (290-400 nm) son reconocidas como una forma de inflamación mediada por diversos mecanismos, entre los que cabe destacar: la acción directa de los fotones sobre el ADN, la generación de radicales libres del O<sub>2</sub> y la producción de mediadores inflamatorios como la histamina, prostaglandinas (PGD<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub>) y leucotrienos.

En la búsqueda de agentes fotoprotectores, *P. leucotomos* ha exhibido una interesante actividad antioxidante, antiinflamatoria y de protección a la luz UV, a través de un mecanismo de acción que implica la interacción con los radicales libres de O<sub>2</sub>. Los resultados obtenidos representan un hallazgo significativo para su potencial uso clínico en el tratamiento de quemaduras solares y reacciones fototóxicas (González & Pathak, 1996).

Por otra parte, para el control de quemaduras solares, el fotoenvejecimiento y los cánceres de piel por sobreexposición a elevadas dosis de radiaciones ultravioletas, se han recomendado una serie de medidas preventivas. Entre éstas, se encuentra la fotoprotección con agentes tópicos (cremas) que contengan filtro solar.

González *et al.* (1997) realizan un nuevo ensayo de fotoprotección, en el que se administra el extracto de *P. leucotomos* por vía tópica y oral a 21 pacientes, midiéndose una serie de parámetros dermatológicos como son: el grado de pigmentación inmediato y las dosis de eritema mínima, melanogénica mínima y fototóxica mínima antes y después del tratamiento. Las conclusiones de este estudio señalan que *P. leucotomos* despliega un significativo efecto fotoprotector. Aún más, las células de Langerhans de la piel de los pacientes tratados se conservan mejor, como revelan los análisis inmunohistoquímicos.

La actividad fotoprotectora de *P. leucotomos* señala una nueva vía de investigación para la consolidación de los tratamientos fototerapéuticos o fotoquimioterapéuticos, los cuales presentan el factor limitante de la fototoxicidad cutánea a las radiaciones ultravioletas (UVA y UVB) (González *et al.*, 1997).

#### L. Actividad frente a la esclerosis múltiple

Es la enfermedad autoinmune (tipo IV) más común del Sistema Nervioso. De causa desconocida, se caracteriza por la presencia de múltiples lesiones inflamatorias (perivenulares y de las vainas de mielina) en la sustancia blanca del SNC, lo que determina pérdida acusada de la mielina que rodea los axones. La esclerosis múltiple se puede asentar en cualquier localización del encéfalo y médula espinal.

El tratamiento con el extracto de *P. leucotomos*, utilizado en un ensayo de terapia frente a la patología autoinmune, ha demostrado ser eficaz para corregir las alteraciones del fenotipo inmunológico más frecuente en dicha enfermedad, -aumento de linfocitos T inductores de linfocitos B y disminución de linfocitos T supresores-, coincidiendo, al mismo tiempo, con una estabilización clínica de los pacientes (Carreño y De Castro, 1994).

### 2.10.2. CTP

CTP es el extracto de una planta iberoamericana de la familia Compositae. El origen, especie vegetal, extracción y definición están sometidas a patente (ASAC *Pharmaceutical International* A.I.E.), por lo que no se puede disponer de los datos técnicos. En numeración romana aparece la revisión de actividades terapéuticas referidas en un informe confidencial elaborado por ASAC *Pharmaceutical International*, A.I.E.

Acciones terapéuticas:

En cuanto a su actividad biológica se ha descrito:

A. Actividad antiprotozoósica: En las experiencias de cribado antiprotozoósico de cinco extractos vegetales, usados popularmente en la medicina tradicional de Guatemala, un extracto análogo a CTP (aCTP) parece tener cierta actividad inhibitoria sobre el crecimiento de tripomastigotes de *Trypanosoma cruzi* (ASAC I, 1999); siendo muy probablemente lactonas y sesquiterpenos quienes contribuyan de manera decisiva a su actividad biológica.

Igualmente, otros autores (ASAC II, 1999) realizan un cribado de trece extractos vegetales frente a bacterias, hongos y *Trypanosoma cruzi* (formas epimastigotes y tripomastigotes); destacando, entre ellos, la actividad *in vitro* e *in vivo* de *Neurolaena lobata* y la actividad *in vitro* del extracto tipo CTP.

B. Actividad de hormona anti-juvenil: Del ensayo con 15 plantas en un modelo experimental de *Culex quinquefasciatus* (ASAC III, 1999), cinco extractos muestran actividad análoga a hormonas anti-juveniles de crecimiento; entre ellos, un extracto aCTP que muestra capacidad inhibitoria del crecimiento y minimiza la actividad de las hormonas juveniles del crecimiento en estados larvales de *C. quinquefasciatus*. En los adultos no se produce esterilidad, pero sí se provoca un descenso en la fertilidad, según se ha demostrado.

C. Actividad antiinflamatoria: La inhibición del edema, en modelo en rata, fue similar en tratamientos con 200 mg/Kg del extracto vegetal o 50 mg/Kg de ibuprofeno (ASAC IV, 1999). En otro modelo de cicatrización de cortes, el extracto no produce un significativo aumento de fibroblastos comparado con ibuprofeno. La contracción de la herida fue comparable en los lotes tratados con aCTP e ibuprofeno. Sin embargo, la epitelización fue muy significativa en el lote tratado con aCTP (ASAC V, 1999).

D. Actividad antiagregante: Asimismo, se ha revelado en un ensayo la actividad antiagregante de 17 extractos acuosos de plantas. La agregación de plaquetas humanas inducida por trombina (0,075 U/ml) fue inhibida por extractos acuosos de aCTP, entre otros. Una vez más, la orientación etnobotánica para la selección de principios activos de plantas tradicionales de la medicina popular guatemalteca, ha permitido tal hallazgo.

E. Acción regeneradora capilar: La planta originaria de extractos aCTP se encuentra ampliamente distribuida en India, donde la medicina tradicional la ha atribuido propiedades regeneradoras capilares ( ASAC VI, 1999). Investigadores locales (ASAC VII,1999) realizan ensayos sobre ratas albinas a las que afeitan una región del lomo. Un grupo recibe diariamente tratamiento oral con el extracto, mientras que a otro se le aplica en ungüento, observándose en ambos lotes tratados un exuberante crecimiento capilar respecto a las ratas control.

F. Capacidad cicatrizante. Aunque el descubrimiento para Occidente de la actividad cicatrizante de un extracto análogo a CTP es relativamente reciente (ASAC IX, 1999), desde la antigüedad los hindúes han utilizado drogas vegetales, muchas de ellas de especies pertenecientes a la familia Compositae, para detener las hemorragias de cortes y magulladuras, así como para potenciar la cicatrización (Sushruta *et al.*, 1968).

Otros autores (ASAC X,1999) obtienen extractos a partir de hojas frescas y ensayan un tratamiento intraperitoneal en ratas albinas con lesiones experimentalmente provocadas. Las ratas control presentan un tejido granulomatoso en expansión, mientras que en las tratadas se observa una reducción en la extensión de las lesiones.



Los efectos cicatrizantes directos, mediados por la acumulación de mucopolisacáridos, indican que el extracto es, probablemente, más activo en la primera fase de la cicatrización. En estudios con otras plantas, se ha comprobado, que el incremento en los niveles de hidroxiprolina estimula la síntesis de colágeno y se ve además favorecido su grado de entrecruzamiento (ASAC XI, 1999). Estos descubrimientos se relacionan con el aumento en la síntesis de ácidos nucleicos y de proteínas, en particular de lisiloxidasas (ASAC XII, 1999), en la primera semana de cicatrización.

El mismo equipo (ASAC XIII, 1999) realiza ensayos midiendo parámetros como la resistencia a la extensión, la actividad lisiloxidasa y síntesis de proteínas y ácidos nucleicos en ratas albinas. La lisiloxidasa incrementa el entrecruzamiento del colágeno y, por tanto, la resistencia a la extensión, siendo además responsable de la unión y maduración de dicha proteína estructural vinculada a la cicatrización. La resistencia a la extensión que produce un extracto tipo CTP puede deberse a las propiedades mecánicas del colágeno (ASAC XIII, 1999). Otro principio activo que contiene la planta originaria es el ácido fumárico que podría ser parcialmente responsable de la acción cicatrizante. En los procesos de extracción, el ácido fumárico se encuentra en la fase acuosa, lo que explica las bajas propiedades cicatrizantes de las fracciones no acuosas.

G. Acción hepatoprotectora: Un grupo de investigadores administran  $\text{CCl}_4$  como sustancia hepatotóxica a ratas albinas, junto con el tratamiento intraperitoneal de un extracto aCTP, comprobando que se produce un descenso en las lesiones hepáticas (ASAC XIV, 1999). Otros autores (ASAC XV, 1999) obtienen unos resultados de idéntica naturaleza, revelando mediante análisis histopatológicos, un aumento en los procesos de regeneración. Nuevos ensayos demuestran, además, la baja toxicidad del extracto (ASAC XVI, 1999).

H. Actividad antimicrobiana. También se ha estudiado la actividad antibacteriana de la planta. El efecto del extracto acuoso a dos pesos diferentes, 30 y 40 mg, se probaron frente a 3 bacterias Gram + y 7 Gram - mediante el método de difusión en disco de papel de filtro. La máxima inhibición se observa con CTP frente a *Aeromonas hydrophila* y *Bacillus cereus* (ASAC. XVII, 1999).



# **MATERIAL Y MÉTODOS**



### 3.- MATERIAL Y MÉTODOS

#### 3.1. MATERIAL

##### 3.1.1. MATERIAL DE LABORATORIO

En este apartado se recogen los aparatos y útiles más comunes que nos han facilitado nuestra labor y sin cuyo concurso nada hubiera resultado igual.

##### A.- Aparatos.

- Campana de flujo laminar (Telstar, S.A.).
- Microscopio óptico (Olympus BH-2).
- Incubador de CO<sub>2</sub> al 5% y 37 °C (Heraeus Instruments, S.A.).
- Autoclave (Clino-Matic, Selecta, S.A.).
- Congelador progresivo (Nicoool LM100, Winterthur S.A.).
- Balanza de precisión (Mettler AE 100).
- Micropipetas automáticas desde 2 hasta 5000 µl.
- Otros (pHmetro, destilador de agua, centrífuga de mesa,...).

##### B.- Material de disección.

- Tijeras, pinzas de punta fina y curva, agujas enmangadas.
- Soporte de corcho para disección y alfileres.

##### C.- Material de plástico.

- Jeringuillas de insulina de 1 ml.
- Tubos de centrifuga de 50 ml (COSTAR, S.A.).
- Crioviales (Biofreeze® vials, COSTAR, S.A.).
- Filtros de esterilización (COSTAR, S.A.).
- Membranas de esterilización 0,22 µm (Millipore, S.A.).

##### D.- Material de vidrio.

- Tubos de ensayo con tapón de rosca (16 x 100 mm).
- Hemocitómetro de Neubauer.
- Frascos de cultivo y otros (pipetas Pasteur, vasos de precipitado,...).

### 3.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO

#### 3.1.2.1. *Trichomonas vaginalis*.

El cribado farmacológico *in vitro* se realiza con la cepa JH31A #4, -nº de referencia 30326 y lote SF-2006-, solicitada a la *American Type Culture Collection* (ATCC) y cuyo aislamiento se produjo en el *Johns Hopkins Hospital* de Baltimore (U.S.A) en 1963. Esta cepa de *T. vaginalis* procede del lavado endocervical de una paciente y se caracteriza por ser muy sensible a metronidazol.

La cepa C1-NIH Diamond L. S. (1965), -nº de referencia 30001 y lote SF-2761-, fue seleccionada y especialmente solicitada a la ATCC para el estudio de patogenicidad en ensayos intraperitoneales en ratón. Su aislamiento se produjo en 1956 (Burch *et al.*, 1958), fruto de un trabajo epidemiológico en el Servicio de Salud Pública dependiente del Instituto Nacional de la Salud norteamericano (N.I.H.) en Bethesda, Maryland (U.S.A.).

La publicación de las pruebas biológicas (Reardon *et al.*, 1961) mostrando la capacidad patogénica del aislamiento nos motivó para incorporarla en nuestro diseño experimental. La validación del modelo de Toyos requería una cepa de parásito muy virulenta, de actividad contrastable y en buenas condiciones de mantenimiento.

Un estudio epidemiológico sobre la prevalencia de la tricomonosis en la Comunidad de Madrid realizado por el Departamento de Parasitología (Facultad de Farmacia, U.C.M.), con la colaboración de los Centros de Promoción de la Salud dependientes del Ayuntamiento de la capital, ha permitido la obtención de 18 aislamientos identificados con el número de referencia de la historia clínica de la paciente (Rodríguez Gallego, 1996).

Así, en la consulta ginecológica del distrito Centro, se obtuvieron 10 aislamientos: 3059, 8232, 3569, 7894, S/H, 11, 3558, 15, 17 y 14. En Villaverde, 3 aislamientos: 1232, 18 y 7. En Tetuán, 2 aislamientos: 1807, 1800. Y por fin, un aislamiento en cada uno de los consultorios de los distritos de Carabanchel (13), Vicálvaro (208) y Retiro (1540).

La conservación se realiza por congelación en N<sub>2</sub> líquido a -170 °C (Yaeger, 1988). El protocolo de congelación requiere la siguiente pauta experimental:

- 1°.- Concentración de *T. vaginalis* por centrifugación a 2000 r.p.m.(350g) (5').
- 2°.- Lavado del concentrado con P.B.S. (Phosphate Buffered Saline) (x 3).
- 3°.- Dilución al 50% en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO), agente criopreservante, al 10% en P.B.S.
- 4°.- Reparto en crioviales (Biofreeze® vials, COSTAR, S.A.) de congelación.
- 5°.- Congelación gradual 1 °C/min. hasta alcanzar -70 °C en el congelador progresivo.
- 6°.- Introducción en los tanques de N<sub>2</sub> líquido.

La recuperación de las cepas congeladas se produce mediante la extracción del vial del N<sub>2</sub> líquido, para su inmersión en un baño de agua a 37 °C. Una vez descongelado, se vierte el contenido en un tubo con medio Diamond suplementado con suero y antibióticos.

La técnica de congelación de cepas es fundamental para evitar la pérdida de virulencia de *T. vaginalis* en un cultivo prolongado. Además del gasto inútil de tiempo y material que suponen los cultivos mantenidos por pases sucesivos cuando no se va a realizar ninguna experiencia. Por último, la frecuente transferencia de cultivos aumenta la probabilidad de la contaminación por manipulación.

#### 3.1.2.2. Animal de experimentación: El ratón (*Mus musculus*, L.).

El estudio de la susceptibilidad del hospedador (murino) a la inoculación intraperitoneal de *T. vaginalis* (Toyos, 1974), nos ha llevado a emplear dos cepas no consanguíneas: CD-1 y NMRI. Además de dos cepas consanguíneas: BALB/c y C57BL/10, de características genéticas muy diferentes entre sí.

El perfil biológico de las cepas de ratón se recoge de forma detallada en la obra *The Mouse in Biomedical Research* (Foster, H. L. ed.) Academic Press. New York, 1981. La

descripción de las peculiaridades de cada una de ellas excede nuestra competencia, por lo que se remite a la revisión antedicha para cualquier aclaración sobre el particular.

Los ratones CD-1 y NMRI son criados y mantenidos en el animalario del Dpto. de Parasitología (Facultad de Farmacia, U.C.M.), en condiciones controladas de temperatura, humedad, fotoperiodo, atmósfera, alimentación, jaula y cama. Los ratones BALB/c y C57BL/10 fueron comprados a CRIFFA, S.A. (Barcelona), en las condiciones óptimas para la realización de los ensayos. La adaptación de los animales adquiridos a nuestras instalaciones no ha planteado dificultades. Se han empleado hembras adultas, de 20-25 gramos (g) de peso (excepto los ensayos realizados en la estirpe C57BL/10, que se realizaron en machos de 25 g, según la disponibilidad de los criadores).

Los animales de elección para la mayoría de las investigaciones biomédicas son ratones preferiblemente consanguíneos (Staats *et al.*, 1981), que son el producto de veinte o más generaciones consecutivas de cruzamiento entre hermanos. Mientras que el objetivo del cruzamiento aleatorio es preservar la variabilidad genética, el de las cepas consanguíneas es reducirla a cero. El único factor limitante es establecer las relaciones de cría entre hermanos. La primera cepa de estas características fue desarrollada por C. C. Little en 1909.

Dichos ratones exhiben un alto grado de uniformidad en cuanto a su naturaleza física y aspectos fisiológicos. Esta característica hace de ellos los animales de elección en una amplia gama de trabajos, entre los cuales destacan los que pretenden minimizar los efectos de los tratamientos experimentales, y los basados en la precisión de la medida de tales efectos (Green, 1981).

De otra parte, la uniformidad de características que adquieren, permite usar un bajo número de animales, con mayor precisión en los resultados. No obstante, los ratones de una cepa consanguínea no son absolutamente idénticos. Ello puede deberse a cierta heterocigosis residual, superior a la cantidad esperada, debido a causas genéticas, tales como mutaciones recientes no fijadas por consanguinidad o la selección de los más aptos.



Por último, con independencia de que uno de los objetivos primordiales de nuestro trabajo fuese el perfeccionamiento de un modelo experimental de patogenia en ratón, sólo se ha utilizado el número de animales requerido a tal efecto, según un diseño racional de las experiencias. Siendo manipulados con la debida corrección por parte de los investigadores según las normas de Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP).

### 3.1.3. MEDIO DE CULTIVO

#### Medio Diamond

El medio de cultivo Diamond es el más eficaz para el mantenimiento *in vitro* de *T. vaginalis* (Gelbart *et al.*, 1989). La composición modificada (Miyata, 1973), es la empleada en nuestro laboratorio para la realización de resiembras cada 48 horas.

#### Composición:

- Tripticasa	(Becton Dickinson)	.....	2,00 g
- Extracto de levadura	(Becton Dickinson)	.....	1,00 g
- Maltosa	(Difco Laboratories)	.....	0,50 g
- Ác. L(+)-ascórbico	(Carlo Erba)	.....	0,02 g
- L(-)-cisteína	(Carlo Erba)	.....	0,10 g
- Agua destilada c.s.p.		.....	100 ml

#### Preparación:

- 1°.- Los componentes se disuelven en agua destilada en las proporciones indicadas, calentando sin llegar a ebullición.
- 2°.- Se ajusta el pH a 6,5 utilizando HCl 1N.
- 3°.- Se distribuye en tubos de vidrio en cantidades de 4,5 ml/tubo.
- 4°.- Se esteriliza en autoclave a 120 °C durante 20 minutos.
- 5°.- Se conserva en nevera a 4 °C hasta su uso.
- 6°.- Extemporáneamente, se añade a cada tubo 0,5 ml de suero inactivado estéril y 0,1 ml de una solución antibiótica, antes de cada resiembra.

Habitualmente se utiliza suero equino estéril (Kibbutz Laboratories), que se inactiva en un baño de agua a 56 °C durante 30 minutos. Este suero se fracciona y se mantiene congelado a -20 °C hasta su empleo. La descongelación del suero se produce en un baño de agua a 56 °C durante 10 minutos.

La solución antibiótica tiene por objeto evitar una hipotética contaminación bacteriana. El volumen añadido contiene:

- 500 U.I. de Penicilina G sódica/ ml de medio (Penilevel Lab. Level, S.A.).
- 500 µg de Estreptomina / ml de medio (C.E.P.A., S.A.).

Ocasionalmente se ha adicionado 500 µg de gentamicina/ml de medio (Genticina iny. Antibióticos, S.A.). En caso de contaminación por *Candida*, se aplica Nistatina (Mycostatin susp., Squibb) como antifúngico, añadiéndose una gota por tubo. Se recomienda realizar pases alternativos con y sin fármaco que eviten el efecto nocivo por tratamientos prolongados al parásito.

### 3.1.4. PRODUCTOS ENSAYADOS

#### 3.1.4.1. Extractos vegetales

Según el programa del proyecto marco IBEROEKA 003, se han realizado ensayos de cribado farmacológico *in vitro* frente a *Trichomonas vaginalis* y *Trypanosoma cruzi* de diferentes extractos de plantas iberoamericanas seleccionadas por criterios etnobotánicos y cedidos amablemente por ASAC Pharmaceutical International A.I.E. (Alicante, España).

En la segunda fase de esta investigación, dirigida al estudio de los inmunomoduladores, la elucidación de la actividad biológica de los extractos PAL y CTP ha sido nuestro objetivo prioritario.

La empresa proveedora nos ha suministrado datos adicionales: en cuanto a PAL

(extracto de *Polypodium leucotomos*), los polipodios se seleccionan y recolectan en las Plantaciones Experimentales y de Recuperación Ecológica de Guatemala, propiedad de ASAC P.I., situadas a 2000 m de altitud sobre el nivel del mar. El examen de las especies para su identificación fue llevado a cabo por el equipo del Dr. Aguilar Cumes (Jefe del Jardín Botánico de la Universidad San Carlos de Guatemala) y por el Dpto. de Botánica de la Universidad del Noreste en Corrientes (Argentina).

Los rizomas son separados y deshidratados por aire caliente a 60 °C durante 48 horas, reduciéndose a polvo esta parte de la planta. El extracto acuoso se obtiene por maceración del material (500 g peso seco) sumergido en agua purificada (5 L) durante 48 horas a temperatura ambiente. El extracto resultante es filtrado y eliminado el solvente por destilación a baja presión. Finalmente, PAL se liofiliza para su uso en los ensayos experimentales.

A continuación, los procesos de fraccionamiento de los extractos vegetales se inician con la disolución del extracto seco en una cantidad mínima de agua purificada con 4 volúmenes de metanol para obtener dos fracciones: A (fracción metanólica insoluble) y B (fracción metanólica soluble) que fue separada por filtración; ambas son desecadas bajo presión reducida. La fracción B se disuelve de nuevo en agua purificada y se extrae con cinco volúmenes de n-butanol. Ambas fases orgánica y acuosa se secan bajo presión reducida para obtener dos nuevas fracciones: C (fracción butanólica) y D (fracción acuosa).

De otra parte, nos remitimos al apartado correspondiente de la Revisión Bibliográfica para el extracto CTP. Su origen, especie vegetal, extracción y definición no pueden concretarse, en este momento, por ser datos confidenciales en proceso de patente (propiedad de A.S.A.C. P.I.). No obstante, se puede apuntar que un subextracto de la fracción C presenta la actividad biológica más interesante.

Todos los extractos liofilizados se reciben envasados en viales estériles (50 mg) e identificados con un código de tres letras que determina la familia, género y especie de la planta de procedencia.

Los extractos vegetales ensayados en las pruebas de cribado farmacológico antiprotozoósico frente a *T. vaginalis* son:

APB	MCT	MCO	PPN	ART	MMT
CBT	PAL	SCP	GG	CGV	
CMC	CTP	CBC	ZCL-3	ECG	
LCO	CNL	AXC	CTD	CSM	
SCP-A	CMC-A	APB-A	ECG-A		
SCP-B	CMC-B	APB-B	ECG-B		
SCP-C	CMC-C	APB-C	ECG-C		
SCP-D	CMC-D	APB-D	ECG-D		

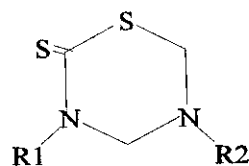
#### 3.1.4.2. Productos de síntesis

En el Instituto de Química Médica (C.S.I.C.) y bajo la dirección de la Dra. Ochoa de Ocáriz se ha realizado la síntesis de varias series de compuestos con potencial actividad antiprotozoósica. Nuestro de equipo de investigación en el Dpto. de Parasitología (Facultad de Farmacia, U.C.M.) se ha encargado de la realización del cribado farmacológico frente a *Trichomonas vaginalis* y *Trypanosoma cruzi* tanto *in vitro* como *in vivo*. Los productos se dividen en varias series según su estructura básica:

- Serie de derivados de Tetrahydro-2h-1,3,5-tiadiazin-2-tiona-3,5-disustituidos.
- Serie CP:Tieno(2,1)benzotiazepinas S,S-dióxidos y dibenzo(c,f)tiazepinas S,S-dióxidos.
- Serie de aminas acomplejadas con  $\text{Cu}^{2+}$ .

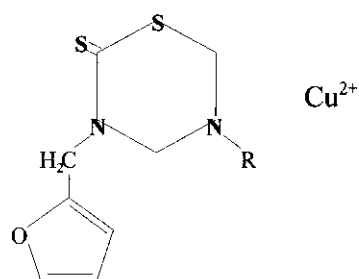
Sus estructuras se esquematizan en las tablas 3.1., 3.2. y 3.3., que aparecen en las siguientes páginas.

**FIGURA 3.1.** Estructura molecular de los compuestos:  
serie Tetrahidro-2h-1,3,5-tiadiazin-2-tiona-3,5-disustituidos



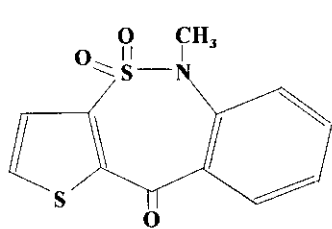
COMPUESTO	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>
1a	FURFURILO	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH
DL-1b	FURFURILO	CH(CH <sub>2</sub> COOH)-COOH
1c	FURFURILO	CH <sub>2</sub> -COOH
L-1d	FURFURILO	CH(CH <sub>2</sub> Ph)-COOH
DL-1d	FURFURILO	CH(CH <sub>2</sub> Ph)-COOH
L-1e	FURFURILO	CH[CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-COOH
DL-1f	FURFURILO	CH[(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH]-COOH
L-1g	FURFURILO	CH(CH <sub>3</sub> )-COOH
1h	FURFURILO	CH <sub>2</sub> -CONH-CH <sub>2</sub> -COOH
L-1i	FURFURILO	CH[(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> SCH <sub>3</sub> ]-COOH
D-1j	FURFURILO	CH(CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> )-COOH
L-1j	FURFURILO	CH(CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> )-COOH
1k	FURFURILO	C[(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-COOH
1m	FURFURILO	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
L-1n	FURFURILO	CH[CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-COOH
2a	CICLOHEXILO	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH
DL-2b	CICLOHEXILO	CH(CH <sub>2</sub> COOH)-COOH
2c	CICLOHEXILO	CH <sub>2</sub> -COOH
L-2d	CICLOHEXILO	CH(CH <sub>2</sub> Ph)-COOH
DL-2d	CICLOHEXILO	CH(CH <sub>2</sub> Ph)-COOH
L-2e	CICLOHEXILO	CH[CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-COOH
DL-2f	CICLOHEXILO	CH[(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> COOH]-COOH
L-2g	CICLOHEXILO	CH(CH <sub>3</sub> )-COOH
2h	CICLOHEXILO	CH <sub>2</sub> -CONH-CH <sub>2</sub> -COOH
L-2j	CICLOHEXILO	CH(CH <sub>2</sub> CONH <sub>2</sub> )-COOH
2m	CICLOHEXILO	CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -COOH
L-2n	CICLOHEXILO	CH[CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-COOH
3a	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH
3c	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH	CH <sub>2</sub> -COOH
L-3e	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH	CH[CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-COOH
3h	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH	CH <sub>2</sub> -CONH-CH <sub>2</sub> -COOH
L-3n	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH	CH[CH <sub>2</sub> -CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ]-COOH
4a	(CH <sub>2</sub> ) <sub>2</sub> -COOH	(CH <sub>2</sub> ) <sub>5</sub> -COOH

**TABLA 3.2.** Estructura molecular de los compuestos de la serie de aminas acomplejas con  $\text{Cu}^{2+}$ .

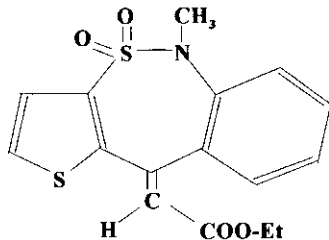


COMPUESTO	R
2AIB	$\text{C}[(\text{CH}_3)_2]-\text{COOH}$ (ácido 2-aminoisobutírico)
6-ACA	$(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$ (ácido 6-aminocaproico)
D-ASPA	$\text{CH}(\text{CH}_2\text{CONH}_2)-\text{COOH}$ (D-asparagina)
L-FA	$\text{CH}(\text{CH}_2\text{Ph})-\text{COOH}$ (L-β-fenilalanina)
Glic	$\text{CH}_2-\text{COOH}$ (glicina)
L-Alán	$\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH}$ (L-alanina)

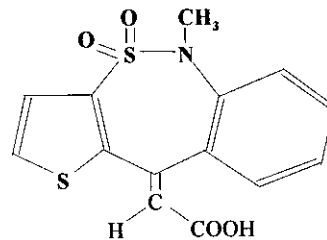
**TABLA 3.3.** Estructura molecular de los compuestos: Serie CP (Tieno(2,1)benzotiazepinas S,S-dióxidos y dibenzo(c,f)tiazepinas S,S-dióxidos).



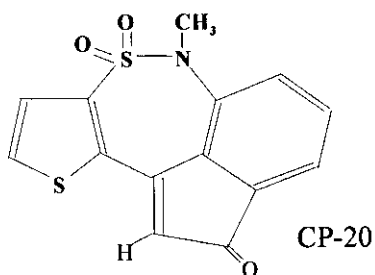
CP-1



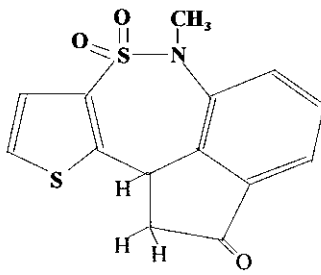
CP-6



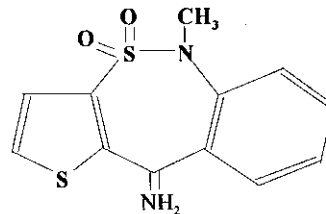
CP-18



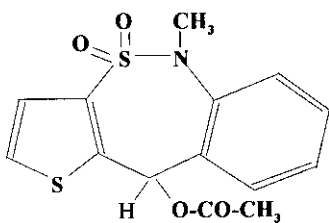
CP-20



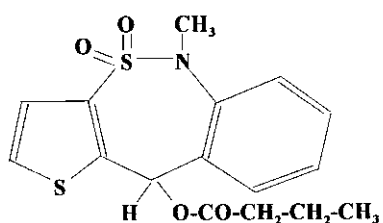
CP-47



CP-39

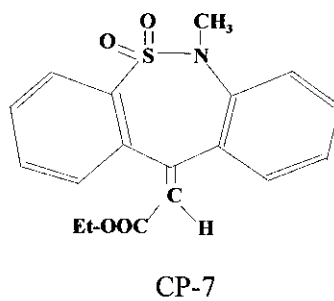
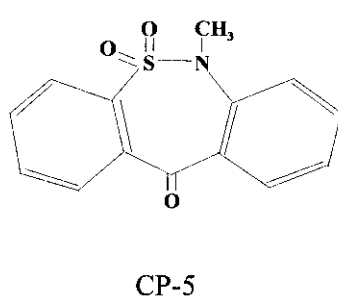
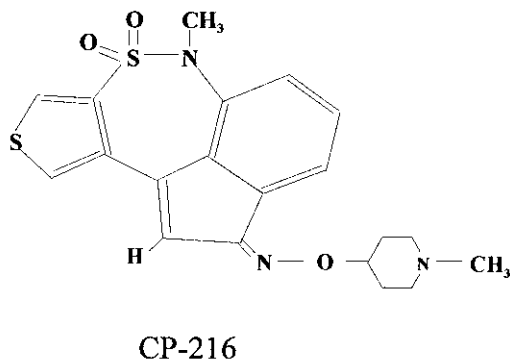
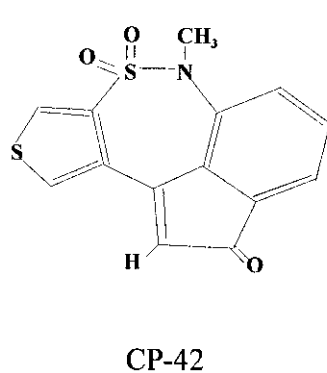
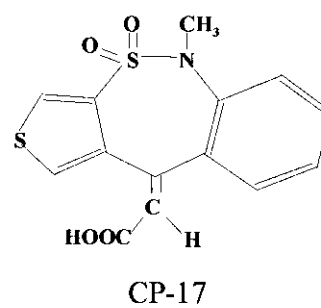
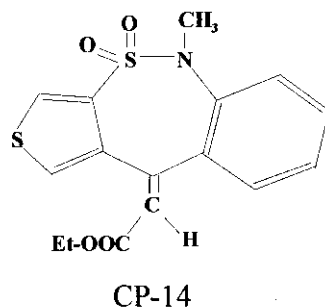
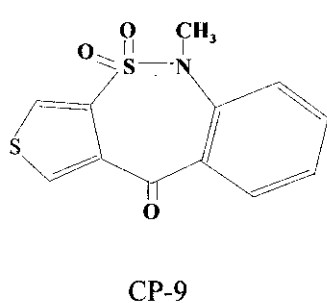


CP-237



CP-169

**TABLA 3.3.** Estructura molecular de los compuestos: Serie CP (Tieno(2,1)benzotiazepinas S,S-dióxidos y dibenzo(c,f)tiazepinas S,S-dióxidos) (II).





### 3.1.4.3. Farmacología experimental

Los productos farmacéuticos ensayados en el modelo experimental de *T. vaginalis* han sido adquiridos en su forma específica. Los fármacos empleados en las pruebas de inmunomodulación han sido:

- Inmunomoduladores: - Inmunoférón® (glicofosfopeptical) de Andrómaco S.A..  
 - TP-1® (timoestimulina) cedida generosamente por Serono, S.L.
- Inmunosupresores: - Imurel® (azatioprina) de Gayoso Wellcome S.A..  
 - Prograf® (tacrolimo o FK-506) de Fujisawa S.A..  
 - Genoxal® (ciclofosfamida) de Asta Médica S.A.
- AINEs: - Feldene® Flas® (piroxicam) de Pfizer S.A..  
 - Nolotil® (metamizol) de Europharma S.A.
- Hepatoprotector: - S.Amet® (sulfoadenosilmetionina) de Europharma S.A.

### 3.1.5. REACTIVOS Y SOLUCIONES GENERALES

Los reactivos más usuales de apoyo a la labor de rutina con la cepa de *T. vaginalis*, (mantenimiento, congelación, preparación de medios de cultivos,...), son los siguientes:

- Cloruro sódico (Panreac).
- Hidróxido sódico (Panreac).
- Ácido clorhídrico (Panreac).
- Etanol.
- Dimetilsulfóxido (Merck).

#### 1. P.B.S. (Phosphate Buffered Saline)

- |   |                                 |
|---|---------------------------------|
| - NaCl ... .. 8,00 g                            | H <sub>2</sub> O ... .. 1000 cc |
| - HK <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ... .. 1,21 g |                                 |
| - H <sub>2</sub> KPO <sub>4</sub> ... .. 0,34 g | pH : 7,3                        |

2. Azul Tripan (colorante vital)

- Azul Tripan 0,4% ... .10 ml                      H<sub>2</sub>O... .. . 90 ml

3.1.6. REACTIVOS DE ELISA.

1. PBS-Tween 20 (0,05%)

-Añadir 2,5 ml de Tween 20 a 5 litros de tampón PBS (x 1).

2. Tampón carbonato 0,1M

Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ..... 3,2 g  
NaHCO<sub>3</sub> ..... 5,9 g  
Agua destilada c.s.p. .... 1000 ml

Ajustar a pH 9,6 y guardar refrigerado a 4°C.

3. Citrato 0,1 M

Ácido cítrico ..... 21 g  
Agua destilada c.s.p. .... 1000 ml

4. Fosfato 0,2 M

Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O ..... 35,6 g  
Agua destilada c.s.p. .... 1000 ml

5. Tampón citrato-fosfato

Citrato 0,1 M .....	100 ml
Fosfato 0,2 M .....	100 ml
Agua destilada c.s.p. ....	400 ml

Ajustar a pH 5,0 y mantener refrigerado a 4°C.

6. Sustrato revelador

Orto-fenilendiamina (OPD) (SIGMA N°P-1526) ....	0,004 g
Tampón citrato-fosfato .....	10 ml

Justo antes de su utilización añadir 4  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por cada 10 ml de solución. Esta solución se debe preparar fresca cada vez que se requiera, en un tubo protegido de la luz.

7. Solución de frenado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3N)

SO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> 98% .....	80 ml
Agua destilada c.s.p. ....	500 ml

8. Conjugado para ELISA

Inmunoglobulinas de cabra anti-IgG+M, IgG, IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>3</sub> de ratón marcadas con peroxidasa (CALTAG Laboratories).

## 3.2. MÉTODOS

### 3.2.1. CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VITRO*

#### 1. Procedimiento

Los ensayos de cribado farmacológico *in vitro* frente a *T. vaginalis* se realizan mediante el recuento microscópico de cultivos axénicos tras 24-48 horas de contacto con el producto a ensayar, respecto a un control no tratado. Se determina la actividad citostática o citocida sobre el cultivo en fase exponencial de crecimiento.

Para la obtención de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento se resiembran, aproximadamente, 5 ml de inóculo de *T. vaginalis* en un botella de 100 ml de medio Diamond suplementado con 10% de suero equino donante y 2% de antibióticos durante 48 horas.

Al cabo de este tiempo, se procede a la siembra controlada en tubos de vidrio de 100.000 *T. vaginalis*/ml (2ml/tubo). Para ello, el cultivo en fase exponencial se concentra por sucesivas centrifugaciones a 2000 r.p.m. (350 g) durante 5 minutos y se ajusta el inóculo, según el requerimiento experimental, mediante el hemocitómetro de Neubauer. Finalmente, el cultivo se reparte en los tubos de vidrio (siembra controlada).

Los tubos se incuban en estufa de 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Al cabo de 5-6 horas, en el inicio de la fase exponencial, se dispensan los productos de síntesis (o extractos vegetales) en las concentraciones adecuadas al diseño de la prueba y se realiza el recuento de los controles.

Los recuentos tras 24-48 h de incubación de la totalidad de los tubos permiten establecer los parámetros para la expresión de los resultados: I.C. (índice de crecimiento), %C (porcentaje de crecimiento), %R (porcentaje de reducción).

2. Expresión de resultados: Los resultados se expresan, en función de los recuentos, bajo tres parámetros, a saber:

**a. Índice de crecimiento (I.C.)**

$I.C. = (N^{\circ} \text{ de parásitos a 24 h} / N^{\circ} \text{ de parásitos al inicio});$

**b.1. Porcentaje de crecimiento (%C)**

Si  $I.C. \geq 1 \Rightarrow \%C = (I.C._{\text{fármaco}} / I.C._{\text{control}}) \times 100;$  o bien,

**b.2. Porcentaje de actividad citostática (%AC)**

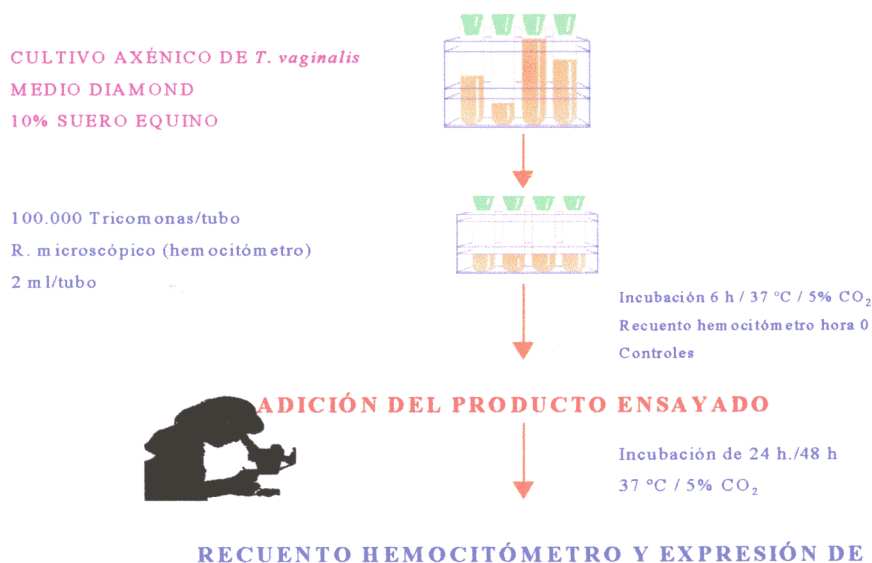
Si  $I.C. \geq 1 \Rightarrow \%AC = 100 - \%C$

El porcentaje de crecimiento es una expresión de la actividad citostática de los productos de síntesis o naturales ensayados frente a *T. vaginalis*.

**c. Porcentaje de reducción (%R)**

Si  $I.C. < 1 \Rightarrow \%R = 100 - (I.C._{\text{fármaco}} / I.C._{\text{control}}) \times 100;$

El porcentaje de reducción es una expresión de la actividad citocida de los productos de síntesis o naturales ensayados frente a *T. vaginalis*.



**FIGURA 3.4.** Metodología del cribado farmacológico *in vitro* frente a *T. vaginalis*

### 3. Preparación de los productos naturales o de síntesis ensayados

Los productos de síntesis se disuelven, salvo indicación en contra, en dimetilsulfóxido puro (DMSO) con lo se facilita su solubilidad y esterilidad. Las diluciones posteriores se realizan en PBS estéril. Generalmente, se preparan tres disoluciones 100, 10 y 1  $\mu\text{g/ml}$  si se trata de un producto de síntesis. Nótese que las concentraciones ensayadas para el fármaco de referencia Flagyl® (metronidazol) son 2, 1 y 0,5  $\mu\text{g/ml}$ . Por su parte, los extractos naturales se ensayan a mayores concentraciones, 1000, 500 y 100  $\mu\text{g/ml}$ , convencidos de que la presencia de los principios activos se ve enmascarada por otros no activos.

### 3.2.2. MODELO MURINO DE INFECCIÓN INTRAPERITONEAL

El modelo murino de infección intraperitoneal fue inicialmente diseñado (Toyos, 1974) para estudios de patogenia experimental, puesto que la inoculación del parásito induce el desarrollo de lesiones en los órganos abdominales, que son valorables mediante necropsia. Desde su experiencia se ha pretendido que nuestra aportación mejore ciertos aspectos de dicho modelo.

El protocolo de trabajo para el desarrollo de la infección experimental comprende:

#### 3.2.2.1. Preparación del inóculo

A partir de un cultivo axénico del protozoo de 48 horas en tubos de vidrio, se realiza la resiembra en frascos de cultivo de 100 ml de medio Diamond con suero equino estéril y antibiótico en las proporciones convenientes. Al cabo de 48 horas se procede a la concentración del cultivo por centrifugaciones sucesivas a 2000 r.p.m. (350g) durante cinco minutos; no es aconsejable prolongar más cada concentración, pues muchos organismos pierden vitalidad e incluso mueren.

Una vez finalizada la concentración, se realiza el recuento de parásitos a través de la cámara de Neubauer con el apoyo de un colorante vital como Azul Tripán 0,4% y se ajusta el correspondiente inóculo, habiéndose ensayado  $10^6$ ,  $5 \times 10^6$  y  $10^7$  tricomonas/ratón.

#### 3.2.2.2. Pauta de inoculación

Para cada una de las pruebas se han empleado lotes de 10 ratones de las cepas no consanguíneas (CD-1, NMRI) y consanguíneas (BALB/c, C57BL/10), de 20-25 g de peso.

La inoculación intraperitoneal se realiza en el cuadrante inferior derecho de la pared abdominal del ratón. El volumen inyectado es de 0,8 ml de la suspensión preparada.

Todos los animales son inoculados en el lomo por vía subcutánea con 0,2 ml de una mezcla de penicilina y estreptomina en una dosis de 150.000 U.I./ Kg y 20 mg /Kg de peso respectivamente (1633 U.I. de penicilina pesa 1mg). Una vez inoculados los ratones, se inicia un periodo de observación, coincidente con la evolución de la infección producida, hasta la necropsia y valoración de las lesiones.

### 3.2.2.3. Necropsia y valoración de las lesiones

Los animales son sacrificados al decimoquinto y trigésimo día post-inoculación (p.i.) por dislocación cervical. Realizándose la necropsia a continuación. Si alguno muriese en el transcurso de la prueba será sometido a examen de inmediato. La cuantificación de las lesiones permite la aplicación de tratamientos estadísticos a los resultados. El índice de patogenia puede ser expresado en un tanto por cien, dado el criterio de valoración de las lesiones. El máximo valor se le daría, según el diseño de Toyos (1974), a una cepa que produjera la muerte de todos los ratones al tercer día p.i. con el parásito en el líquido ascítico y con la máxima puntuación de las lesiones. Para la valoración de lesiones se han tenido en cuenta los datos siguientes (tabla 3.4.a):



**TABLA 3.1.a.** Valoración de las lesiones y la mortalidad en el modelo de *T. vaginalis***I.- MORTALIDAD DURANTE LA EXPERIENCIA**

- Ratones muertos al 3<sup>er</sup> día p.i . . . . . 50 puntos
- Ratones muertos al 4<sup>o</sup> día p.i. . . . . 44 puntos
- Ratones muertos al 5<sup>o</sup> día p.i. . . . . 38 puntos
- Por cada día de retraso 6 puntos menos.
- Ratones muertos después del día 10<sup>o</sup> p.i. . . . . 6 puntos

**II.- LÍQUIDO ASCÍTICO**

- Menos de 1ml . . . . . 2 puntos
- De 1 a 2 ml . . . . . 4 puntos
- Más de 2ml . . . . . 6 puntos

**III.- PERITONEO Y GRASA PÉLVICA**

- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 . . . . . 2 puntos
- Necrosis puntiforme múltiple y/o necrosis  
única de 3 a 5 mm de diámetro . . . . . 4 puntos
- Necrosis múltiples de 3 a 5 mm y/o necrosis  
única de 5 a 10 mm de diámetro . . . . . 6 puntos
- Necrosis extendida por toda la pelvis . . . . . 8 puntos
- Necrosis diseminada en cavidad abdominal  
afectando el meso intestino y zona perirrenal . . . . . 10 puntos

TABLA 3.1.b. Valoración de mortalidad y lesiones en el modelo de *T. vaginalis*(cont.)**IV.- BAZO, PÁNCREAS, ESTÓMAGO**

- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o  
esplenomegalia . . . . . 2 puntos
- Necrosis puntiforme múltiple y/o necrosis  
única de 3 a 5 mm de diámetro . . . . . 4 puntos
- Necrosis única de 5 a 8 mm . . . . . 6 puntos
- Necrosis de 8 a 10 mm afectando a más de un órgano . . . 8 puntos
- Necrosis de 10 de 15 mm englobando a más de un órgano. 10 puntos
- Necrosis mayores de 15 mm que ocupan  
más de un órgano e interesando también  
a hígado y asas intestinales . . . . . 12 puntos

**V.- HÍGADO (CARA VISCERAL)**

- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o  
fina capa superficial de fibrina sobre el lóbulo  
de Spigelio . . . . . 2 puntos
- Necrosis de 3 a 5 mm y/o necrosis parcial  
del lóbulo de Spigelio o de los lóbulos ventrales  
derecho o izquierdo . . . . . 4 puntos
- Necrosis de 5 a 8 mm y/o necrosis total del  
lóbulo de Spigelio o necrosis equivalente  
en los lóbulos ventrales dcho. o izq . . . . . 6 puntos
- Necrosis de 8 a 10 mm . . . . . 8 puntos
- Necrosis afectando a la mayor parte de la superficie . . . . 10 puntos

TABLA 3.4.c. Valoración de mortalidad y lesiones en el modelo de *T. vaginalis*(cont.)

VI.- HÍGADO (CARA DIAFRAGMÁTICA).	
- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 o fina fina capa superficial de fibrina y/o alteraciones en la coloración del órgano .....	2 puntos
- Necrosis de 3 a 5 mm y/o grandes alteraciones de color .....	4 puntos
- Necrosis de 5 a 8 mm y/o necrosis parcial de los lóbulos diafragmáticos izq. o dcho .....	6 puntos
- Necrosis de 8 a 10 mm y/o necrosis parcial de los lóbulos y/o intensa de un lóbulo .....	8 puntos
- Necrosis intensa afectando a varios lóbulos .....	10 puntos
- Necrosis extendida a todos los lóbulos e interesando al diafragma .....	12 puntos

Tomado de Escario, J. A. . Tesis doctoral. 1985. La tabla de valoración de lesiones del modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* de Toyos (1974) fue modificada por Escario (1985). Permitiendo la representación del índice de patogenia en porcentajes.

Según el baremo establecido se obtiene un valor numérico para cada ratón. El índice de patogenia de cada cepa se calcula hallando la media de las puntuaciones del lote. En el trabajo original de Toyos, se propone que las cifras queden representadas sobre el esquema de un ratón, en el que cada órgano reciba la valoración correspondiente, según la intensidad de la lesión.

El modelo murino de infección intraperitoneal con *T. vaginalis*, modificado del esquema de Toyos (1974), de quien se recoge el método de valoración de la necropsia, se pretende analizar y optimizar bajo un estudio crítico de las experiencias propuestas.

En la figura 3.5. se esquematiza el procedimiento de trabajo en el ensayo de patogenia; debe reconocerse la brevedad y elegancia del diseño experimental frente a otras posibles alternativas, en cuanto a la vía y procedimiento.

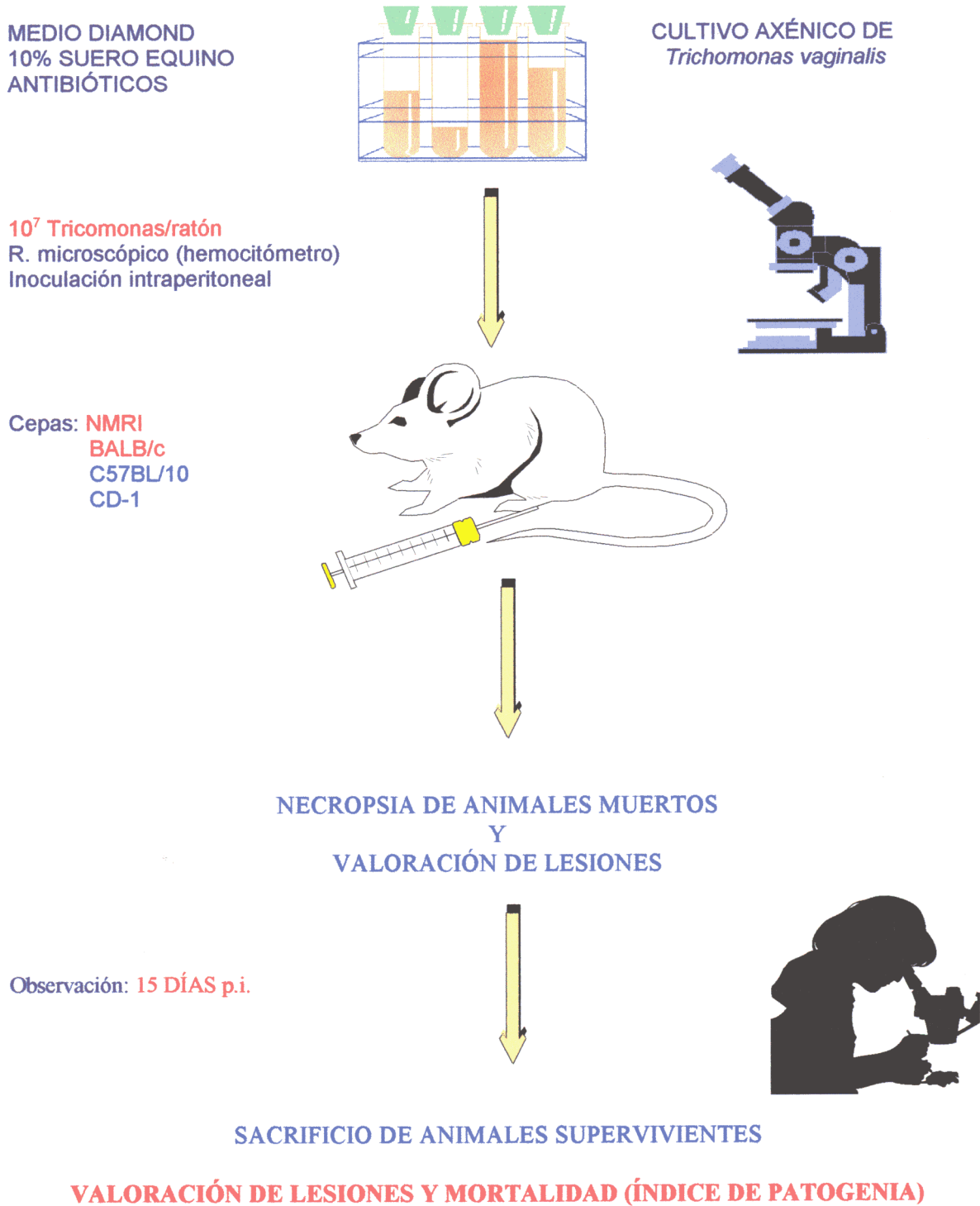


FIGURA 3.5. Metodología del ensayo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

### 3.2.3. CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VIVO*

El modelo murino de patogenia de *T. vaginalis* ha sido aplicado al cribado farmacológico *in vivo*. Fundamentalmente, sobre el diseño experimental se establece una pauta adecuada de tratamiento, suficiente para que se produzca la curación con el producto de referencia (metronidazol) tras la infección parasitaria.

El protocolo establecido empíricamente se puede esquematizar como sigue:

Día 0: Inoculación intraperitoneal de *Trichomonas vaginalis*.

Días 3°, 4°, 5°, 6° y 10°, 11°, 12° p.i.: Tratamiento farmacológico.

Día 15° p.i.: Necropsia de los animales supervivientes.

La administración por vía oral de metronidazol (0,75 mg/ratón/día) en 0,3 ml de carboximetilcelulosa cura las lesiones producidas por la infección intraperitoneal de *T. vaginalis*. No obstante, la concentración habitualmente ensayada para los productos de síntesis es de 3 mg/ratón/día.

Los productos de síntesis que en el cribado farmacológico *in vitro* manifiestan una notable actividad antiprotozoósica, preferentemente citocida, son ensayados en el modelo de cribado farmacológico *in vivo*. Esta estrategia, por razones deontológicas y económicas, permite obviar los ensayos *in vivo* de productos que carecen de actividad *in vitro*.

### 3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA PATOGENIA DE AISLAMIENTOS AUTÓCTONOS

Las 18 cepas aisladas en los Centros de Promoción de la Salud de Madrid (1994-96) de los distritos Centro (3059, 8232, 3569, 7894, S/H, 11, 3558, 15, 17 y 14), Villaverde (1232, 18 y 7), Tetuán (1807, 1800), Carabanchel (13), Vicálvaro (208) y Retiro (1540), fueron axenizadas mediante tratamientos antifúngicos a través del tubo de Carneri modificado.

Para la evaluación de la patogenia experimental de los aislamientos se ha utilizado la

cepa de ratón NMRI que, además de ser una de las más susceptibles a la infección por *T. vaginalis*, es la más asequible a nuestro laboratorio por su relativamente bajo coste económico y la ausencia de requerimientos especiales en su mantenimiento.

En cuanto al protocolo del ensayo de patogenicidad de aislamientos clínicos, se han mantenido las condiciones del modelo previamente establecido, esto es, un inóculo de  $10^7$  tricomonas/ratón y un periodo de observación de 15 días previo al sacrificio de los supervivientes.

En cuanto a la necropsia, para la valoración de las lesiones y la mortalidad nos hemos remitido al baremo diseñado para el modelo experimental de patogenicidad (tabla 3.4). Los datos de los 18 aislamientos nos han permitido validar mediante procedimientos estadísticos (Análisis de Componentes Principales y Discriminante) dicho baremo diseñado subjetivamente.

### 3.2.5. APLICACIÓN DEL MODELO EXPERIMENTAL DE *T. VAGINALIS* PARA LA ELUCIDACIÓN DE LA POTENCIAL ACTIVIDAD INMUNOMODULADORA DE LOS EXTRACTOS PAL Y CTP

La integración del modelo de patogenicidad experimental en el marco del proyecto CYTED-D: IBEROEKA 003 (Cribado y aislamiento de principios farmacológicamente activos de plantas iberoamericanas) nos ha permitido profundizar en el conocimiento de los mecanismos patogénicos de *T. vaginalis* y de la actividad inmunomoduladora de los extractos vegetales seleccionados por criterios etnobotánicos.

En principio, la aplicación del modelo de patogenicidad a la inmunomodulación, no ha supuesto la introducción de cambios sustanciales en el ensayo previamente diseñado. No obstante, las primeras experiencias de inmunomodulación fueron encaminadas al establecimiento de la dosis y pauta de tratamiento más adecuada para determinar el efecto de los extractos vegetales sobre la regulación del sistema inmune.

A tal efecto, se han ensayado tres dosis de 4, 20 y 40 mg/Kg/día. Una vez establecida la dosis intermedia, se han ensayado tres pautas, la primera y más eficaz, durante los 10 días previos a la infección y las otras dos, con inferior resultado, de 5 días postinfección en la primera y segunda semana de observación.

En cuanto a la cepa de ratón, se ha mantenido la NMRI para las experiencias que únicamente requerían necropsia, y se ha dispuesto de BALB/c en las pruebas en que además se ha recogido suero para los ensayos inmunoenzimáticos de inmunoglobulinas y citocinas.

Finalmente, el sacrificio de los ratones supervivientes se realizó el 15° día p.i. y en la necropsia se ha utilizado la tabla de valoración de las lesiones y la mortalidad aplicada en el modelo de patogenia y cribado farmacológico *in vivo*.

Del conjunto de extractos vegetales solamente se han ensayado dos con potencial actividad inmunomoduladora: PAL y CTP; aunque en la validación del método se han introducido inmunoestimulantes, inmunosupresores, antiinflamatorios no esteroideos y agentes adyuvantes. Las dosis y pautas de tratamiento empleadas en cada uno de los fármacos corresponden a las indicadas en la bibliografía.

### 3.2.6. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

Se han utilizado métodos inmunoenzimáticos para la determinación de anticuerpos y de citocinas. En el primer caso se ha puesto a punto y realizado la técnica en el laboratorio, mientras que en los ensayos de citocinas se han utilizado los *kits* comerciales de ENDOGEN, Inc. para la determinación de IFN- $\gamma$  e IL-4.

#### 3.2.6.1. Infección experimental y obtención de sueros

Los ratones BALB/c son infectados con  $10^7$  tricomonas/ratón y sangrados semanalmente del plexo venoso retro-orbital con pipeta Pasteur (técnica de Nöller).

Una vez formado el coágulo, la sangre se microcentrifuga a 9000 r.p.m. (2000g) durante 10 minutos (microcentrífuga MIKRO 12-24 Hettich Zentrifugen). Posteriormente, se recoge el suero, se fracciona y congela a - 20°C.

### 3.2.6.2. Preparación del antígeno

Los cultivos de *T. vaginalis* en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 2000 r.p.m. (350g), resuspendiendo el precipitado en un tampón Tris-HCl 1N, pH 6,0; posteriormente, se somete la suspensión a procesos de congelación y descongelación sucesivos en N<sub>2</sub> líquido, o bien, alternativamente, se sonica mediante pulsos de 10 segundos la muestra en un sonicador VIRTIS (VIRSONIC), manteniendo los tubos eppendorf en un baño de hielo.

A continuación, se delipida con 3 ml de n-hexano y 7 ml de la suspensión, mediante agitación energética y decantación de la fase superior. La fase acuosa se recoge y se centrifuga a 13.000 r.p.m. durante 30 minutos a 4 °C. El sobrenadante corresponde al antígeno total (García Palacios, 1997). Tras dializar durante 24 horas frente a PBS, con membranas de diálisis (Medicel), se valora la concentración de proteínas por el método Bradford, se fracciona en alícuotas y se congela a - 20 °C.

### 3.2.6.3. Determinación de anticuerpos: Ig G + Ig M, Ig G, Ig G<sub>1</sub>, Ig G<sub>2a</sub>, Ig G<sub>2b</sub> y Ig G<sub>3</sub>.

Se tapizan las placas de microtitulación de 96 pocillos (Nunc-Immuno Plate Maxisorp®), con 100 µl de antígeno total por pocillo (concentración: 1 µg/ml) en tampón carbonato 0,1 M a pH 9,6. Tras incubación toda la noche a 4 °C, se lavan por triplicado los pocillos con tampón PBS-Tween 20.

Para evitar la adhesión inespecífica de los anticuerpos a la placa, se procede al post-tapizado de la misma con 300 µl/pocillo de BSA al 0,1% diluida en PBS y se incuba durante una hora a 37 °C, al cabo de ese tiempo, se lava la placa tres veces con PBS-Tween 20.



Tras el post-tapizado, la placa está dispuesta para el ensayo inmunoenzimático, inicialmente se añaden 100 µl/pocillo de suero problema a una dilución adecuada (1/50, 1/100, 1/200) en PBS-Tween 20, BSA 0,1% y por duplicado. El periodo de incubación subsiguiente es de 2 horas a 37 °C y de nuevo al finalizar ese plazo, la placa se lava tres veces con PBS-Tween 20.

A continuación, añadimos 100 µl de anti-inmunoglobulina de ratón marcada con peroxidasa a una dilución de 1/2000 (IgG e IgG+M) o 1/1500 (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>3</sub>) y se incuba una hora a 37 °C. Tras lavar tres veces con PBS-Tween 20 se añaden 100 µl de sustrato cromogénico (40 mg OPD + 100 ml Tampón citrato-fosfato + 40 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). La incubación se realiza a temperatura ambiente y protegiendo la placa de la exposición directa a la luz. Una vez que se inicia la reacción coloreada, cuando la diferencia de color entre el control positivo y negativo es máxima y, antes de que los pocillos sin suero empiecen a adquirir color, se añaden 50 µl por pocillo de la solución de frenado (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 3N).

Finalmente, se procede a la lectura de la placa de 96 pocillos en un lector de ELISA (ELK 800 BIO-TEK INSTRUMENTS, INC.) a 492 nm.

#### 3.2.6.4. Determinación de citocinas: IFN-γ e IL-4.

La determinación de IFN-γ e IL-4 en las experiencias de inmunomodulación se ha realizado bajo la supervisión del Dr. D. Fernando Setién en el CAI de Inmunología de la Facultad de Medicina (Universidad Complutense de Madrid).

En cuanto al procedimiento, se han seguido las especificaciones del manual de instrucciones del *kit* comercial de ENDOGEN Inc., que se resumen a continuación:

1. Adición de **50 µl** del anticuerpo biotinilado.
2. Adición de **50 µl** de los estándares o muestras en duplicado.
3. Incubación de la placa **cubierta** a temperatura ambiente durante **2 horas** a una temperatura entre **20 y 25 °C**.
4. Lavado de placas (**x 3**).
5. Diluir la estreptavidina-HRP concentrada en un tampón de dilución y añadir **100 µl** de la solución a cada pocillo.
6. Incubación de la placa cubierta a temperatura ambiente durante **30 minutos**.
7. Lavado de las placas (**x 3**).
8. Añadir **100 µl** de la solución de sustrato premezclada **TMB** a cada pocillo.
9. Revelado de la placa a temperatura ambiente (**20-25 °C**) en la **oscuridad** durante **30 minutos**.
10. Finalización de la reacción por adición de **100 µl** de la solución de frenado.
11. Lectura de absorbancia de la placa **450-550 nm**.
12. Cálculo de los resultados. Por interpolación en la recta de regresión generada por los estándares, o bien , mediante el cálculo sobre la recta de regresión.

Se recomienda, asimismo, guardar una serie de precauciones para la correcta ejecución del ensayo de determinación de citocinas:

A. Preparación de muestras: Las muestras pueden proceder de suero, plasma o sobrenadante de cultivo. No siendo conveniente realizar diluciones de no sospechar una concentración elevada de citocinas. El volumen de muestra requerido son 50 µl.

B. Preparación de reactivos:

B.1. Tampón de lavado: Se añade el contenido completo del tampón de lavado 30x y se diluye hasta un volumen final de 1,5 litros con H<sub>2</sub>O destilada o desionizada.

B.2. Solución de estreptavidina-HRP: Prepárese la solución estreptavidina-HRP no más de 15 minutos antes de usar. No preparar más que la requerida.

Usar tubos de plástico de 15 ml para preparar la solución de estreptavidina-HRP. La solución debe ser centrifugada brevemente.

Usar solamente la cantidad requerida para el número de filas a ensayar. Añada 30  $\mu$ l de estreptavidina-HRP concentrada a 12 ml del tampón de dilución de estreptavidina-HRP. En caso de no emplear toda la placa, usar 2,5  $\mu$ l de estreptavidina-HRP concentrada y 1 ml de tampón de dilución por cada fila.

C. Estándares: Usar una hora después de su reconstitución. Si utilizas muestras de suero o plasma reconstituir el estándar con H<sub>2</sub>O destilada. Reconstitución del estándar en el vial etiquetado: 4000 pg/ml el estándar será disuelto durante un minuto. Realizar una dilución seriada 1/4; 1000 pg/ml, 250 pg/ml, 62,5 pg/ml, 15,6 pg/ml.

### 3.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados derivados de las pruebas *in vivo* precisan de un tratamiento estadístico que permita comprobar la significación de las observaciones realizadas.

La amplia gama de factores que inciden en un modelo experimental intraperitoneal repercuten, de manera evidente, en los datos obtenidos. Fundamentalmente, según Kulda (1990), la severidad de la infección depende de la respuesta individual del animal hospedador (ratón), que refleja la virulencia inherente de la cepa inoculada (tricomonas). Esto puede explicar la variabilidad de los índices de patogenia individuales, en lotes de ratones de idéntico sexo y edad, pero cuyos niveles de respuesta inmunológica no son idénticos.

El tratamiento estadístico aplicado en las experiencias realizadas no es paramétrico debido a las exigentes condiciones que se deben cumplir:

1.- Independencia muestral. Obtenida por la asignación aleatoria de los sujetos del experimento, así como de las variables. Requiere, a su vez, que el tamaño muestral sea suficientemente grande ( $n \geq 30$ ).

2.- Normalidad de la distribución. Los valores muestrales siguen una función de distribución normal.

3.- Homogeneidad de las varianzas. Calculada mediante el estadístico  $F_{\max}$ , que se define mediante un cociente de las estimaciones de las varianzas mayor y menor de los grupos. Si el valor obtenido es menor que el valor tabulado, nada se opone a aceptar la hipótesis de la homogeneidad de las varianzas.

En la práctica no siempre se pueden cumplir todos los requisitos de las pruebas y hemos de acudir a una serie de procedimientos en la estadística no paramétrica o de libre distribución que no exigen que la distribución poblacional tenga una determinada forma específica, ni que sus parámetros cumplan ciertas condiciones requeridas a las pruebas paramétricas. Se aconseja acudir a las pruebas no paramétricas cuando:

- a.- Se desconoce la distribución de la variable o se duda del supuesto de normalidad.
- b.- La información de la variable viene dada en una escala ordinal o nominal
- c.- El número de individuos muestrales es pequeño.

De entre los posibles test no paramétricos se han utilizado:

- La prueba U de Mann-Whitney.

Puede considerarse como la prueba no paramétrica más potente, para probar si dos muestras independientes se han tomado de la misma población y más en concreto, si existen diferencias significativas entre la tendencia central de las poblaciones de origen.

Tras el cálculo estadístico de la U, análogo al realizado en la  $t$  de Student en las pruebas paramétricas, dicho resultado se compara con el valor crítico de la  $U_{n_1, n_2}$  teórico, siendo  $n_1$  y  $n_2$  los tamaños muestrales de los grupos que se comparan.

Si  $U_{\text{calculada}} > U_{\text{teórica}}$  entonces nada se opone en aceptar la hipótesis nula. Por el contrario, si la  $U_{\text{calculada}} \leq U_{\text{teórica}}$  entonces se rechaza la hipótesis nula, para el nivel de significación previamente seleccionado.

- El análisis de la varianza no paramétrica o prueba  $H'$  de Kruskal-Wallis.

El estadístico prueba la hipótesis de que  $K \geq 2$  distribuciones de población de forma no especificada son exactamente iguales. Para comprobar el contraste  $H'$  se ha referido a la tabla de  $\chi^2$ , a la que se entra con el riesgo  $\alpha$  que hayamos prefijado y  $K-1$  grados de libertad, siendo  $K$  el número de grupos que intervienen en la investigación. Si  $H' \leq \chi^2_{\alpha, k-1}$ , se acepta la hipótesis nula (las muestras pertenecen a poblaciones idénticas). Si  $H' > \chi^2_{\alpha, k-1}$ , se rechazará la hipótesis nula.

Para el estudio de los parámetros que componen el índice de patogenia se optó por técnicas multidimensionales, ya que éstas son las que mejor responden a nuestros objetivos:

1. Conocer las relación existente entre las variables (parámetros);
2. Analizar la dispersión de las observaciones (poniendo en evidencia posibles agrupamientos), para detectar las variables responsables de dicha dispersión, y
3. Determinar si se trata de grupos diferenciados, y, en tal caso, determinar la variable, o conjunto de variables, que mejor discriminen entre dichos grupos.

Siguiendo a Judez (1989) como método de análisis factorial se empleó el análisis de componentes principales y el análisis de discriminantes para la identificación y clasificación de los posibles grupos detectados.

El objetivo del análisis de componentes principales es transformar una matriz de datos (conjunto de observaciones con valores para una serie de variables estadísticas) para caracterizar las observaciones mediante un pequeño número de variables no correlacionadas entre sí, que facilite el análisis de la estructura de la matriz de datos.

Dicho de una manera más precisa, el análisis de componentes principales pretende:

- Facilitar el estudio de las relaciones existentes entre las variables.
- Facilitar el análisis de la dispersión de las observaciones (poniendo en evidencia posibles agrupamientos), detectando las variables que son responsables de dicha dispersión.

En cuanto al análisis discriminante, los objetivos se pueden dividir en dos grupos:

1. Objetivos descriptivos. Tales objetivos se persiguen cuando se desea una representación del conjunto de las observaciones que permita verificar si se está realmente en presencia de grupos bien diferenciados, o bien, se pretende encontrar la variable o conjunto de variables que mejor discriminan a los grupos preestablecidos de observaciones.

2. Objetivos decisionales. Cuando se trata de reclasificar ciertas observaciones de un conjunto inicial (en función de un conjunto de variables), o bien, cuando se tiene por finalidad clasificar nuevas observaciones (observaciones que no estaban presentes en el conjunto inicial) en uno de los grupos existentes.

Finalmente, se ha establecido el criterio de Chauvenet para el rechazo de valores atípicos. Se rechaza la observación en una muestra de tamaño  $n$  si su desviación de la media es mayor que la que corresponde a una probabilidad de  $1/2n$ . La aplicación reiterada de dicho criterio puede conducir fácilmente al rechazo sucesivo de las observaciones extremas, procedimiento que nunca debe ponerse en práctica.

La decisión de rechazar una observación debe basarse en la experiencia y no sin antes realizar cuidadosas consideraciones previas. Es importante percatarse de que al rechazar una observación, quizá se está dejando de lado información sumamente importante que podría llevarnos a descubrir un factor que hasta ese momento no se había considerado.

No obstante, la complejidad que supone un modelo experimental *in vivo* implica que los resultados estén sometidos a cierta variabilidad. El investigador debe reconocer la procedencia

de dicha variabilidad para sacar las conclusiones adecuadas. Un error de tipo técnico, la falta de homogeneidad de los componentes..., pueden ser la fuente de la variabilidad y generar interpretaciones distorsionadas de los datos obtenidos.

El tamaño muestral es suficientemente elevado como para determinar la tendencia de la población ( $n=10$ ). El índice de patogenia de la cepa es el resultado de la media de los índices de patogenia individuales de cada ratón del lote; los valores que cumplen el criterio de Chauvenet son excluidos, ya que se apartan de forma muy notable de la media global.

Por ejemplo, en la prueba sobre el índice de patogenia de *T. vaginalis* en la cepa de ratón BALB/c, según el modelo de Toyos modificado, con un tiempo de observación de 30 días, los valores obtenidos son: 0,0; 0,0; 36,0; 42,0; 42,0; 40,0; 50,0; 46,0; 38,0 y 38,0. El criterio de Chauvenet señala con valores atípicos ambos ceros. Parece obvio, que estos ratones no se han infectado por la circunstancia que fuere y en modo alguno se debe considerar su valor al establecer el índice de patogenia global.

Los métodos de cálculo aplicados se recogen en el libro *Fundamentos de Estadística* de Carlos M. Cuadras *et al.* (Promociones Publicaciones Universitarias. ed.) Barcelona, 1984, a excepción de los análisis de componentes principales y discriminante que pertenecen a *Técnicas de análisis de datos multidimensionales* de Lucinio Judez (Ministerio de Agricultura Pesca y Alimentación ed.) Madrid, 1989.

Los resultados de las experiencias han sido sometidos a la aplicación informática de cálculo SPSS/PC+ Release 6.1.3. de windows<sup>TM</sup> para IBM de Marija J. Norusis (1986). De gran utilidad por su simplificada interfase y gran potencia de cálculo que permite tanto tests paramétricos como no paramétricos.





# **EXPERIENCIAS Y RESULTADOS**



## 4.- EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

### 4.1. CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VITRO*

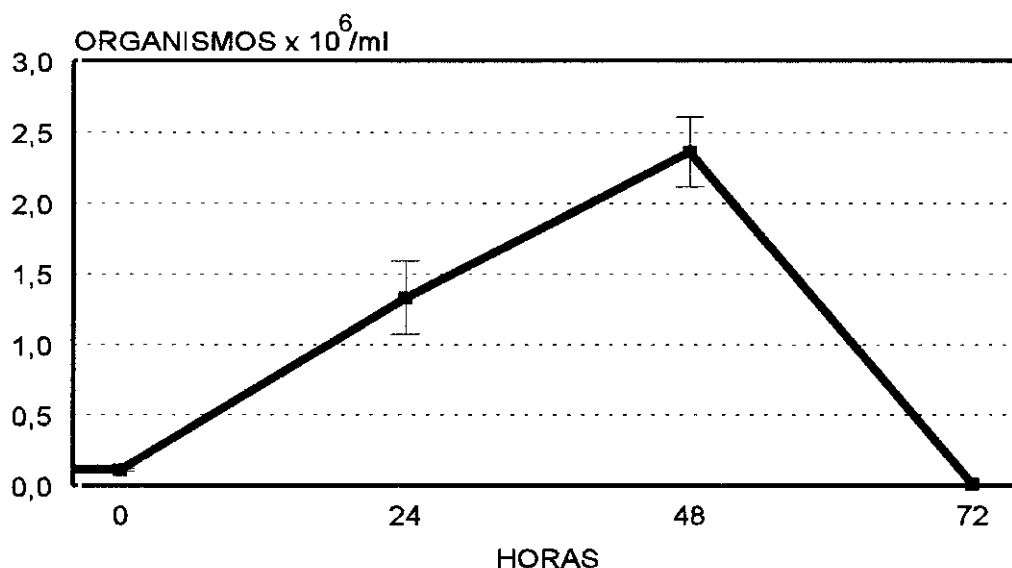
#### 4.1.1. Dinámica de crecimiento de *Trichomonas vaginalis* en cultivo

Previamente al cribado farmacológico *in vitro* frente a *T. vaginalis*, se han realizado curvas de crecimiento del parásito en las condiciones del ensayo, para ello se parte de un inóculo inicial de 100.000 organismos/ml sembrados en medio Diamond suplementado con suero equino donante (10%) y antibióticos (2%). Posteriormente, este cultivo en masa se reparte en tubos de vidrio con tapón de rosca, a razón de 2 ml/tubo, y se incuba en una estufa a 37 °C (5% CO<sub>2</sub>).

Al cabo de 5-6 horas, se realiza el recuento de la hora 0 (fase inicial del crecimiento exponencial) mediante un hemocitómetro de Neubauer y cada 24 horas hasta completar el ciclo vital, realizándose los recuentos en presencia de Azul Tripán 0,4% a 0, 24, 48 y 72 horas. En los ensayos se ha dispuesto de 6 tubos por recuento, representando la media y desviación estándar (D.E.) de 6 experiencias independientes.

**TABLA 4.1.** Dinámica de crecimiento de *T. vaginalis* en medio Diamond.

tiempo	N° DE ORGANISMOS/ml			
	0 horas	24 horas	48 horas	72 horas
EXP. 1	100.800	1.754.000	2.158.000	-
EXP. 2	125.300	1.458.400	2.690.000	0,000
EXP. 3	113.200	1.129.000	2.487.500	0,000
EXP. 4	103.700	1.225.000	2.479.000	0,000
EXP. 5	102.500	1.041.600	2.004.100	-
EXP. 6	125.300	1.391.000	2.375.000	-
<b>MEDIA</b>	<b>110.150</b>	<b>1.333.167</b>	<b>2.365.600</b>	<b>0,000</b>
<b>± D.E.</b>	<b>± 9.528</b>	<b>± 258.659</b>	<b>± 247.719</b>	<b>± 0,000</b>



**GRÁFICA 4.1.** Dinámica de crecimiento *Trichomonas vaginalis*

#### 4.1.2. Cribado farmacológico *in vitro* de productos de síntesis.

En el modelo de cribado farmacológico *in vitro* frente a *T. vaginalis*, de forma sintética se puede decir que los protozoos son cultivados a 37 °C (5% CO<sub>2</sub>) en medio Diamond modificado y suplementado con suero equino (10 %) y antibióticos (2%). El cultivo en masa obtenido se resiembró en tubos de ensayo a razón de 2 ml con 100.000 organismos/ml. Transcurridas 6 horas (en el inicio de la fase exponencial de crecimiento) se adicionan los compuestos disueltos en DMSO, en las concentraciones previstas 100, 10 y 1 µg/ml. Los recuentos se efectúan a las 24 y 48 horas de contacto con el producto de síntesis mediante el hemocitómetro de Neubauer y los resultados se expresan a través de un índice de crecimiento (IC<sub>PROD</sub>), y porcentajes de reducción (%R) y de actividad citostática (%AC), según las expresiones matemáticas recogidas en el apartado 3.2.1. de Material y Métodos.

En las TABLAS 4.2. a 4.8. se muestran los resultados del cribado farmacológico de tres series de productos de síntesis con potencial actividad antiprotozoósica. Los compuestos han sido sintetizados por el equipo de la Dra. Ochoa de Ocáriz en el Instituto de Química Médica (C.S.I.C.).

Las series, cuya estructura química se recoge en el apartado 3.1.4.1 de Material y Métodos, están compuestas por:

- Serie CP de Tieno(2,1)benzo y dibenzo(c,f)tiazepinas S,S-dióxidos: 15 productos (TABLAS 4.2. / 4.3.).
- Serie aminas acomplejadas con  $\text{Cu}^{2+}$ : 9 productos (TABLAS 4.4. / 4.5.).
- Serie de tiadiazinas disustituidas: 34 productos (TABLAS 4.6. / 4.8.).

A continuación de las determinaciones de 24 y 48 horas de cada serie, se recoge un comentario acerca de la actividad tricomocida de los compuestos más sobresalientes. En las tablas se expresan los índices de crecimiento del producto a las tres concentraciones ensayadas: 100, 10, 1  $\mu\text{g/ml}$ . Y además, alternativamente, el porcentaje de reducción %R o entre paréntesis la actividad citostática (%AC), cuando no se reduce el n° de organismos con respecto a los controles, pero se inhibe el crecimiento. Como información adicional se recoge el índice de crecimiento del control ( $\text{IC}_{\text{CONTROL}}$ ) de cada ensayo, puesto que no todos los compuestos de cada serie se ensayaron simultáneamente.

**TABLA 4.2.** Cribado farmacológico de la serie CP frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

Los resultados se expresan en porcentajes de reducción (actividad citocida) o en porcentaje de inhibición del crecimiento (actividad citostática).

PRODUCTOS	24 HORAS			
	I.C. PROD	CONCENTRACIONES		
		%R (%AC)		
	100/10/1	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
CP-1	4,06/ 6,98/ 10,22	(60,16)	(31,47)	0,00
CP-5	3,92/ 7,67/ 8,23	(61,44)	(24,71)	(19,05)
CP-6	7,11/ 8,29/ 8,85	(30,22)	(18,60)	(13,08)
CP-7	4,99/ 7,23/ 8,79	(51,03)	(29,00)	(13,70)
CP-9	3,24/ 3,56/ 4,94	(45,73)	(40,37)	(17,26)
CP-14	5,86/ 5,34/ 6,22	(1,85)	(10,48)	0,00
CP-17	6,66/ 7,34/ 6,85	0,00	0,00	0,00
CP-18	7,12/ 8,16/ 7,89	0,00	0,00	0,00
CP-20	0,00/ 9,32/ 10,45	100,00	(21,09)	(11,52)
CP-39	8,67/11,96/14,62	(26,52)	0,00	0,00
CP-42	6,91/10,20/10,28	(41,50)	(13,61)	(12,88)
CP-47	1,84/ 10,29/ 8,36	(84,41)	(12,88)	(29,21)
CP-169	3,01/ 9,34/ 9,56	(69,77)	(6,24)	(4,02)
CP-216	0,00/ 3,97/ 8,90	100,00	(60,13)	(10,69)
CP-237	4,85/ 9,78/ 10,37	(51,27)	(1,91)	0,00

I.C.-CONTROL(CP-1→CP-7): 10,19.  
I.C.-CONTROL(CP-20→CP-47): 11,81.

I.C.-CONTROL(CP-9→CP-18): 5,97.  
I.C.-CONTROL(CP-169→CP-237): 9,97.

TABLA 4.3. Cribado farmacológico de la serie CP frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

48 HORAS		CONCENTRACIONES		
PRODUCTOS	I.C. PROD 100/10/1	%R (%AC)		
		100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
CP-1	1,80/ 1,32/ 0,96	0,00	0,00	5,80
CP-5	2,04/ 0,89/ 0,80	0,00	12,74	21,11
CP-6	1,35/ 1,15/ 1,12	0,00	0,00	0,00
CP-7	1,49/ 1,23/ 0,96	0,00	0,00	5,77
CP-9	3,75/ 5,63/ 4,87	(37,30)	(5,86)	(18,66)
CP-14	6,93/ 6,90/ 5,84	0,00	0,00	(2,35)
CP-17	7,65/ 5,86/ 7,49	0,00	(2,01)	0,00
CP-18	7,17/ 5,67/ 6,47	0,00	(5,19)	0,00
CP-20	0,00/ 14,70/ 18,88	100,00	(38,47)	(21,00)
CP-39	17,59/21,54/21,37	(26,37)	(9,87)	(10,55)
CP-42	14,62/19,68/21,89	(38,80)	(17,65)	(8,54)
CP-47	1,89/ 15,25/ 16,63	(92,06)	(35,13)	(30,40)
CP-169	9,12/ 18,84/ 21,78	(58,47)	(14,24)	(0,85)
CP-216	0,00/ 15,60/ 22,22	100,00	(29,00)	0,00
CP-237	5,44/ 21,34/ 23,99	(75,24)	(2,86)	0,00

I.C.CONTROL(CP-1→CP-7): 1,02.  
I.C.CONTROL(CP-20→CP-47): 23,90.

I.C.CONTROL(CP-9→CP-18): 5,98.  
I.C.CONTROL(CP-169→CP-237): 21,97.

**TABLA 4.4.** Cribado farmacológico de una serie de aminos acomplejadas con Cu<sup>2+</sup> frente a *T. vaginalis* (24 y 48 HORAS).

24 HORAS		CONCENTRACIONES		
PRODUCTOS	I.C. PROD 100/10/1	%R (%AC)		
		100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
T-2AIB	0,08/ 2,38/ 12,09	99,53	(86,95)	(33,79)
T-D-ASPA	0,00/ 3,19/ 13,12	100,00	(82,52)	(28,19)
L-ALN	0,00/ 5,58/ 16,82	100,00	(69,46)	(7,98)
L-ASPA	0,46/ 6,60/ 12,99	2,56	(63,87)	(28,89)
2-AIB	0,00/ 2,36/ 7,71	100,00	(67,32)	0,00
6-ACA	0,00/ 0,25/ 3,16	100,00	96,53	(56,24)
D-ASPA	0,00/ 0,14/ 5,88	100,00	97,96	(18,53)
λ-FA	0,00/ 2,03/ 10,08	100,00	(77,28)	0,00
GLIC	0,00/ 5,60/ 9,38	100,00	(37,39)	0,00

I.C.<sub>CONTROL</sub>(T-2AIB→L-ASPA): 18,27. I.C.<sub>CONTROL</sub>(2-AIB→D-ASPA): 7,22. I.C.<sub>CONTROL</sub>(λ-FA→Glic): 8,94.

48 HORAS		CONCENTRACIONES		
PRODUCTOS	I.C. PROD 100/10/1	%R (%AC)		
		100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
T-2AIB	0,08/ 2,38/ 12,09	99,53	(86,95)	(33,79)
T-D-ASPA	0,00/ 3,19/ 13,12	100,00	(82,52)	(28,19)
L-ALN	0,00/ 5,58/ 16,82	100,00	(69,46)	(7,98)
L-ASPA	0,46/ 6,60/ 12,99	2,56	(63,87)	(28,89)
2-AIB	0,00/ 8,24/ 16,55	100,00	(52,42)	(4,45)
6-ACA	0,00/ 0,04/ 11,55	100,00	99,72	(33,32)
D-ASPA	0,00/ 0,00/ 13,13	100,00	100,00	(24,15)
λ-FA	0,00/ 2,05/ 1,19	100,00	0,00	0,00
GLIC	0,00/ 1,03/ 9,38	100,00	(11,20)	28,87

I.C.<sub>CONTROL</sub>(T-2AIB→L-ASPA): 18,27. I.C.<sub>CONTROL</sub>(2-AIB→D-ASPA): 17,32. I.C.<sub>CONTROL</sub>(λ-FA→Glic): 1,16.



**TABLA 4.5.** Cribado farmacológico de Tetrahydro-2H-1,3,5-tiadiazin-2-tiona-3,5-disustituidos frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

PRODUCTOS	24 HORAS		CONCENTRACIONES		
	I.C. PROD	%R (%AC)			
		100/ 10/ 1	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
1a	0,00/ 4,87/ 8,87	100,00	(66,38)	(38,82)	
1b	0,00/ 7,03/ 10,58	100,00	(51,47)	(27,00)	
1c	0,00/ 5,07/ 9,48	100,00	(64,98)	(34,62)	
L-1d	0,00/ 10,06/ 11,71	100,00	(38,62)	(28,56)	
DL-1d	0,00/ 3,09/ 7,78	100,00	(68,14)	(19,70)	
L-1e	10,94/ 12,63/ 13,02	(10,47)	0,00	0,00	
DL-1f	0,00/ 8,19/ 13,09	100,00	(43,46)	(9,70)	
L-1g	0,00/ 8,21/ 11,51	100,00	(32,80)	(5,82)	
1h	0,00/ 11,04/ 15,23	100,00	(9,66)	0,00	
L-1i	0,00/ 9,91/ 11,92	100,00	(8,02)	0,00	
D-1j	0,00/ 0,08/ 13,21	100,00	99,50	(19,40)	
L-1j	0,00/ 0,68/ 12,43	100,00	95,82	(24,13)	
1k	0,08/ 2,38/ 12,09	99,53	(86,95)	(33,79)	
1m	0,00 / 0,50/ 10,08	100,00	68,15	(30,50)	
1n	0,00/ 10,98/ 18,08	100,00	(22,68)	0,00	

I.C.-CONTROL(1a,1b,1c,DL-1f): 14,50.

I.C.-CONTROL(D-1j,L-1j,L-1d): 16,39.

I.C.-CONTROL(L-1e,L-1g,1h): 12,22.

I.C.-CONTROL(1m,DL-1d): 9,70.

I.C.-CONTROL(1k/1n):18,27/14,21.

I.C.-CONTROL(L-1i): 10,78.

**TABLA 4.6.** Cribado farmacológico de Tetrahydro-2H-1,3,5-tiadiazin-2-tiona-3,5-disustituidos frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

PRODUCTOS	48 HORAS		CONCENTRACIONES		
	I.C. PROD	%R (%AC)			
		100/10/1	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
1a	0,00/1,37/1,32	100,00	0,00	0,00	
1b	0,00/1,23/1,11	100,00	0,00	0,00	
1c	0,00/1,68/1,06	100,00	0,00	(3,22)	
L-1d	0,00/1,40/2,30	100,00	(82,00)	(88,00)	
DL-1d	0,00/1,00/1,72	100,00	(51,74)	(15,45)	
L-1e	2,60/1,64/1,52	0,00	(29,27)	(34,17)	
DL-1f	0,00/1,70/0,96	100,00	0,00	(12,73)	
L-1g	0,00/4,26/1,79	100,00	0,00	(22,84)	
1h	0,00/3,66/1,69	100,00	0,00	(26,97)	
L-1i	0,00/2,64/1,49	100,00	0,00	(27,29)	
D-1j	0,00/0,03/8,98	100,00	(99,73)	(6,58)	
L-1j	0,00/3,16/9,06	100,00	(67,22)	(5,95)	
1k	0,08/2,38/12,09	99,53	(86,95)	(33,79)	
1m	0,00/0,11/0,84	100,00	93,74	59,07	
1n	0,00/1,00/ 1,75	100,00	(51,74)	(15,45)	

I.C.-CONTROL(1a,1b,1c,DL-1f): 14,50.

I.C.-CONTROL(L-1e,L-1g,1h): 12,22.

I.C.-CONTROL(1k/1n):18,27/14,21.

I.C.-CONTROL(D-1j,L-1j,L-1d): 16,39.

I.C.-CONTROL(1m,DL-1d): 9,70.

I.C.-CONTROL(L-1i): 10,78.

**TABLA 4.7.** Cribado farmacológico de Tetrahidro-2H-1,3,5-tiadiazin-2-tiona-3,5-disustituidos frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

PRODUCTOS	24 HORAS			
	I.C. PROD	CONCENTRACIONES		
		%R (%AC)		
	100/10/1	100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
2a	0,67/ 4,55/ 6,05	91,17	(40,55)	(20,36)
DL-2b	0,15/ 2,15/ 3,98	98,18	(75,45)	(54,52)
2c	0,00/ 7,04/ 9,50	100,00	(39,44)	(18,30)
L-2d	0,41/ 4,39/ 6,72	94,52	(42,17)	(11,54)
DL-2d	1,62/ 5,31/ 16,80	(81,56)	(62,57)	0,00
DL-2f	0,55/ 2,16/ 4,40	93,63	(75,28)	(49,68)
)L-2g	0,00/ 4,27/ 4,80	100,00	(51,10)	(45,06)
2h	1,59/ 3,03/ 5,20	(81,72)	(65,28)	(40,55)
L-2e	0,21/ 6,37/ 7,28	97,47	(25,75)	(8,87)
L-2j	0,00 / 1,12/ 10,08	100,00	(28,67)	0,00
2m	0,00/ 1,51/ 3,66	100,00	(82,73)	(58,19)
L-2n	1,13/ 9,00/ 10,85	(92,31)	(36,64)	(23,64)
3a	0,00/ 5,90/ 8,98	100,00	(42,98)	(21,03)
3c	0,00/ 3,72/ 4,36	100,00	(64,04)	(57,89)
3h	0,00/ 0,49/ 11,82	100,00	(11,94)	0,00
3m	0,00/ 5,55/ 11,98	100,00	(53,94)	(62,00)
L-3n	0,00/ 8,01/ 12,05	100,00	(33,54)	(5,00)
L-3e	0,00/ 0,62/ 4,08	100,00	89,53	(30,20)
4a	0,00 / 3,09/ 7,78	100,00	(68,14)	(19,77)
MTZ*	0,00/ 0,44/ 3,04	100,00	92,47	(48,00)

I.C.CONTROL(L-2d,2a): 7,60. I.C.CONTROL(1-2j): 9,70. I.C.CONTROL(2c): 11,64.  
I.C.CONTROL(2h, L-2g, DL-2f): 8,75. I.C.CONTROL(DL-2b, 2m): 8,76. I.C.CONTROL(L-2n, DL-2d): 14,21.  
I.C.CONTROL(3a, 3c): 10,36. I.C.CONTROL(3m, L-3n): 12,05. I.C.CONTROL(L-2e): 8,58.  
I.C.CONTROL(L-3e): 5,85. I.C.CONTROL(3h): 9,70. I.C.CONTROL(4a): 10,78.

\* Metronidazol, producto de referencia, ensayado a 2,0, 1,0 y 0,5 µg/ml.

**TABLA 4.8.** Cribado farmacológico de Tetrahidro-2H-1,3,5-tiadiazin-2-tiona-3,5-disustituidos frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

48 HORAS		CONCENTRACIONES		
PRODUCTOS	I.C. PROD	%R (%AC)		
		100 µg/ml	10 µg/ml	1 µg/ml
2a	0,00/ 7,55/ 9,98	100,00	(41,12)	(22,20)
DL-2b	0,00/ 1,51/ 3,66	100,00	(77,78)	(3,92)
2c	0,00/ 14,42/ 19,95	100,00	(32,77)	(7,03)
L-2d	0,00/ 5,63/ 9,49	100,00	(56,07)	(25,97)
DL-2d	0,31/ 18,22/ 18,43	98,70	(25,49)	(24,64)
DL-2f	0,00/ 11,85/ 12,41	100,00	(18,30)	(14,45)
L-2g	0,00/ 7,28/ 12,50	100,00	(49,77)	(13,86)
2h	0,94/ 9,85/ 12,65	93,50	(32,08)	(12,80)
L-2e	0,21/ 11,37/ 11,63	98,43	(17,82)	(15,97)
L-2j	0,00/ 1,38/ 1,96	100,00	(25,46)	(5,30)
2m	0,00/ 2,70/ 11,47	100,00	(77,78)	(5,89)
L-2n	0,35/ 20,42/ 25,81	98,55	(16,50)	0,00
3a	0,00/ 6,13/ 18,99	100,00	(69,17)	(4,53)
3c	0,00/ 4,99/ 12,90	100,00	(74,88)	(35,14)
3h	0,00/ 2,31/ 1,33	100,00	0,00	(35,14)
3m	0,00/ 6,93/ 18,98	100,00	(66,32)	(7,75)
L-3n	0,00/ 14,08/ 19,64	100,00	(31,58)	(4,55)
L-3e	0,00/ 2,78/ 5,14	100,00	(73,22)	(50,49)
4a	0,00/ 1,00/ 1,75	100,00	(51,74)	(15,45)
MTZ*	0,00/ 0,00/ 4,35	100,00	100,00	(25,65)

I.C.CONTROL(L-2d,2a): 7,60.

I.C.CONTROL(2h, L-2g, DL-2f): 8,75.

I.C.CONTROL(3a, 3c): 10,36.

I.C.CONTROL(L-3e): 5,85.

I.C.CONTROL(l-2j): 9,70.

I.C.CONTROL(DL-2b, 2m): 8,76.

I.C.CONTROL(3m, L-3n): 12,05.

I.C.CONTROL(3h): 9,70.

I.C.CONTROL(2c): 11,64.

I.C.CONTROL(L-2n, DL-2d): 14,21.

I.C.CONTROL(L-2e): 8,58.

I.C.CONTROL(4a): 10,78.

\*Representa metronidazol, el producto de referencia, ensayado a 1, 0,5, 0,1 µg/ml.

#### 4.1.3. Cribado farmacológico *in vitro* de productos naturales frente a *Trichomonas vaginalis*.

Nuestra integración en el marco del proyecto CYTED-D: IBEROEKA 003 (“Cribado y aislamiento de principios farmacológicamente activos de plantas iberoamericanas”) nos ha llevado a la aplicación del modelo *in vitro* frente a *Trichomonas vaginalis* al cribado farmacológico de extractos vegetales liofilizados propiedad de la empresa ASAC Pharmaceutical International.

No obstante, las concentraciones ensayadas son superiores al tratarse de extractos brutos de naturaleza vegetal, en los que se supone que los principios activos se encuentran en pequeñas proporciones, siendo seleccionado el rango 1000, 500, 100  $\mu\text{g/ml}$ . Además, los resultados se expresan en porcentaje de crecimiento (%C), en vez de en actividad citostática (%AC), en función de la potencial capacidad de los extractos para incrementar el crecimiento del cultivo respecto a los controles no tratados (moduladores del crecimiento).

Los extractos vegetales se denominan por un código de tres letras vinculado a la planta de origen, salvaguardando su identidad en virtud de las patentes farmacéuticas.

**TABLA 4.9.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	4,41	100,00	-	41,67 ± 09,30
APB (1000)	3,08	69,97	-	29,10 ± 11,54
CBT (1000)	3,26	74,06	-	30,80 ± 17,73
CMC (1000)	2,38	54,10	-	22,50 ± 04,33
CMC (500)	2,91	66,12	-	27,55 ± 03,35
CMC (100)	2,83	64,20	-	26,67 ± 05,20
LCO (1000)	3,44	78,15	-	32,50 ± 12,50
MCO (1000)	5,03	114,05	-	47,50 ± 15,00
SCP (1000)	1,67	37,99	-	15,83 ± 02,88

**TABLA 4.10.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	18,20	100,00	-	172,00 ± 31,12
APB (1000)	12,02	66,06	-	113,34 ± 16,64
CBT (1000)	5,91	32,51	-	55,83 ± 33,75
CMC (1000)	12,01	66,01	-	113,34 ± 07,21
CMC (500)	23,14	127,19	-	219,16 ± 24,28
CMC (100)	19,08	104,87	-	180,00 ± 17,32
LCO (1000)	12,99	71,37	-	122,50 ± 76,11
MCO (1000)	11,13	61,17	-	105,00 ± 28,17
SCP (1000)	8,30	45,62	-	85,00 ± 21,79

I.C.: ÍNDICE DE CRECIMIENTO.  
%C: PORCENTAJE DE CRECIMIENTO

% R: PORCENTAJE DE REDUCCIÓN  
D.E.: DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

**TABLA 4.11.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ±D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	16,87	100,00	-	22,54 ± 2,44
<b>CMC-A (1000)</b>	16,52	97,90	-	22,08 ± 2,67
<b>CMC-A (500)</b>	18,27	108,30	-	24,41 ± 3,81
<b>CMC-A (100)</b>	21,57	127,90	-	28,83 ± 1,28
<b>CMC-D (1000)</b>	21,95	130,80	-	29,33 ± 2,02
<b>CMC-D (500)</b>	20,86	123,65	-	27,87 ± 3,14
<b>CMC-D (100)</b>	20,86	123,65	-	27,87 ± 5,10

**TABLA 4.12.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	8,50	100,00	-	90,20 ± 17,40
<b>CMC-B (1000)</b>	2,06	24,25	-	21,85 ± 00,62
<b>CMC-B (500)</b>	2,88	33,88	-	30,62 ± 02,29
<b>CMC-B (100)</b>	12,00	141,17	-	147,20 ± 01,62
<b>CMC-C (1000)</b>	2,22	26,14	-	23,56 ± 01,74
<b>CMC-C (500)</b>	2,18	25,73	-	23,19 ± 03,75
<b>CMC-C (100)</b>	6,99	82,24	-	74,10 ± 10,10

**TABLA 4.13.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	11,04	100,00	-	14,75 ± 0,43
<b>CMC-A (1000)</b>	10,41	94,30	-	13,91 ± 0,62
<b>CMC-A (500)</b>	11,90	107,80	-	15,91 ± 2,87
<b>CMC-A (100)</b>	14,84	134,40	-	19,83 ± 2,80
<b>CMC-D (1000)</b>	13,66	123,70	-	18,25 ± 1,27
<b>CMC-D (500)</b>	13,84	125,40	-	18,50 ± 1,50
<b>CMC-D (100)</b>	16,74	151,70	-	22,37 ± 1,01

**TABLA 4.14.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D. E.</b>
<b>CONTROL</b>	3,46	100,00	-	36,77 ± 5,22
<b>CMC-B (1000)</b>	3,32	96,11	-	35,25 ± 1,56
<b>CMC-B (500)</b>	4,4	127,16	-	46,66 ± 0,00
<b>CMC-B (100)</b>	4,37	126,32	-	46,33 ± 8,01
<b>CMC-C (1000)</b>	1,22	35,26	-	13,00 ± 1,06
<b>CMC-C (500)</b>	1,98	57,25	-	21,00 ± 9,75
<b>CMC-C (100)</b>	4,04	116,77	-	42,83 ± 3,53



**TABLA 4.15.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	17,40	100,00	-	175,40 ± 54,80
<b>AXC (1000)</b>	17,02	97,81	-	171,60 ± 16,00
<b>AXC (500)</b>	15,03	86,37	-	151,60 ± 55,30
<b>CBC (1000)</b>	15,50	89,08	-	167,50 ± 13,90
<b>CBC (500)</b>	13,57	77,98	-	146,60 ± 26,20
<b>GG (1000)</b>	20,28	116,59	-	219,10 ± 33,90
<b>GG (500)</b>	14,12	89,14	-	152,50 ± 22,20

**TABLA 4.16.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	21,40	100,00	-	215,00 ± 13,00
<b>AXC (1000)</b>	17,16	80,18	-	173,00 ± 42,00
<b>AXC (500)</b>	23,96	111,90	-	241,60 ± 43,60
<b>CBC (1000)</b>	18,51	86,49	-	186,60 ± 07,60
<b>CBC (500)</b>	23,96	111,90	-	241,60 ± 53,70
<b>GG (1000)</b>	26,53	123,97	-	267,50 ± 48,20
<b>GG (500)</b>	37,60	175,70	-	379,10 ± 41,40

**TABLA 4.17.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	8,43	100,00	-	97,90 ± 12,90
<b>MCT (1000)</b>	10,19	120,80	-	118,30 ± 16,00
<b>MCT (500)</b>	8,11	96,20	-	94,10 ± 18,40
<b>PPN (1000)</b>	4,31	51,12	-	50,00 ± 10,60
<b>PPN (500)</b>	5,97	70,81	-	69,30 ± 02,70
<b>ZCL-3 (1000)</b>	8,47	100,40	-	98,30 ± 18,70
<b>ZCL-3 (500)</b>	7,89	93,59	-	91,60 ± 20,00

**TABLA 4.18.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	13,39	100,00	-	155,40 ± 17,50
<b>MCT (1000)</b>	17,02	127,10	-	197,50 ± 08,60
<b>MCT (500)</b>	15,03	133,00	-	206,00 ± 10,40
<b>PPN (1000)</b>	15,50	37,49	-	58,30 ± 21,20
<b>PPN (500)</b>	13,57	109,55	-	172,50 ± 52,30
<b>ZCL-3 (1000)</b>	20,28	94,32	-	146,60 ± 36,20
<b>ZCL-3 (500)</b>	14,12	122,25	-	190,00 ± 60,10

**TABLA 4.19.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	8,75	100,00	-	63,00 ± 13,75
CTD (1000)	11,67	133,37	-	84,16 ± 07,21
CTD (500)	11,67	133,37	-	84,16 ± 11,27
CTD (100)	6,93	79,2	-	50,00 ± 12,99
ART (1000)	8,67	99,09	-	62,50 ± 03,53
ART (500)	8,54	97,66	-	61,60 ± 19,09
ART (100)	6,81	77,85	-	49,10 ± 03,81
CGV (1000)	7,97	91,16	-	57,50 ± 06,60
CGV (500)	9,58	109,56	-	69,10 ± 13,70
CGV (100)	9,23	105,59	-	66,60 ± 15,20

**TABLA 4.20.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	10,57	100,00	-	76,25 ± 16,40
CTD (1000)	27,16	256,95	-	195,80 ± 33,57
CTD (500)	24,15	228,57	-	174,10 ± 54,80
CTD (100)	21,15	200,09	-	152,50 ± 05,00
ART (1000)	10,52	99,52	-	75,83 ± 03,81
ART (500)	10,75	101,72	-	77,50 ± 05,00
ART (100)	11,61	109,92	-	83,75 ± 19,44
CGV (1000)	16,47	155,86	-	118,75 ± 01,76
CGV (500)	18,2	172,26	-	131,25 ± 47,70
CGV (100)	22,41	212,10	-	161,60 ± 20,36

**TABLA 4.21.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	10,30	100,00	-	100,00 ± 26,39
ECG (1000)	11,68	113,4	-	113,30 ± 07,20
ECG (500)	10,56	102,59	-	102,50 ± 07,00
ECG (100)	9,10	88,37	-	88,30 ± 11,27
CSM (1000)	10,73	104,25	-	104,10 ± 17,01
CSM (500)	7,73	75,06	-	75,00 ± 00,00
CSM (100)	9,44	91,68	-	91,60 ± 15,87

**TABLA 4.22.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	15,41	100,00	-	149,50±38,50
ECG (1000)	13,40	86,97	-	130,00±33,60
ECG (500)	13,40	86,97	-	130,00±47,60
ECG (100)	10,56	68,57	-	102,50±16,39
CSM (1000)	9,44	61,28	-	91,60±17,00
CSM (500)	7,64	49,61	-	74,10±26,40
CSM (100)	5,23	33,98	-	50,80±13,70

**TABLA 4.23.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	9,26	100,00	-	133,76 ± 48,03
APB-A (1000)	9,47	102,16	-	136,66 ± 37,61
APB-A (500)	6,00	64,79	-	86,66 ± 22,40
APB-A (100)	7,91	85,35	-	114,16 ± 19,41
APB-B (1000)	5,48	69,19	-	79,16 ± 20,05
APB-B (500)	6,93	74,76	-	100,00 ± 12,50
APB-B (100)	7,62	82,24	-	110,00 ± 59,73
APB-C (1000)	5,08	54,82	-	73,33 ± 22,54
APB-C (500)	6,81	73,52	-	98,33 ± 18,93
APB-C (100)	7,44	80,37	-	107,50 ± 16,39

**TABLA 4.24.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	13,02	100,00	-	187,91 ± 65,18
APB-A (1000)	9,06	69,62	-	130,83 ± 05,20
APB-A (500)	11,6	89,13	-	167,50 ± 36,82
APB-A (100)	13,16	101,1	-	190,00 ± 13,91
APB-B (1000)	8,43	64,74	-	121,66 ± 33,57
APB-B (500)	9,64	74,05	-	139,16 ± 20,36
APB-B (100)	5,77	44,34	-	83,33 ± 12,33
APB-C (1000)	7,7	59,2	-	111,25 ± 30,27
APB-C (500)	7,73	59,42	-	111,66 ± 17,01
APB-C (100)	10,68	82,04	-	154,16 ± 25,16

**TABLA 4.25.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	10,16	100,00	-	104,16 ± 17,65
APB-D (1000)	9,83	96,80	-	100,83 ± 14,21
APB-D (500)	10,48	103,21	-	107,50 ± 18,87
APB-D (100)	11,22	110,41	-	115,00 ± 06,61
SCP-A (1000)	6,34	62,40	-	65,00 ± 15,61
SCP-A (500)	9,34	92,00	-	95,83 ± 25,65
SCP-A (100)	8,93	87,94	-	91,60 ± 21,26
SCP-B (1000)	9,02	88,81	-	92,50 ± 00,00
SCP-B (500)	7,96	78,40	-	81,66 ± 16,64
SCP-B (100)	7,88	77,60	-	80,83 ± 16,07

**TABLA 4.26.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	8,09	100,00	-	112,57 ± 19,19
SPC-C (1000)	10,00	123,57	-	139,10 ± 11,27
SPC-C (500)	10,36	128,10	-	144,20 ± 12,58
SPC-C (100)	7,31	90,34	-	101,70 ± 31,85
SPC-D (1000)	7,55	93,28	-	105,00 ± 11,45
SPC-D (500)	12,70	156,97	-	176,70 ± 69,83
SPC-D (100)	10,18	127,88	-	141,70 ± 22,68

**TABLA 4.27.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	19,55	100,00	-	200,40 ± 21,64
APB-D (1000)	20,97	107,20	-	215,00 ± 64,80
APB-D (500)	17,07	87,30	-	175,00 ± 55,80
APB-D (100)	15,68	80,20	-	160,80 ± 17,73
SCP-A (1000)	13,17	67,30	-	135,00 ± 49,24
SCP-A (500)	16,46	84,20	-	168,70 ± 121,90
SCP-A (100)	17,5	89,80	-	180,00 ± 10,60
SCP-B (1000)	13,41	68,60	-	137,50 ± 10,60
SCP-B (500)	17,15	87,70	-	175,80 ± 20,00
SCP-B (100)	16,95	86,90	-	174,10 ± 52,81

**TABLA 4.28.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	11,74	100,00	-	163,30 ± 60,98
SPC-C (1000)	13,12	111,76	-	182,50 ± 9,01
SPC-C (500)	19,34	164,79	-	269,10 ± 109,81
SPC-C (100)	18,74	159,79	-	260,80 ± 33,94
SPC-D (1000)	19,10	162,77	-	265,80 ± 60,27
SPC-D (500)	17,36	147,95	-	241,60 ± 24,02
SPC-D (100)	15,99	136,25	-	267,50 ± 70,00

**TABLA 4.29.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	11,38	100,00	-	136,00 ± 12,00
<b>ECG (1000)</b>	11,73	103,04	-	140,00 ± 07,00
<b>ECG (500)</b>	13,19	115,85	-	158,00 ± 25,00
<b>ECG (100)</b>	12,84	112,80	-	154,00 ± 12,00
<b>ECG-A (1000)</b>	15,97	140,24	-	191,00 ± 16,00
<b>ECG-A (500)</b>	12,91	113,41	-	155,00 ± 30,00
<b>ECG-A (100)</b>	11,52	101,21	-	138,00 ± 05,00
<b>ECG-B (1000)</b>	10,00	87,80	-	120,00 ± 13,00
<b>ECG-B (500)</b>	11,73	103,04	-	140,00 ± 12,00
<b>ECG-B (100)</b>	15,00	131,70	-	180,00 ± 09,00

**TABLA 4.30.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	10,31	100,00	-	123,00 ± 36,00
<b>ECG (1000)</b>	10,76	104,30	-	129,10 ± 07,60
<b>ECG (500)</b>	12,01	116,40	-	144,10 ± 05,20
<b>ECG (100)</b>	9,86	95,60	-	118,30 ± 10,10
<b>ECG-A (1000)</b>	10,62	103,00	-	111,60 ± 15,00
<b>ECG-A (500)</b>	10,06	97,60	-	97,50 ± 23,80
<b>ECG-A (100)</b>	10,20	98,90	-	133,30 ± 14,20
<b>ECG-B (1000)</b>	9,30	90,20	-	127,50 ± 26,30
<b>ECG-B (500)</b>	8,12	78,70	-	120,80 ± 13,70
<b>ECG-B (100)</b>	11,11	107,70	-	122,50 ± 26,30



**TABLA 4.31.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	10,53	100,00	-	97,90 ± 15,40
ECG-C (1000)	11,65	110,63	-	108,30 ± 20,20
ECG-C (500)	11,47	108,93	-	106,60 ± 28,70
ECG-C (100)	12,19	115,74	-	113,30 ± 07,60
ECG-D (1000)	8,96	85,10	-	83,30 ± 16,00
ECG-D (500)	10,58	100,42	-	98,30 ± 08,00
ECG-D (100)	13,31	126,38	-	123,70 ± 01,70
PAL (1000)	13,18	125,10	-	122,50 ± 21,30
PAL (500)	11,12	105,53	-	103,30 ± 18,40
PAL (100)	11,65	110,63	-	108,30 ± 12,50

**TABLA 4.32.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
CONTROL	13,36	100,00	-	124,10 ± 22,90
ECG-C (1000)	11,92	89,26	-	110,80 ± 09,40
ECG-C (500)	12,01	89,93	-	111,60 ± 15,80
ECG-C (100)	14,08	105,36	-	130,80 ± 01,40
ECG-D (1000)	13,81	103,35	-	128,30 ± 24,20
ECG-D (500)	13,54	101,34	-	125,80 ± 19,00
ECG-D (100)	13,36	100,00	-	124,10 ± 02,80
PAL (1000)	15,24	114,09	-	141,60 ± 40,10
PAL (500)	14,61	109,39	-	135,80 ± 27,50
PAL (100)	13,31	100,00	-	124,10 ± 25,10

**TABLA 4.33.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (24 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> <b>conc (µg/ml)</b>	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	12,05	100,00	-	139,16 ± 08,30
<b>MMT (1000)</b>	7,25	60,18	-	83,75 ± 05,30
<b>MMT (100)</b>	15,16	125,74	-	175,00 ± 13,23
<b>MMT (10)</b>	14,08	122,02	-	162,50 ± 08,60
<b>CONTROL</b>	9,69	100,00	-	146,92 ± ND*
<b>CTP (1000)</b>	6,96	71,82	-	105,50 ± ND*
<b>CTP (500)</b>	11,77	121,51	-	178,50 ± ND*
<b>CTP (100)</b>	8,01	82,71	-	121,50 ± ND*
<b>CONTROL</b>	2,56	100,00	-	44,85 ± 06,50
<b>CNL (1000)</b>	0,00	-	<b>100,00</b>	00,00 ± 00,00
<b>CNL (500)</b>	1,03	44,21	-	198,80 ± 20,50
<b>CNL (100)</b>	0,99	-	<b>57,3</b>	191,30 ± 06,00

\*<sup>y</sup>) ND: No determinada.

**TABLA 4.34.** Cribado farmacológico *in vitro* de extractos vegetales frente a *T. vaginalis* (48 HORAS).

<b>PRODUCTO</b> conc (µg/ml)	<b>I.C.</b>	<b>%C</b>	<b>%R</b>	<b>MEDIA ± D.E.</b>
<b>CONTROL</b>	20,58	100,00	-	237,50 ± 14,40
<b>MMT (1000)</b>	3,13	15,24	-	36,20 ± 05,30
<b>MMT (100)</b>	15,89	77,22	-	183,40 ± 28,40
<b>MMT (10)</b>	22,60	109,81	-	260,80 ± 08,70
<b>CONTROL</b>	22,04	100,00	-	334,16 ± ND*
<b>CTP (1000)</b>	14,68	66,58	-	222,50 ± ND*
<b>CTP (500)</b>	25,56	115,96	-	387,50 ± ND*
<b>CTP (100)</b>	19,87	90,15	-	301,25 ± ND*
<b>CONTROL</b>	3,55	100,00	-	68,27 ± 05,90
<b>CNL (1000)</b>	0,00	-	<b>100,00</b>	00,00 ± 00,00
<b>CNL (500)</b>	0,35	-	<b>90,14</b>	6,88 ± 00,60
<b>CNL (100)</b>	1,53	43,10	-	29,50 ± 02,90

\*<sup>1</sup>) ND: No determinada.

#### 4.2. MODELO MURINO DE PATOGENIA EXPERIMENTAL INTRAPERITONEAL DE *T. vaginalis*.

Paralelamente al cribado farmacológico *in vitro* de *T. vaginalis*, se ha procedido a la evaluación de un modelo murino de tricomonosis. Para ello inicialmente, se han realizado estudios morfoanatómicos en ratón para la identificación y localización de órganos de especial interés en los ensayos de patogenia experimental intraperitoneal, según la valoración de Toyos (1974). En este sentido, cabe destacar la observación del páncreas, órgano globoso de color rosáceo en posición posteroventral respecto al estómago, y del lóbulo de Spigelio, una de las porciones del hígado murino en su cara visceral próximo al estómago. También es conveniente señalar la presencia de ganglios mesentéricos que no deben ser confundidos con las lesiones que el agente infeccioso puede ocasionar en el peritoneo.

En general, es recomendable tener una idea del aspecto (textura y color) de los diferentes órganos sanos para detectar las alteraciones, si las hubiere, tras las infecciones experimentales. Asimismo, es conveniente adquirir la destreza necesaria en las técnicas básicas de disección.

El desarrollo de estas experiencias previas ha tenido lugar utilizando ratones sanos cuya finalidad no era específicamente la descrita, siendo aprovechados tras su sacrificio, para limitar el uso de los animales de experimentación al necesario para resolver los objetivos planteados en el presente trabajo.

En un principio, se realizaron ensayos preliminares del modelo experimental de Toyos con cepas de *T. vaginalis* autóctonas procedentes de aislamientos obtenidos en estudios epidemiológicos. De esta manera, la cepa I<sub>2</sub>, de denominación propia, fue utilizada en varias pruebas de quimioterapia experimental *in vivo*, siguiendo la metodología y la tabla de valoración de Toyos modificada (Escario, 1985).

Más tarde se propone la revisión de dicho modelo de patogenia, para lo cual se selecciona una cepa de *T. vaginalis* que cumpla los requisitos de elevada patogenia, buenas

condiciones de mantenimiento y estabilidad, además de ser reconocida científicamente. La cepa elegida es la C1-NIH procedente de la A.T.C.C. (según se justifica en Material y Métodos).

La importancia de este diseño experimental radica en su proyección futura a tres niveles, a saber:

- 1°.- La caracterización patogénica de aislamientos naturales de *T. vaginalis*, y,
- 2°.- El cribado farmacológico *in vivo* de productos de síntesis y extractos vegetales.
- 3°.- El estudio de la regulación de la respuesta inmune en la tricomonosis experimental por inmunomoduladores.

Desde la perspectiva de la revisión del modelo de Toyos (1974), que evalúa la patogenia de *T. vaginalis* en función de la mortalidad y lesiones abdominales provocadas en ratones infectados por vía intraperitoneal, se han diseñado tres bloques de experiencias encaminados a la selección de la cepa de hospedador, duración de la infección e inóculo más adecuados para la cuantificación de la patogenia, de acuerdo a la secuencia que se resume a continuación:

1°.- Determinación de la susceptibilidad a la estirpe C1-NIH de *T. vaginalis* de las cepas de ratón: NMRI, CD-1, BALB/c y C57BL/10J.

2°.- Selección del tiempo de infección, entre 15 y 30 días, que permita un mayor discernimiento en las lesiones desarrolladas.

3°.- Valoración, fijadas las variables anteriores, del inóculo más favorable para el establecimiento del parásito:  $10^7$ ,  $5 \times 10^6$  y  $10^6$  tricomonas/ratón, respectivamente.

#### 4.2.1. Selección de la estirpe murina y duración de la infección

En el estudio de las cepas de ratón, se han sometido al modelo experimental dos estirpes no consanguíneas (NMRI, CD-1) y dos consanguíneas (BALB/c y C57BL/10J), desarrollando todas las pruebas en dos tiempos de observación (15 y 30 días).

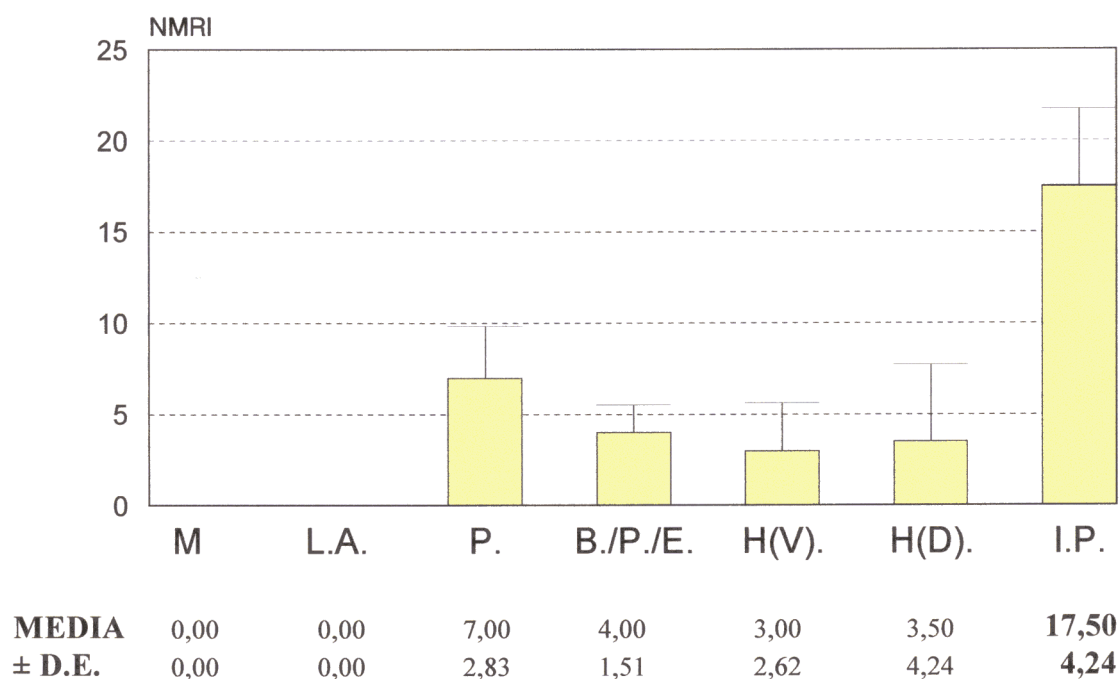
Tal diseño de investigación permite, por una parte, indicar la cepa de hospedador más susceptible a *T. vaginalis*, en el modelo propuesto, y por otra, el tiempo que favorezca la mayor discriminación de las lesiones en la necropsia de los ratones infectados.

## 4.2.1.1. Susceptibilidad de ratones NMRI

TABLA 4.35. Índice de patogenia de *T. vaginalis* en ratones NMRI a los 15 días post-inoculación.

	RATÓN	PARÁMETROS						I.P.
		M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	
15 DÍAS	1	0	0	8	2	4	2	16
	2	0	0	10	4	0	0	14
	3	0	0	8	6	4	0	18
	4	0	0	4	4	0	0	8
	5	0	0	6	4	2	0	12
	6	0	0	6	2	0	0	8
	7	0	0	10	6	0	4	20
	8	0	0	2	2	4	10	18
	9	0	0	8	4	2	2	16
	10	0	0	4	4	8	10	26

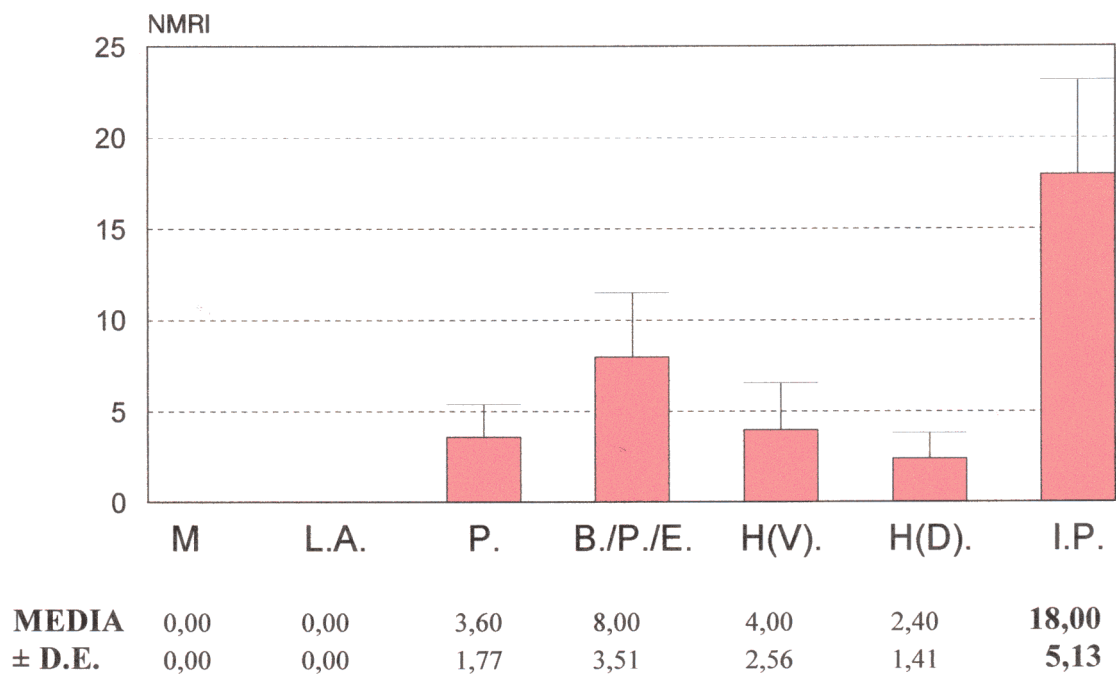
GRÁFICO 4.2. Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.35.



ABREVIATURAS: M. ; mortalidad. L.A. ; liq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V). ; hígado región visceral. H(D). ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

**TABLA 4.36.** ÍNDICE DE PATOGENIA DE *T. vaginalis* EN RATONES NMRI A LOS 30 DÍAS POST-INOCULACIÓN.

		PARÁMETROS						
		RATÓN	M	L.A.	P	B/P/E	H(V)	H(D)
30 DÍAS	1	0	0	6	6	2	2	16
	2	0	0	4	10	8	2	24
	3	0	0	8	4	2	2	16
	4	0	0	4	8	2	2	20
	5	0	0	2	12	2	2	20
	6	0	0	4	12	4	6	26
	7	0	0	4	4	2	2	12
	8	0	0	4	12	8	2	26
	9	0	0	0	6	2	2	10
	10	0	0	0	6	2	2	10

**GRÁFICO 4.3.** Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.36.

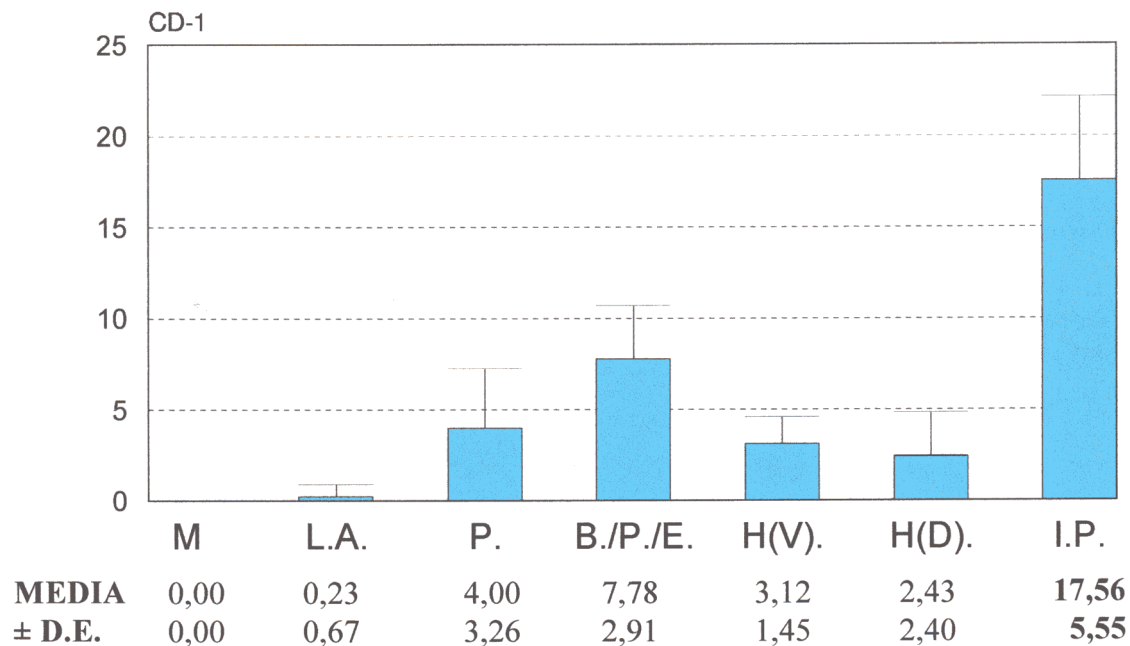
**ABREVIATURAS:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V). ; hígado región visceral. H(D). ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.



**TABLA 4.37.** Índice de patogenia de *T. vaginalis* en ratones CD-1 a los 15 días post-inoculación.

		PARÁMETROS						
		M	L.A.	P	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
15 DÍAS	RATÓN							
	1	0	2	0	12	6	4	24
	2	0	0	2	8	4	2	16
	3	0	0	0	6	4	2	12
	4	0	0	10	6	4	8	28
	5	0	0	4	10	2	2	18
	6	0	0	6	4	2	2	14
	7	0	0	4	4	2	2	12
	8	0	0	8	10	2	0	20
	9	0	0	2	10	2	0	14
10	-	-	-	-	-	-	-	

**GRÁFICO 4.4.** Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.37.

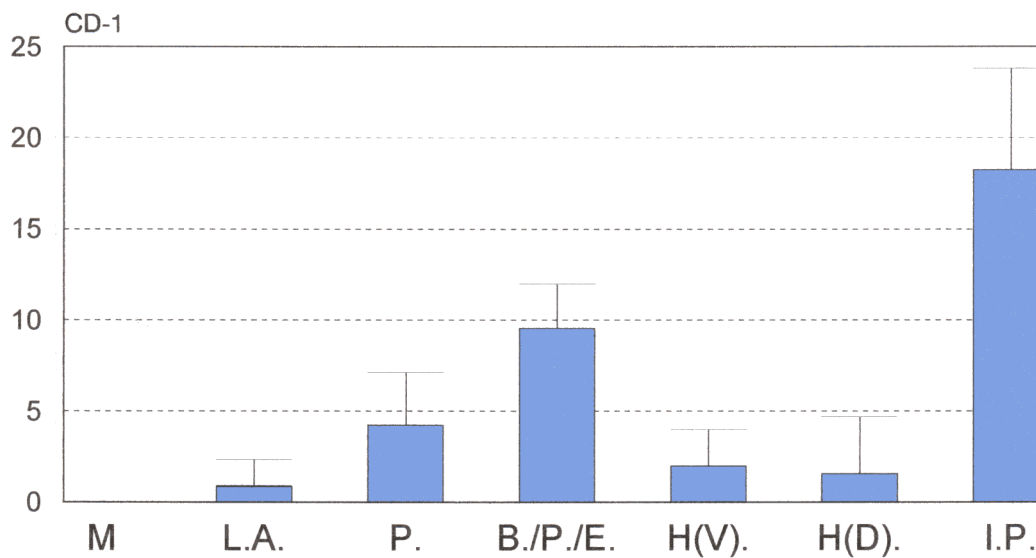


**ABREVIATURAS:** M.; mortalidad. L.A.; liq. ascítico. P.; peritoneo. B/P/E.; bazo/páncreas/estómago. H(V).; hígado región visceral. H(D).; hígado región diafragmática. I. P.; índice de patogenia. D.E.; desviación estándar.

TABLA 4.38. Índice de patogenia de *T. vaginalis* en ratones a los 30 días post-infección.

		PARÁMETROS						
		RATÓN	M	L.A.	P	B/P/E	H(V)	H(D)
30 DÍAS	1	0	0	2	12	6	0	20
	2	0	0	2	12	2	0	16
	3	0	0	2	10	0	0	12
	4	0	0	10	10	2	0	22
	5	0	0	2	6	0	0	8
	6	0	4	8	12	0	0	24
	7	0	2	4	4	2	6	20
	8	0	2	4	8	2	0	16
	9	0	0	4	10	4	8	26
	10	-	-	-	-	-	-	-

GRÁFICO 4.5. Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.38.



**MEDIA** 0,00    0,89    4,23    9,56    2,00    1,56    **18,24**  
**± D.E.**    0,00    1,45    2,90    2,40    2,00    3,13    **5,55**

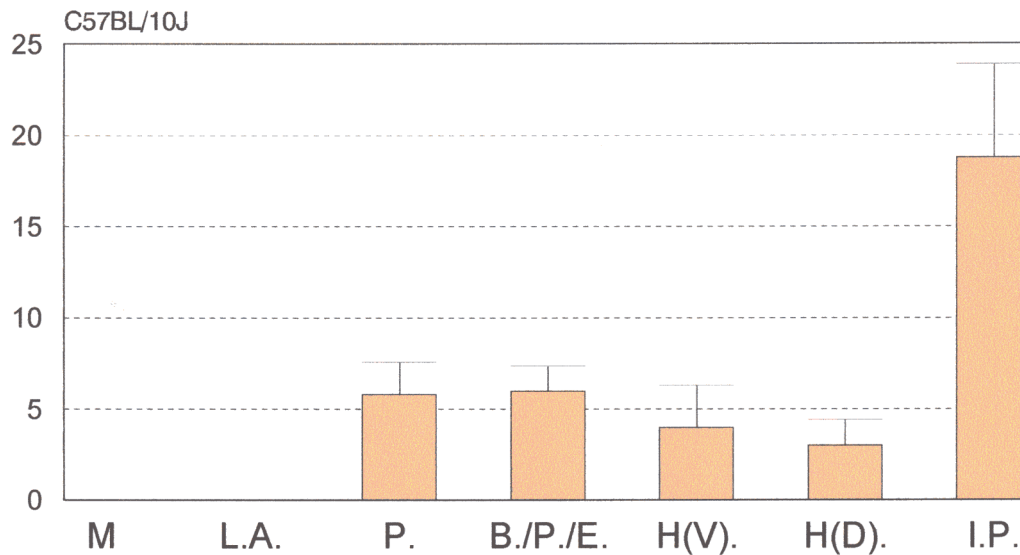
**ABREVIATURAS:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V). ; hígado región visceral. H(D). ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

## 4.2.1.3. Susceptibilidad de ratones C57BL/10J

TABLA 4.39. Índice de patogenia de *T. vaginalis* de ratones C57BL/10J a los 15 días post-infección.

		PARÁMETROS						
		RATÓN	M	L.A.	P	B/P/E	H(V)	H(D)
15 DÍAS	1	0	0	6	6	2	4	18
	2	0	0	6	6	0	0	12
	3	0	0	8	8	6	4	26
	4	0	0	8	6	4	4	22
	5	0	0	6	6	2	2	16
	6	0	0	2	4	4	2	12
	7	0	0	6	4	4	4	18
	8	0	0	4	6	4	2	16
	9	0	0	6	8	8	4	26
	10	0	0	6	6	6	4	22

GRÁFICO 4.6. Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.39.

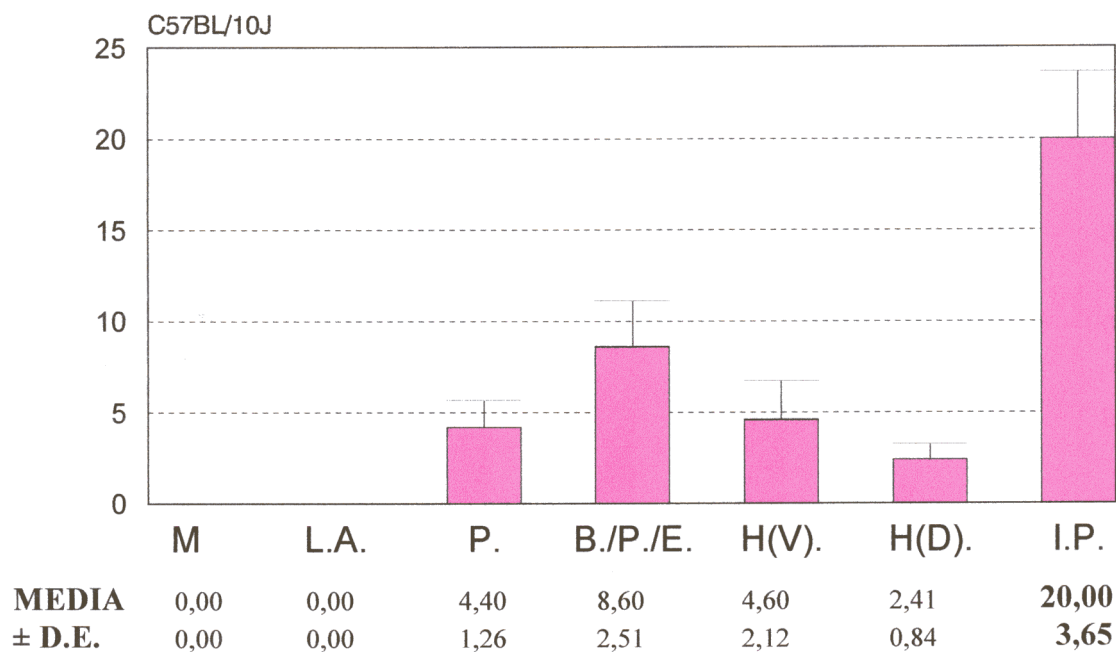


<b>MEDIA</b>	0,00	0,00	5,80	6,00	4,00	3,00	<b>18,80</b>
<b>± D.E.</b>	0,00	0,00	1,75	1,34	2,31	1,41	<b>5,09</b>

ABREVIATURAS: M. ; mortalidad. L.A. ; liq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V). ; hígado región visceral. H(D). ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

**TABLA 4.40.** ÍNDICE DE PATOGENIA DE *T. vaginalis* EN RATONES C57BL/10J A LOS 30 DÍAS POST-INOCULACIÓN.

		PARÁMETROS						
DÍAS	RATÓN	M	L.A.	P	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
	30	1	0	0	6	8	2	2
	2	0	0	4	12	6	2	24
	3	0	0	6	4	2	2	14
	4	0	0	4	10	2	2	18
	5	0	0	6	12	6	2	26
	6	0	0	4	10	4	2	20
	7	0	0	4	8	6	4	22
	8	0	0	4	6	4	2	16
	9	0	0	4	8	8	2	20
	10	0	0	6	8	6	4	24

**GRÁFICO 4.7.** Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.40.

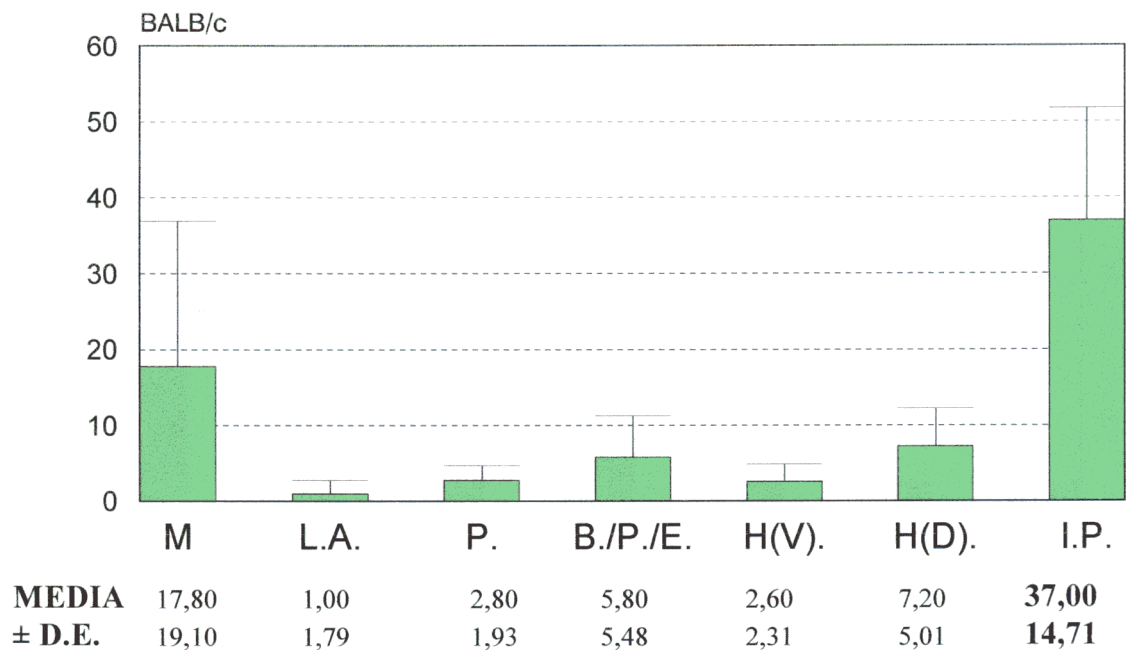
**ABREVIATURAS:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V). ; hígado región visceral. H(D).; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

## 4.2.1.4. Susceptibilidad de ratones BALB/c

TABLA 4.41. Índice de patogenia de *T. vaginalis* en ratones BALB/c a los 15 días post-infección.

		PARÁMETROS						
		M	L.A.	P	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
15 DÍAS	RATÓN							
	1	38	0	4	0	0	10	52
	2	44	0	0	0	0	10	54
	3	32	4	4	0	0	0	40
	4	32	4	2	10	4	0	52
	5	32	0	0	0	4	10	46
	6	0	0	2	4	4	10	20
	7	0	0	6	12	4	12	36
	8	0	0	2	12	6	10	30
	9	0	0	4	6	0	0	10
10	0	0	4	12	4	10	30	

GRÁFICO 4.8. Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.41.

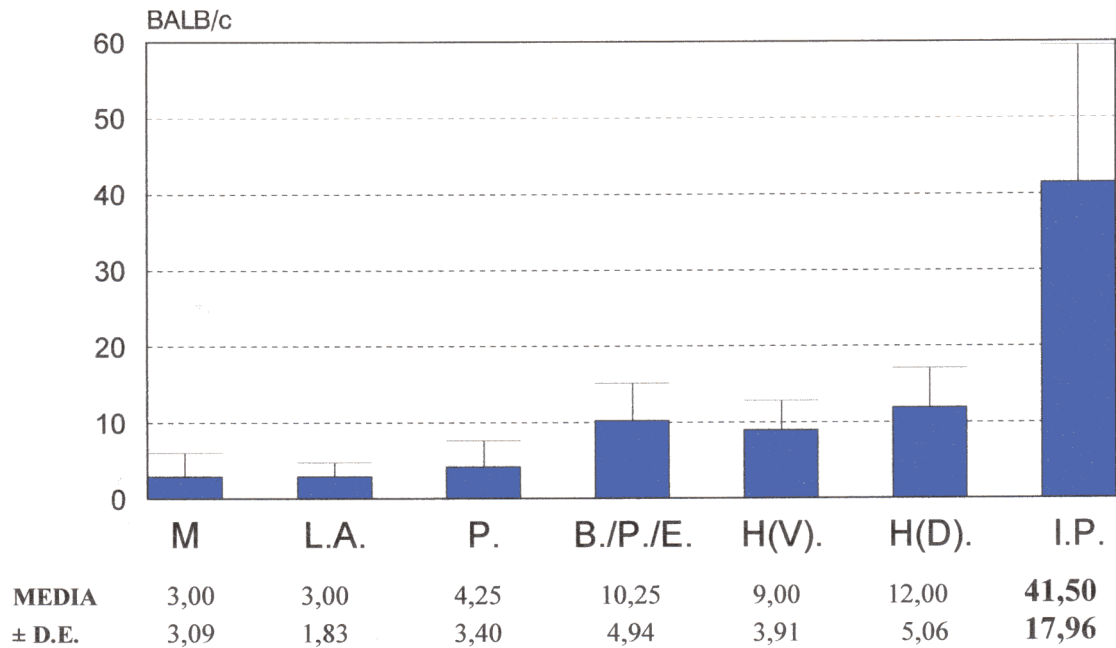


ABREVIATURAS: M. ; mortalidad. L.A. ; liq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V). ; hígado región visceral. H(D).; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

**TABLA 4.42.** Índice de patogenia de *T. vaginalis* En ratones BALB/c a los 30 días post-inoculación.

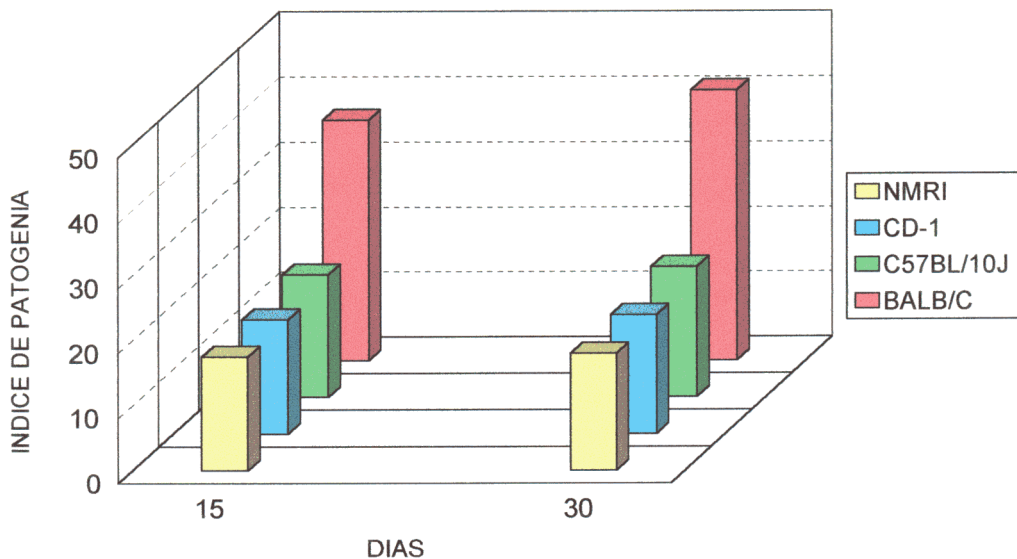
		PARÁMETROS						
DÍAS	RATÓN	M	L.A.	P	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
	30	1	0	0	0	0	0	0
2		0	0	0	0	0	0	0
3		0	2	2	12	8	12	36
4		0	4	6	12	8	12	42
5		6	2	2	12	8	12	42
6		6	2	2	10	8	12	40
7		0	6	10	12	10	12	50
8		0	4	8	12	10	12	46
9		6	2	2	6	10	12	38
10		6	2	2	6	10	12	38

**GRÁFICO 4.9.** Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.42.



**ABREVIATURAS:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V) ; hígado región visceral. H(D).; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

**GRÁFICO 4.10.** Sinopsis de los índices de patogenia de *T. vaginalis* para las cepas de ratón indicadas (INÓCULO:  $10^7$  *T.v./ratón*).



La infección experimental intraperitoneal realizada en las cepas no consanguíneas NMRI y CD-1 muestra índices de patogenia muy similares, con un valor medio de 17,90 y 17,88, respectivamente.

La cepa consanguínea C57Bl/10J presenta un índice de patogenia, con un valor medio de 19,4; relativamente superior a los índices obtenidos en las pruebas con las cepas no consanguíneas. Por último, la otra cepa consanguínea BALB/c muestra un índice de patogenia muy superior, con un valor medio de 39,25, en los periodos de observación de 15 y 30 días.

En definitiva, la cepa BALB/c parece la más recomendable para los ensayos de patogenia experimental de *T. vaginalis* por cuanto ha demostrado ser la más susceptible a la infección.

## 4.2.2.1.1. Análisis estadístico.

Para determinar si las cepas de ratón ensayadas presentan idéntica susceptibilidad a la infección intraperitoneal con *T. vaginalis*, se debe realizar el pertinente tratamiento estadístico. El tamaño muestral reducido y la distribución no normal de los resultados aconsejan una estimación de la varianza no paramétrica o prueba de Kruskal-Wallis.

En las pruebas desarrolladas en un periodo de observación de 15 días con las cepas murinas NMRI, CD-1, BALB/c y C57BL/10J, los resultados son los siguientes:

Valor H' ( $\chi^2$ de Kruskal-Wallis):	11,973
$\chi^2_{1\%,3}$ :	11,345
Nivel de significación:	p<0'01

De otra parte, los resultados de dicho test estadístico para las experiencias realizadas a 30 días se recogen a continuación:

Valor H' ( $\chi^2$ de Kruskal-Wallis):	18,670
$\chi^2_{1\%,3}$ :	11,345
Nivel de significación:	p<0'01

Dado que en ambos casos  $H' > \chi^2_{1\%,3}$ , debe rechazarse, con un riesgo  $\alpha=1\%$ , la hipótesis de que las cuatro muestras fueron extraídas a partir de poblaciones idénticamente distribuidas. Dicho en otros términos, no podemos sostener la hipótesis de que las cuatro cepas presenten un índice de patogenia estadísticamente idéntico.

Toda vez que se ha aplicado la prueba de Kruskal-Wallis, se precisa comprobar por parejas la prueba U de Mann-Whitney para demostrar si dos valores muestrales independientes se han tomado de la misma población. En las tablas 4.42. y 4.43. se expresan los resultados de dicho análisis estadístico en los dos periodos de observación, 15 y 30 días, respectivamente.



**TABLA 4.43.** Prueba U de Mann-Whitney de los índices de patogenicidad del modelo experimental modificado de Toyos en un periodo de observación de 15 días.

CEPAS	NMRI	CD - 1	BALB/c	C57BL/10J
NMRI	-			
CD - 1	33,5 (p>0,05)*	-		
BALB/c	9,5 (p<0,01)	11,5 (p<0,01)	-	
C57BL/10J	34,0 (p>0,05)*	38,0 (p>0,05)*	14,0 (p<0,01)	-

**TABLA 4.44.** Prueba U de Mann-Whitney de los índices de patogenicidad del modelo experimental modificado de Toyos en un periodo de observación de 30 días.

CEPAS	NMRI	CD - 1	BALB/c	C57BL/10J
NMRI	-			
CD - 1	44,0 (p>0,05)*	-		
BALB/c	0,0 (p<0,01)	0,0 (p<0,01)	-	
C57BL/10J	34,0 (p>0,05)*	38,0 (p>0,05)*	0,0 (p<0,01)	-

A. Los valores indicados entre paréntesis corresponden al nivel de significación aplicado en el test estadístico de Mann-Whitney.

B. El asterisco indica que, con un riesgo  $\alpha = 5\%$ , nada se opone para aceptar la hipótesis nula, esto es, las cepas señaladas presentan índices de patogenicidad idénticos estadísticamente hablando.

Para determinar el tiempo óptimo de desarrollo experimental se han ensayado dos periodos de observación: 15 y 30 días. La prueba U de Mann-Whitney permite discernir si existen diferencias significativas entre los índices de patogenicidad de los dos intervalos de tiempo probados para cada cepa.

**TABLA 4.45.** Prueba U de Mann-Whitney de los índices de patogenia de cada cepa a dos intervalos de tiempo 15 y 30 días.

CEPA	U	SIGNIFICACIÓN
BALB/c	34,5	( $p > 0,05$ )*
CD-1	35,5	( $p > 0,05$ )*
C57BL/10J	42,0	( $p > 0,05$ )*
NMRI	38,5	( $p > 0,05$ )*

A. Los valores indicados entre paréntesis corresponden al nivel de significación aplicado en el estadístico de Mann-Whitney.

B. El asterisco indica que, con un riesgo  $\alpha = 5\%$ , nada se opone para aceptar la hipótesis nula, esto es, las cepas señaladas presentan índices de patogenia idénticos estadísticamente hablando.

En conclusión, según el análisis matemático, los índices de patogenia de cada cepa no difieren significativamente en las pruebas desarrolladas a 15 o 30 días. Los índices de patogenia resultantes de ambos periodos no parecen ser estadísticamente diferentes para la cepa más susceptible BALB/c, por lo que se recomienda 15 días para la evaluación de la infección experimental.

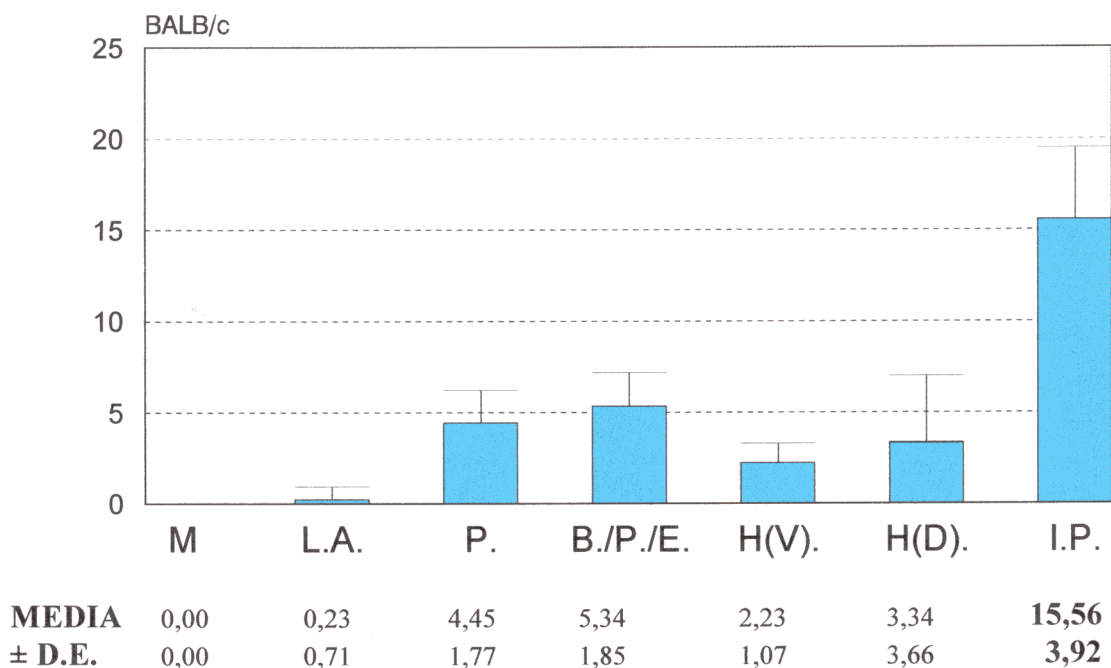
#### 4.2.2. Selección del inóculo más favorable para la infección intraperitoneal.

Habiendo despejado las incógnitas sobre las dos variables iniciales, cepa de ratón más susceptible (BALB/c) y tiempo de observación (15 días), se pretende establecer el inóculo más favorable para el desarrollo de la infección intraperitoneal. La tabla 4.42.1. muestra los índices de patogenia individuales obtenidos tras la inoculación de  $10^6$  *T.vaginalis*/ratón en BALB/c y 15 días de observación. De manera análoga, las tablas 4.42.2. y 4.43.3. indican los índices de patogenia tras idéntica inoculación de  $5 \times 10^6$  y  $10^7$  *T.vaginalis*/ratón, respectivamente. Los gráficos 4.11., 4.12. y 4.13. representan la estadística de los parámetros, así como el índice de patogenia global para cada inóculo, siendo fijas las variables antedichas.

**TABLA 4.46.1.** Índice de patogenia de *T. vaginalis* ratones BALB/C inoculados con  $10^6$  tricomonas/ratón a los 15 días post-inoculación.

		PARÁMETROS						
		M	L.A.	P	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
15 DIAS	RATON							
	1	0	0	6	6	0	0	12
	2	0	0	4	6	2	0	12
	3	0	0	4	4	2	0	10
	4	0	0	2	2	2	0	6
	5	0	0	8	6	2	0	16
	6	0	0	2	2	2	6	12
	7	0	2	4	4	2	2	14
	8	0	0	4	4	4	10	22
	9	0	0	4	8	4	10	26
10	0	0	4	6	2	2	14	

**GRÁFICO 4.11.** Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.46.1.

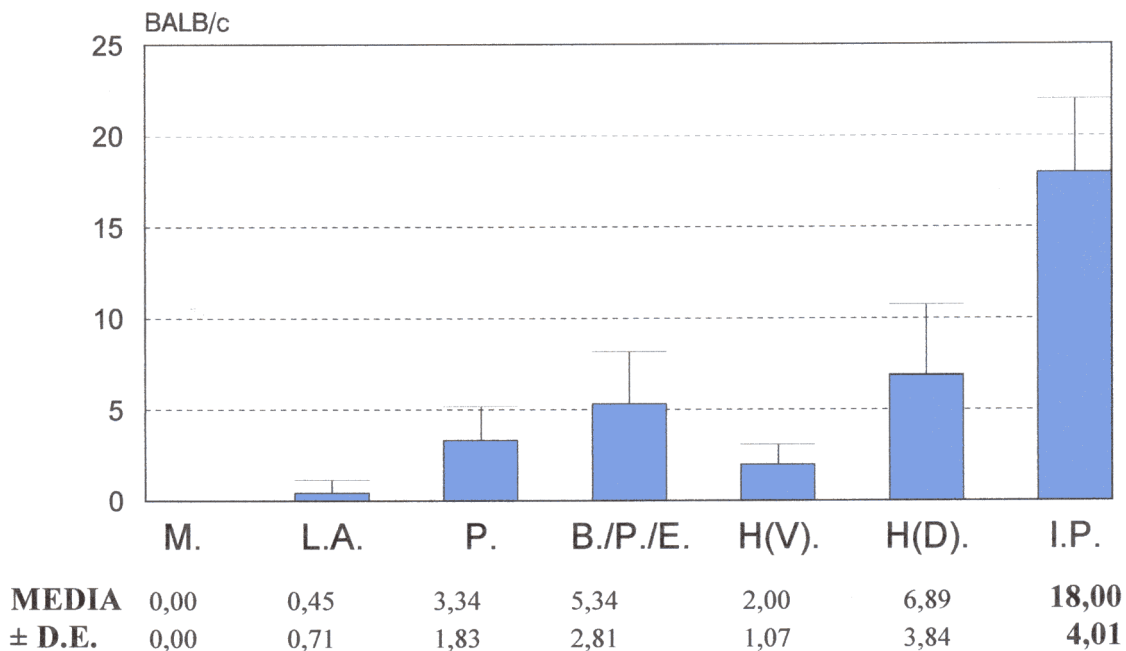


**ABREVIATURAS:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V) ; hígado región visceral. H(D) ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

**TABLA 4.46.2.** Índice de patogenia de *T. vaginalis* en ratones BALB/C inoculados con  $5 \times 10^6$  tricomonas/ratón a los 15 días post-inoculación.

		PARÁMETROS						
		RATÓN	M	L.A.	P	B/P/E	H(V)	H(D)
15 DÍAS	1	0	0	4	4	2	10	20
	2	0	0	0	0	2	10	12
	3	0	0	4	4	0	10	18
	4	0	0	0	4	0	0	4
	5	0	0	4	8	2	2	16
	6	0	0	6	4	2	2	14
	7	0	0	4	8	2	10	24
	8	0	0	2	6	4	10	22
	9	0	2	4	6	2	4	18
	10	0	2	2	8	2	4	18

**GRÁFICO 4.12.** Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.46.2.

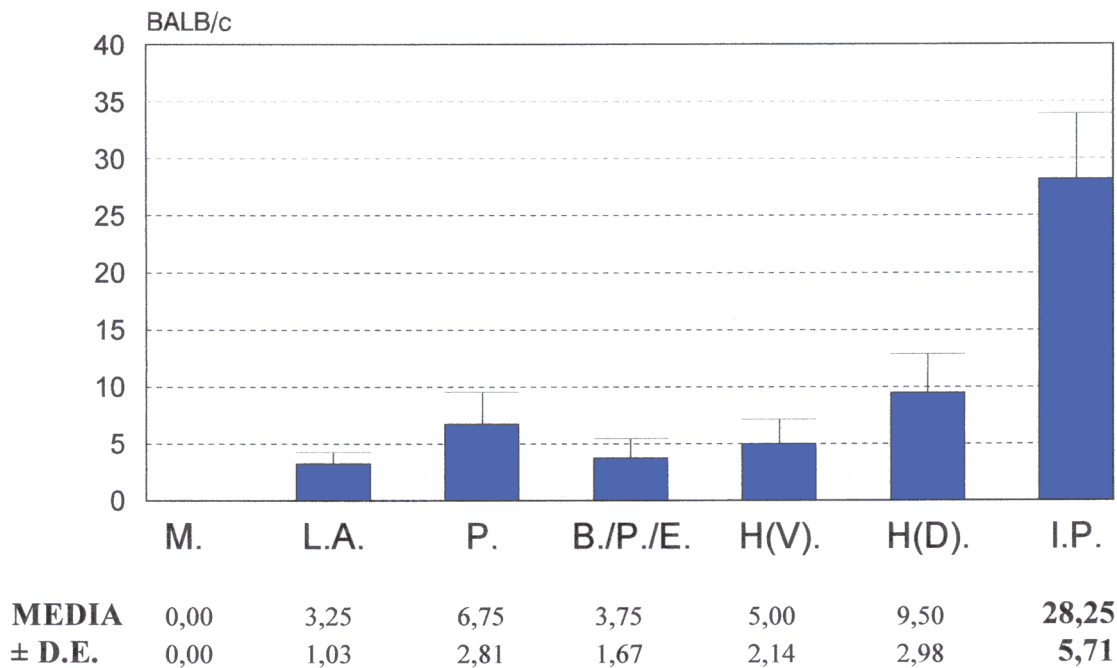


**ABREVIATURAS:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V) ; hígado región visceral. H(D) ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

**TABLA 4.46.3.** Índice de patogenicidad de *T. vaginalis* en ratones BALB/C inoculados con  $10^7$  tricomonas/ratón a los 15 días post-inoculación.

		PARÁMETROS						
		RATÓN	M	L.A.	P	B/P/E	H(V)	H(D)
15 DÍAS	1	0	2	6	4	2	4	18
	2	0	4	4	4	8	12	32
	3	0	4	4	4	8	6	26
	4	0	4	10	0	4	10	28
	5	0	4	10	6	6	12	38
	6	0	2	10	4	4	10	30
	7	0	4	6	4	4	10	28
	8	0	2	4	4	4	12	26
	9	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	0	0	0

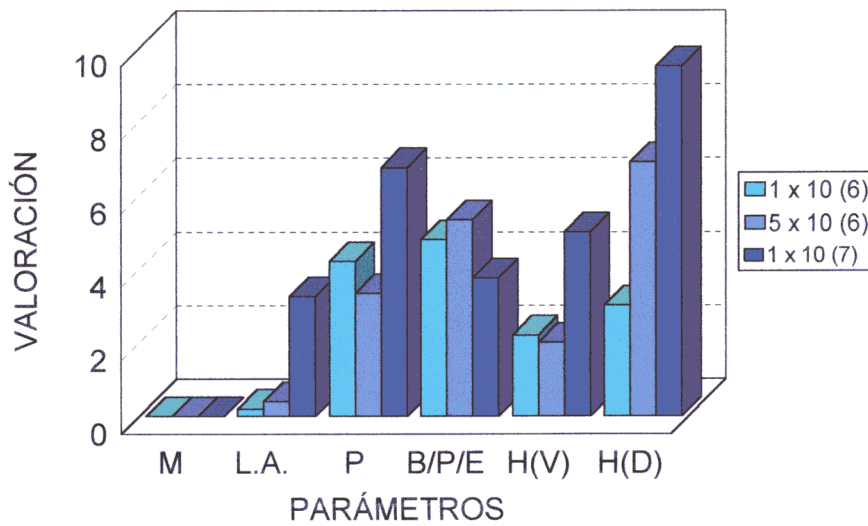
**GRÁFICO 4.13.** Histograma de los parámetros valorados en la tabla 4.46.3.



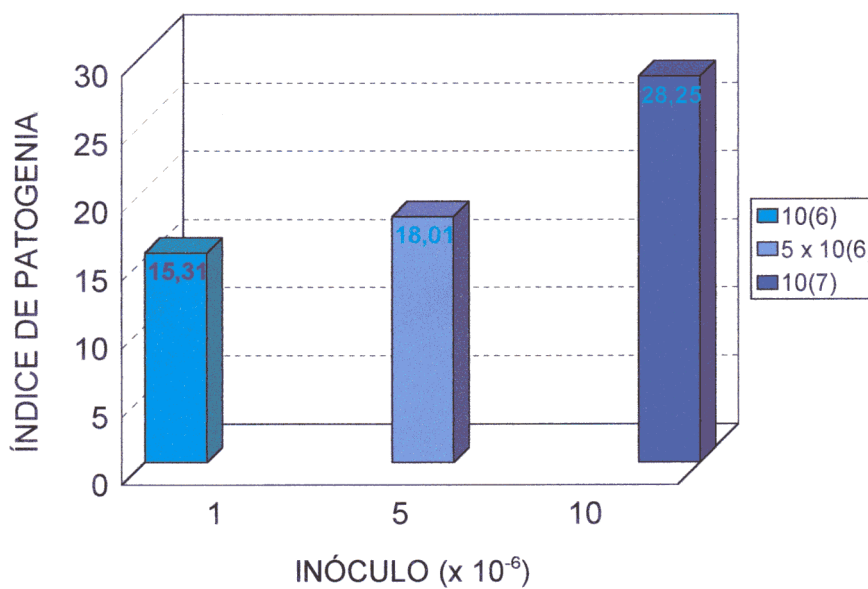
**ABREVIATURAS:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V). ; hígado región visceral. H(D). ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenicidad. D.E. ; desviación estándar.

Por último, en los gráficos 4.14. y 4.15. aparecen la valoración de los parámetros e índices de patogenia, respectivamente, según el modelo de Toyos modificado (Escario, 1985), en función de inóculos variables:  $10^6$ ,  $5 \times 10^6$  y  $10^7$  *T. v./ratón*, en la cepa de ratón BALB/c y a 15 días de observación.

**GRÁFICO 4.14.** Sinopsis de la valoración de los parámetros de patogenia, según el modelo de Toyos modificado, para la infección con *T. vaginalis* de la cepa de ratón BALB/c en función de un inóculo variable a 15 días.



**GRÁFICO 4.15.** Índices de patogenia para la infección con *T. vaginalis* de la cepa de ratón BALB/c con inóculos variables a 15 días.



## 4.2.2.2. Análisis estadístico.

Tras la selección de la cepa murina más susceptible y el tiempo óptimo de observación, se procede a ensayar diferentes inóculos para establecer el más adecuado en la infección experimental de *T. vaginalis*.

Los valores de los índices de patogenia obtenidos por la inoculación de  $10^7$ ,  $5 \times 10^6$ ,  $10^6$  tricomonas/ratón en la cepa BALB/c son sometidos a la prueba de Kruskal-Wallis:

Valor H' ( $\chi^2$ de Kruskal-Wallis):	14,030
$\chi^2_{1\%,3}$ :	11,345
Nivel de significación:	$p < 0,01$

Dado que  $H' \geq \chi^2_{1\%,3}$ , entonces nada se opone en rechazar la hipótesis nula, esto es, no se puede sostener, con un riesgo  $\alpha = 1\%$ , que los valores muestrales pertenezcan a poblaciones que se distribuyen de manera idéntica. En otros términos, los índices de patogenia de los tres lotes no son idénticos con el riesgo antes referido. A continuación se realizan las pruebas U de Mann-Whitney para determinar la independencia de los lotes por parejas. Los resultados se presentan en la tabla 4.46.

**TABLA 4.47.** Prueba U de Mann-Whitney de los índices de patogenia de los lotes inoculados con  $10^7$ ,  $5 \times 10^6$  y  $10^6$  *T.v./ratón* en BALB/c.

INÓCULO	$10^6$	$5 \times 10^6$	$10^7$
$10^6$	-		
$5 \times 10^6$	23,5 ( $p > 0,05$ )*	-	
$10^7$	3,0 ( $p < 0,01$ )	4,5 ( $p < 0,01$ )	-

A. Los valores indicados entre paréntesis corresponden al nivel de significación aplicado en el estadístico de Mann-Whitney.

B. El asterisco indica que, con un riesgo  $\alpha = 5\%$ , nada se opone para aceptar la hipótesis nula, esto es, los índices de patogenia de los lotes inoculados con  $5 \times 10^6$  y  $10^6$  son idénticos estadísticamente hablando.

Por último, se verifica que las experiencias de infección intraperitoneal de *T. vaginalis* en BALB/c en un tiempo de observación de 15 días son homogéneas, es decir presentan índices de patogenia estadísticamente idénticos. Una vez más se aplica la prueba U de Mann-Whitney para comprobar si dos valores muestrales independientes se han tomado de la misma población. El resultado de la aplicación del estadístico se resume brevemente:

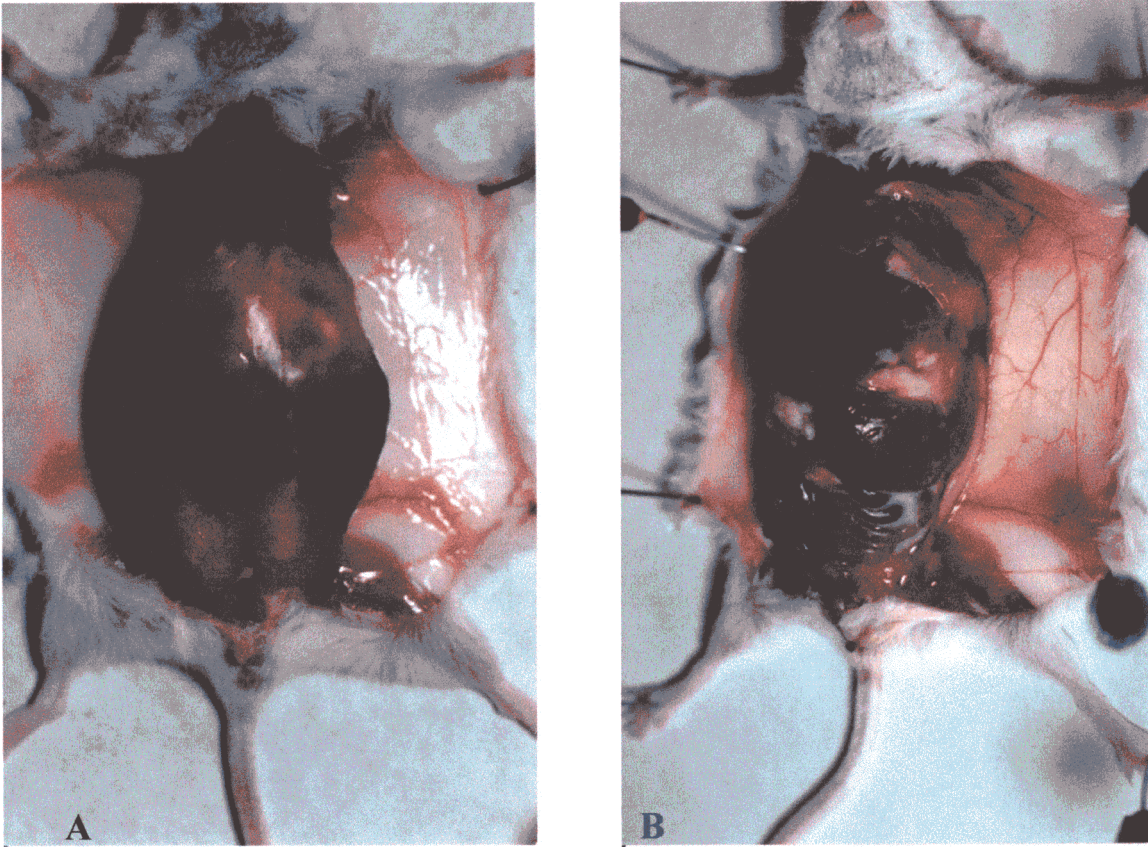
U:	34,5	Nivel de significación: $p > 0,05^*$
$U_{10,8}$ :	17,0	

(\*) El asterisco indica que, con un riesgo  $\alpha = 5\%$ , se acepta la hipótesis nula, esto es, las pruebas realizadas a 15 días en la cepa BALB/c de ratón presentan índices de patogenia idénticos estadísticamente hablando.

#### 4.2.3. FOTOGRAFÍAS.

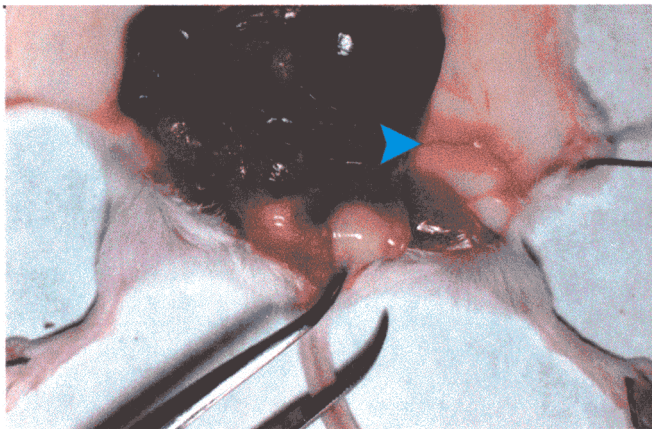
Se presentan con un breve comentario, una muestra de las fotografías más relevantes de las infecciones experimentales llevadas a cabo, que ilustran las lesiones típicas en dicho modelo de patogenia.





**FIGURA 4.1.** Cavidad abdominal de un ratón BALB/c, en la necropsia del 30° día p.i., infectado intraperitonealmente con *T. vaginalis* (cepa C1-NIH).

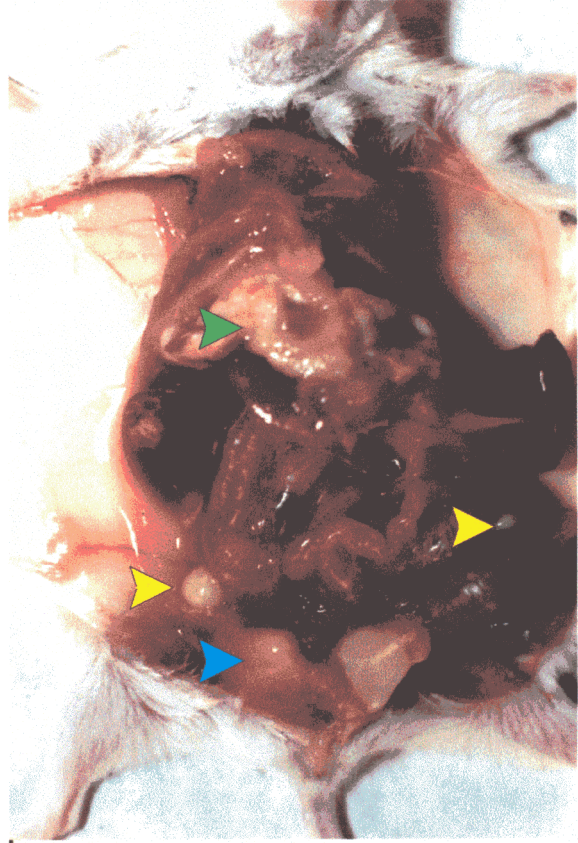
- a) Inicio de la disección; observación de lesiones necróticas fibrinopurulentas diseminadas por la cavidad abdominal.
- b) Se observa en el peritoneo un exudado seroso productivo (con presencia del agente patógeno), que contribuye a la ascitis; el hígado muestra en la cara diafragmática un foco de necrosis purulenta que se extiende al diafragma. Finalmente, se señala la lesión típica de la infección experimental, que engloba al estómago, bazo y páncreas; en esta ocasión, también se ven afectados tanto el intestino delgado como la cara visceral del hígado.



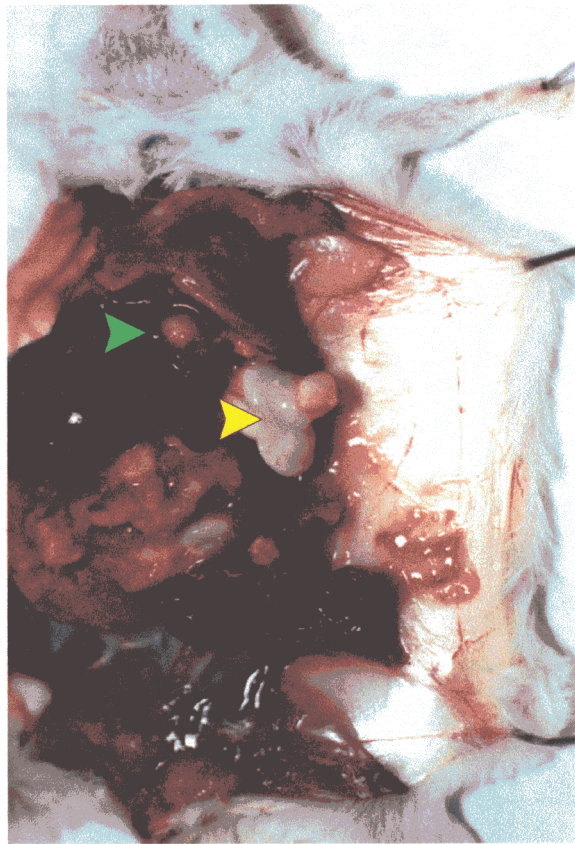
n ratón BALB/c, en la necropsia tras el 15° día p.i., infectado intraperitonealmente con *T. vaginalis* (cepa C1-NIH). La infección experimental presenta un foco fibrinopurulento productivo que interesa profundamente la vejiga y la zona inferior del peritoneo. La valoración de la lesión peritoneal es de 8 puntos, considerando necrosis extendida por toda la pelvis. Puede apreciarse también adenitis aguda difusa (flecha).



**FIGURA 4.3.** Cavidad abdominal de un ratón BALB/c, en la necropsia del 15° día p.i., infectado intraperitonealmente con *T. vaginalis* (cepa C1-NIH). La cara diafragmática del hígado presenta una necrosis purulenta (flecha verde) que afecta a todos los lóbulos e invade el diafragma (12 puntos). En el peritoneo se visualizan dos abscesos tricomonádidos de borde definido y esferoidales, de color blanco-amarillento (5-10 mm de diámetro) (flechas amarillas), así como necrosis extendida por toda la pelvis (flecha azul) valorada con 8 puntos.

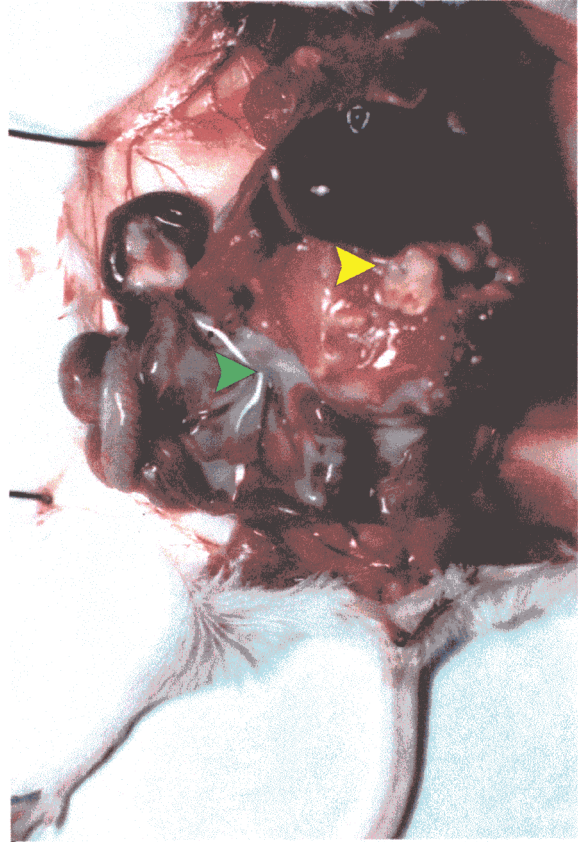


**FIGURA 4.4.** Cavidad abdominal de un ratón BALB/c, en la necropsia del 30° día p.i., infectado intraperitonealmente con *T. vaginalis* (cepa C1-NIH). La cara diafragmática del hígado presenta un absceso tricomonádido indurado y esferoidal que afecta a varios lóbulos (flecha verde) (10 puntos). Se distingue una necrosis fibrinopurulenta, con producción de tricomonas, que engloba al conjunto del estómago, bazo y páncreas, además del intestino delgado y la porción visceral del hígado (flecha amarilla) (12 puntos). Especial atención merece el exudado fibrino-seroso y hemorrágico que recubre los órganos afectados.

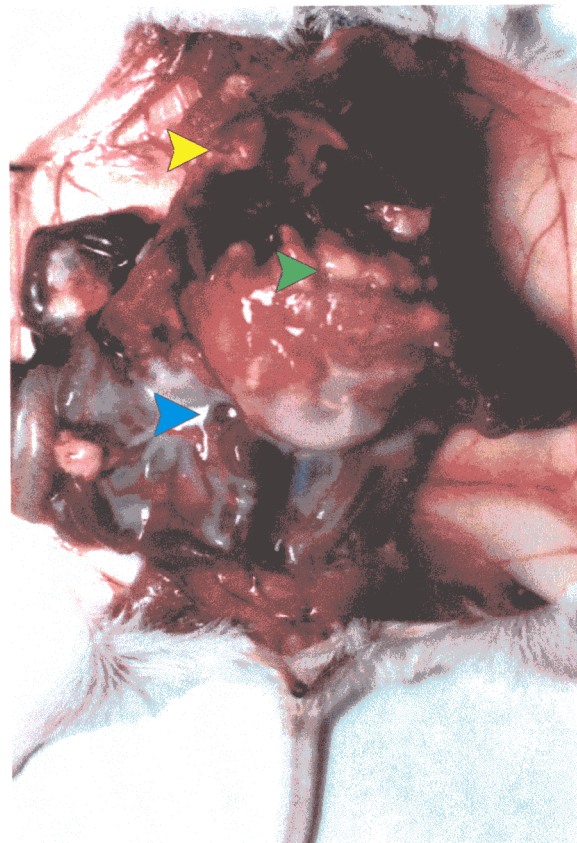




**FIGURA 4.5.** Cavidad abdominal de un ratón BALB/c, en la necropsia del 30° día p.i., infectado intraperitonealmente con *T. vaginalis* (C1-NIH).



a) En el peritoneo se concentra un exudado seroso que ocupa la cavidad abdominal, envolviendo el intestino grueso. Se observan necrosis diseminadas en las asas intestinales, región mesointestinal y zona perirrenal (flecha verde) (10 puntos). Estómago, bazo, páncreas muestran necrosis mayores de 15 mm de diámetro, alcanzando el hígado y varias asas intestinales (flecha amarilla) (12 puntos).



b) Si la cara diafragmática del hígado parece sana en a), la extracción de los lóbulos superiores del hígado muestra que la cara visceral se encuentra fundida al estómago e intestino delgado, con la desaparición completa del lóbulo de Spigelio (flecha verde). De otra parte, el músculo diafragmático también parece mostrar una lesión necrótica que se extiende a la cavidad torácica (flecha amarilla). Se aprecia el exudado purulento de las lesiones abdominales que envuelve varios órganos (flecha azul).



### 4.3. CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VIVO*

El modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* actualizado ha sido adaptado al cribado farmacológico de productos de síntesis. Brevemente, el protocolo de trabajo se establece de forma que ratones NMRI<sup>(1)</sup> (10 ratones/lote) se infectan intraperitonealmente con la cepa C1:NIH de *T. vaginalis* y son tratados por vía oral, con sonda bucofaríngea, con 6 dosis de 100 mg/Kg de los compuestos con potencial actividad tricomonocida. Los días de tratamiento corresponden al: 3º, 4º, 5º, 8º, 9º y 10º post-infección. Los productos de síntesis se administran en carboximetilcelulosa 1%, en un volumen de 0,3 ml/dosis. El tratamiento con el producto de referencia (metronidazol) produce una curación del 100% de las lesiones en un protocolo que contempla 6 dosis de 25 mg/Kg de ratón en carboximetilcelulosa 1%.

La actividad tricomonocida de los productos de síntesis se valora en función de la capacidad de reducción de la mortalidad y las lesiones abdominales en los animales por comparación con un grupo control (no tratado).

Para la validación del modelo de cribado farmacológico *in vivo* se han utilizado cinco productos de la serie de las tiadiazinas disustituidas, tres de los cuales manifestaron previamente una actividad tricomonocida *in vitro* destacable (1m, L-1d, D-1j), los otros dos fueron ensayados en función de un criterio de disponibilidad (DL-1d y L-1i). Además del ensayo con el producto de referencia (metronidazol).

Ninguno de los extractos vegetales presentó una actividad *in vitro* interesante que justificase su paso a las pruebas *in vivo*, o bien no estaba disponible. A continuación se expresan en tablas la valoración de las lesiones y mortalidad de los grupos tratados y control. Finalizando con la representación en un gráfico de ambos resultados.

---

(1) Aún cuando del bloque anterior de resultados se desprende que la estirpe BALB/c es la más susceptible a la infección, se eligieron ratones NMRI, no consanguíneos, para efectuar las pruebas por razones económicas y de disponibilidad de un elevado número.

**TABLA 4.48.** Valoración paramétrica de la eficacia *in vivo* frente a *T. vaginalis* de la tiadiazina 1m. Datos del lote control (a) y tratado (b)

a)

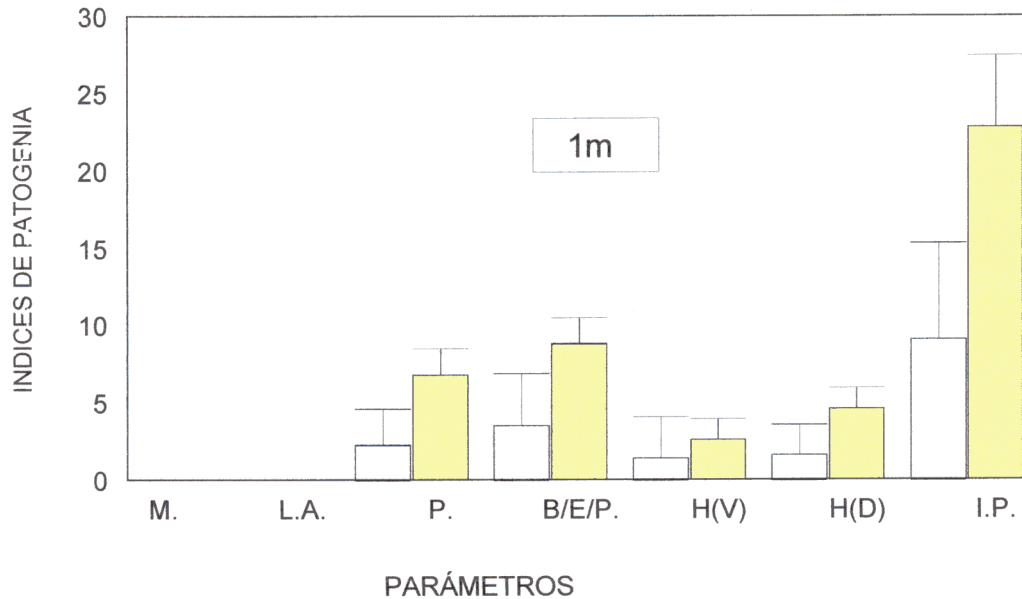
CONTROL		PARÁMETROS						
	RATÓN	M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	I.P.
15	1	0	0	6	8	2	4	20
	2	0	0	6	8	2	6	22
	3	0	0	6	10	6	6	28
	4	0	0	10	10	2	6	28
	5	0	0	8	8	2	4	22
	6	0	0	4	6	2	4	16
	7	0	0	8	10	2	4	24
	8	0	0	6	8	2	4	20
	9	0	0	8	12	4	6	30
	10	0	0	6	8	2	2	18
	<b>MEDIA</b>	0,00	0,00	6,80	8,80	2,60	4,60	22,80
	<b>D.E.</b>	0,00	0,00	1,69	1,69	1,35	1,35	4,63

b)

1M (100 mg/Kg ratón)		PARÁMETROS						
	RATÓN	M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	I.P.
15	1	0	0	0	4	0	2	6
	2	0	0	4	8	2	0	14
	3	0	0	6	4	2	2	14
	4	0	0	0	6	0	0	6
	5	0	0	2	2	8	4	16
	6	0	0	2	0	0	4	6
	7	0	0	4	2	0	0	6
	8	0	0	4	8	0	4	16
	9	0	0	0	0	0	0	0
	10	0	0	0	0	2	0	2
	<b>MEDIA</b>	0,00	0,00	2,20	3,40	1,40	1,60	8,60
	<b>D.E.</b>	0,00	0,00	2,20	3,13	2,50	1,84	5,89



**GRÁFICA 4.16.** Expresión de los valores medios asignados a las manifestaciones patológicas e índices de patogenia en ratones infectados con *T. vaginalis* y tratados por vía oral con 1m.



En amarillo se representa la valoración de los parámetros en el control y en blanco la valoración de los parámetros en el grupo tratado con 1m.

**Abreviaturas:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V). ; hígado región visceral. H(D). ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

De nuevo, para el análisis estadístico se recurre al test no paramétrico U de Mann-Whitney, para comparar si los índices de patogenia del grupo control y tratado (1m) pertenecen a la misma población muestral:

U (calculada de Mann-Whitney):	1,000
U (tabulada: $_{10, 10, 5\%}$ )	23,000
Nivel de significación:	$p < 0.01$

Dado que,  $U \leq U_{10, 10, 5\%}$ , se puede afirmar con un riesgo  $\alpha = 1\%$ , que existen diferencias estadísticamente significativas entre el índice de patogenia del lote control y el tratado (1m).

**TABLA 4.49.** Valoración paramétrica de la eficacia *in vivo* frente a *T. vaginalis* de la tiadiazina L-1d. Datos del lote control (a) y tratado con L-1d (b).

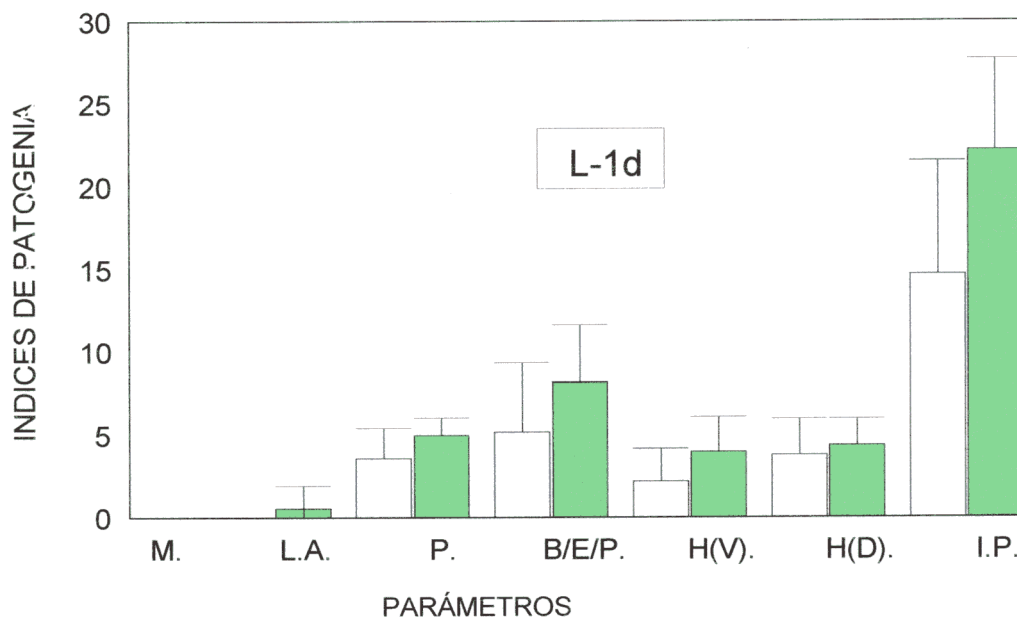
a)

CONTROL		PARÁMETROS						
15 DÍAS	RATÓN	M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	I.P.
	1	0	0	6	0	2	2	10
	2	0	0	4	6	2	6	20
	3	0	0	6	8	4	6	24
	4	0	0	6	8	4	6	24
	5	0	0	4	10	6	4	24
	6	0	0	6	10	6	4	26
	7	0	0	6	12	4	4	26
	8	0	0	4	12	2	2	20
	9	0	0	4	8	2	4	18
	10	0	4	4	8	8	6	30
	<b>MEDIA</b>	0,00	0,60	5,00	8,20	4,00	4,40	22,20
	<b>D.E.</b>	0,00	1,35	1,05	3,46	2,11	1,58	5,53

b)

L-1d (100 mg/Kg ratón)		PARÁMETROS						
15 DÍAS	RATÓN	M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	I.P.
	1	0	0	4	4	4	2	14
	2	0	0	6	12	6	6	30
	3	0	0	4	4	2	4	14
	4	0	0	2	2	0	8	12
	5	0	0	0	0	0	6	6
	6	0	0	2	0	0	4	6
	7	0	0	4	12	2	2	20
	8	0	0	6	6	2	2	16
	9	0	0	4	6	4	2	16
	10	0	0	4	6	2	2	14
	<b>MEDIA</b>	0,00	0,00	3,60	5,20	2,20	3,80	14,80
	<b>D.E.</b>	0,00	0,00	1,84	4,24	1,99	2,20	6,88

**GRÁFICA 4.17.** Expresión de los valores medios asignados a las manifestaciones patológicas e índices de patogenia en ratones infectados con *T. vaginalis* y tratados por vía oral con L-1d.



En verde se representa la valoración de los parámetros en el control y en blanco la valoración de los parámetros en el grupo tratado con L-1d.

**Abreviaturas:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V).; hígado región visceral. H(D). ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

El análisis estadístico aplicado, según las características del ensayo, es un test no paramétrico (U de Mann-Whitney), que permite comparar si los índices de patogenia del grupo control y tratado (L-1d) pertenecen a la misma población muestral:

$U_{L-1d}$ (calculada de Mann-Whitney):	18,500
U (tabulada: $_{10, 10, 5\%}$ )	23,000
Nivel de significación:	$p < 0.01$

Siendo  $U_{L-1d} \leq U_{10, 10, 5\%}$ , se puede afirmar con un riesgo  $\alpha = 1\%$ , que existen diferencias estadísticamente significativas entre los índices de patogenia de los lotes control y tratado (L-1d).

**TABLA 4.50.** Valoración paramétrica de la eficacia *in vivo* frente a *T. vaginalis* de la tiadiazina D-1j. Datos del lote control (a) y tratado (b).

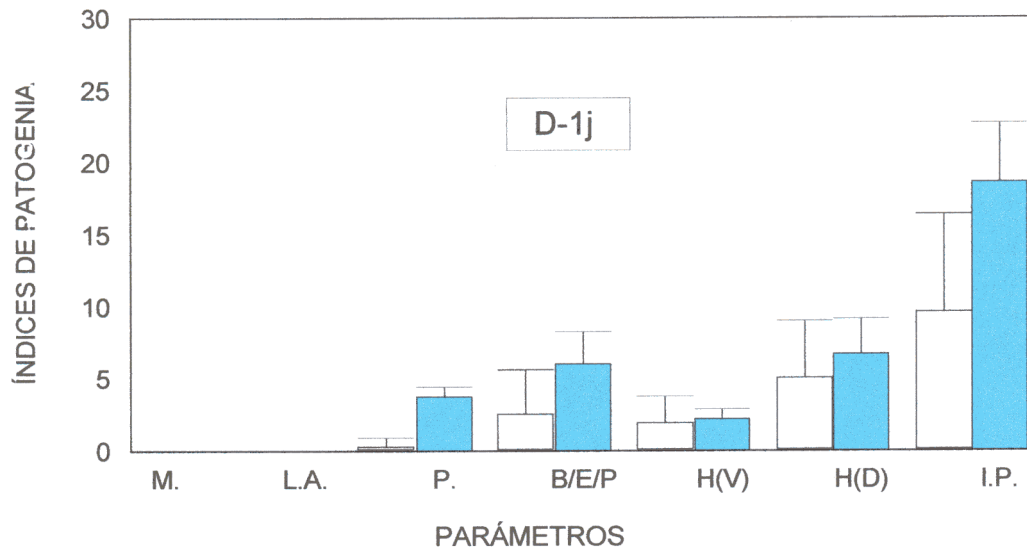
a)

CONTROL		PARÁMETROS						
	RATÓN	M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	I.P.
15 DÍAS	1	0	0	4	6	2	6	18
	2	0	0	2	4	2	4	12
	3	0	0	4	8	2	4	18
	4	0	0	4	8	2	6	20
	5	0	0	4	4	2	8	18
	6	0	0	4	10	2	8	24
	7	0	0	4	6	4	10	24
	8	0	0	4	4	2	10	20
	9	0	0	4	4	2	4	14
	10	-	-	-	-	-	-	-
	<b>MEDIA</b>	0,00	0,00	3,78	6,00	2,23	6,67	18,67
	<b>D.E.</b>	0,00	0,00	0,78	2,23	0,67	2,45	4,00

b)

D-1j (100 mg/Kg ratón)		PARÁMETROS						
	RATÓN	M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	I.P.
15 DÍAS	1	0	0	0	0	2	8	10
	2	0	0	0	4	2	8	14
	3	0	0	0	8	2	2	12
	4	0	0	0	0	0	0	0
	5	0	0	0	0	6	6	12
	6	0	0	0	6	2	8	16
	7	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	0	4	2	8	14
	10	0	0	2	2	2	8	14
	<b>MEDIA</b>	0,00	0,00	0,20	2,40	1,80	4,80	9,20
	<b>D.E.</b>	0,00	0,00	0,63	2,95	1,75	3,79	6,54

**GRÁFICA 4.18.** Expresión de los valores medios asignados a las manifestaciones patológicas e índices de patogenia en ratones infectados con *T. vaginalis* y tratados por vía oral con D-1j.



El gráfico de barras representa la valoración de los parámetros en el grupo control (azul) y la valoración de los parámetros en el grupo tratado con D-1j (blanco).

**Abreviaturas:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V).; hígado región visceral. H(D). ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

La aplicación del test no paramétrico (U de Mann-Whitney), que permite establecer si los índices de patogenia del grupo control y tratado (D-1j) pertenecen a la misma población muestral, genera los siguientes resultados:

$U_{D-1j}$ (calculada de Mann-Whitney):	16,000
U (tabulada: $_{10,10,5\%}$ )	23,000
Nivel de significación:	$p < 0'01$

Y, por tanto, si  $U_{D-1j} \leq U_{10,10,5\%}$ , se puede afirmar con un riesgo  $\alpha = 1\%$ , que existen diferencias estadísticamente significativas entre los índices de patogenia del lote control y el lote tratado (D-1j).

**TABLA 4.51.** Valoración paramétrica de la eficacia *in vivo* frente a *T. vaginalis* de la tiadiazina DL-1d. Datos del lote control (a) y tratado (b).

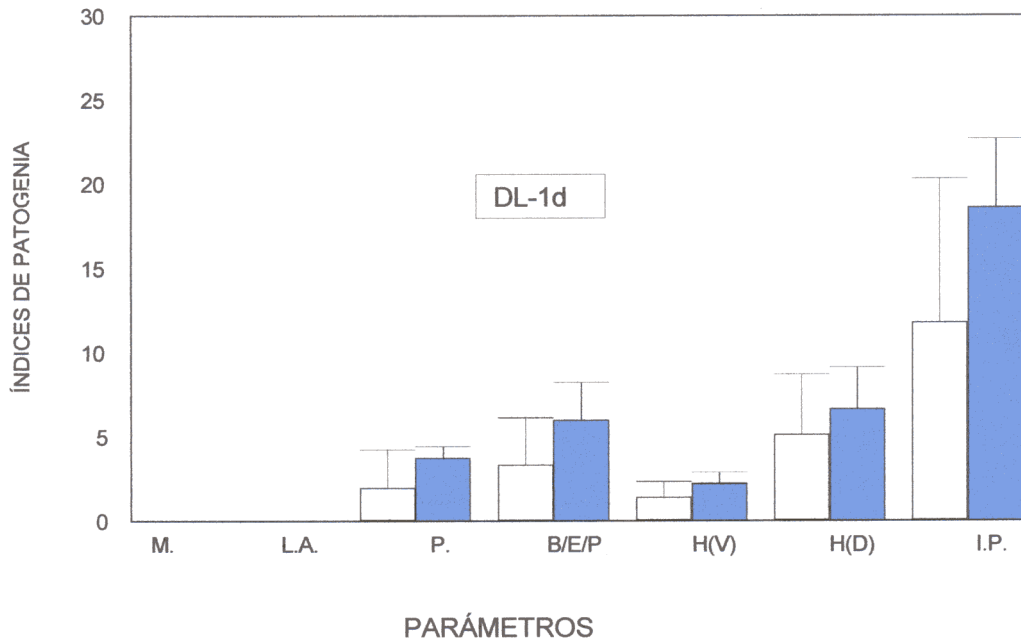
a)

CONTROL		PARÁMETROS						
15 DÍAS	RATÓN	M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	LP.
	1	0	0	4	6	2	6	18
	2	0	0	2	4	2	4	12
	3	0	0	4	8	2	4	18
	4	0	0	4	8	2	6	20
	5	0	0	4	4	2	8	18
	6	0	0	4	10	2	8	24
	7	0	0	4	6	4	10	24
	8	0	0	4	4	2	10	20
	9	0	0	4	4	2	4	14
	10	-	-	-	-	-	-	-
	<b>MEDIA</b>	0,00	0,00	3,78	6,00	2,23	6,67	18,67
	<b>D.E.</b>	0,00	0,00	0,78	2,23	0,67	2,45	4,00

b)

DL-1d (100 mg/Kg ratón)		PARÁMETROS						
15 DÍAS	RATÓN	M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	LP.
	1	0	0	0	8	2	8	18
	2	0	0	6	4	2	6	18
	3	0	0	2	4	2	8	16
	4	0	0	0	2	2	6	10
	5	0	0	4	4	2	8	18
	6	0	0	0	0	0	0	0
	7	0	0	0	0	0	0	0
	8	0	0	0	0	0	0	0
	9	0	0	4	2	2	8	20
	10	0	0	4	2	2	8	20
	<b>MEDIA</b>	0,00	0,00	2,30	3,40	1,40	5,20	12,00
	<b>D.E.</b>	0,00	0,00	4,45	2,84	0,97	3,68	8,74

**GRÁFICA 4.19.** Expresión de los valores medios asignados a las manifestaciones patológicas e índices de patogenia en ratones infectados con *T. vaginalis* y tratados por vía oral con DL-1d.



El gráfico de barras representa la valoración de los parámetros en el grupo control (violeta) y la valoración de los parámetros en el grupo tratado con DL-1d (blanco).

**Abreviaturas:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V).; hígado región visceral. H(D). ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

En esta ocasión el test no paramétrico (U de Mann-Whitney), que permite establecer si los índices de patogenia del grupo control y tratado (DL-1d) pertenecen a la misma población muestral, aporta los siguientes resultados:

$U_{DL-1d}$ (calculada de Mann-Whitney):	33,000
U (tabulada: $_{10, 9, 5\%}$ )	20,000
Nivel de significación:	$p < 0'01$

Así pues, si  $U_{DL-1d} \geq U_{10,10,5\%}$ , se puede afirmar con un riesgo  $\alpha = 1\%$ , que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los índices de patogenia del lote control y el lote tratado (DL-1d).

**TABLA 4.52.** Valoración paramétrica de la eficacia *in vivo* frente a *T. vaginalis* de la tiadiazina L-1i. Datos del lote control (a) y tratado L-1i (b).

a)

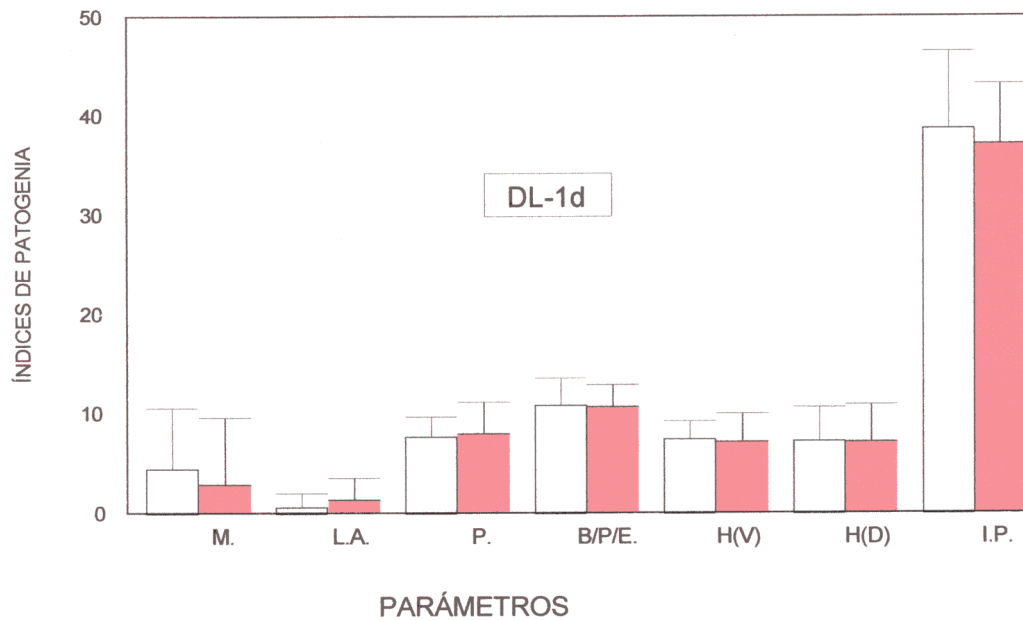
CONTROL		PARÁMETROS						
15 DÍAS	RATÓN	M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	I.P.
	1	20	4	4	6	0	0	34
	2	6	2	10	12	6	8	44
	3	0	0	10	12	10	4	36
	4	0	0	10	12	8	8	38
	5	0	0	4	12	8	6	30
	6	0	0	4	12	8	8	32
	7	0	0	8	10	8	6	32
	8	0	0	12	8	8	12	40
	9	0	6	10	12	8	12	48
	10	-	-	-	-	-	-	-
<b>MEDIA</b>	2,88	1,33	8,00	10,67	7,12	7,12	37,12	
<b>D.E.</b>	6,71	2,23	3,16	2,24	2,85	3,76	6,00	

b)

L-1i (100 mg/Kg ratón)		PARÁMETROS						
15 DÍAS	RATÓN	M.	L.A.	P.	B/P/E	H(V).	H(D).	I.P.
	1	14	4	4	4	4	2	32
	2	14	2	8	12	6	6	48
	3	6	0	10	12	8	8	44
	4	6	0	8	12	8	10	44
	5	0	0	6	10	8	4	28
	6	0	0	6	12	8	8	34
	7	0	0	8	10	6	4	28
	8	0	0	10	12	10	12	44
	9	0	0	8	12	8	10	38
	10	-	-	-	-	-	-	-
<b>MEDIA</b>	4,44	0,66	7,56	10,67	7,34	7,12	37,78	
<b>D.E.</b>	5,98	1,41	1,94	2,65	1,73	3,34	7,58	



**GRÁFICA 4.20.** Expresión de los valores medios asignados a las manifestaciones patológicas e índices de patogenia en ratones infectados con *T. vaginalis* y tratados por vía oral con L-1i.



El gráfico de barras representa la valoración de los parámetros en el grupo control (rojo) y la valoración de los parámetros en el grupo tratado con L-1i (blanco).

**Abreviaturas:** M. ; mortalidad. L.A. ; líq. ascítico. P. ; peritoneo. B/P/E. ; bazo/páncreas/estómago. H(V).; hígado región visceral. H(D). ; hígado región diafragmática. I. P. ; índice de patogenia. D.E. ; desviación estándar.

Finalmente, el test no paramétrico (U de Mann-Whitney), que permite señalar si los índices de patogenia del grupo control y tratado (L-1i) pertenecen a la misma población muestral, establece los siguientes resultados:

$U_{L-1i}$ (calculada de Mann-Whitney):	39,000
U (tabulada: 9,9,5%)	17,000
Nivel de significación:	$p < 0'01$

En este caso, si  $U_{L-1i} \geq U_{9,9,5\%}$ , se puede afirmar con un riesgo  $\alpha = 1\%$ , que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los índices de patogenia del lote control y el lote tratado (L-1i).

#### 4.4. PATOGENIA EXPERIMENTAL DE AISLAMIENTOS AUTÓCTONOS DE *T. vaginalis* EN EL MODELO MURINO.

En el estudio epidemiológico sobre prevalencia de la tricomonosis en la Comunidad de Madrid (1994-1996), realizado por nuestro Departamento, bajo la dirección de los Dres. Gómez Barrio y Escario García-Trevijano, en colaboración con los Centros de Promoción de la Salud del Ayuntamiento de Madrid, se realizaron 18 aislamientos. Teniendo en cuenta el número de muestras procesadas (1467), el índice de prevalencia resultante fue de un 1,23% (Rodríguez Gallego, 1995).

Posteriormente, se han llevado a cabo ensayos para determinar el índice de patogenicidad (a través del modelo experimental murino) de los 18 aislamientos de *T. vaginalis*,

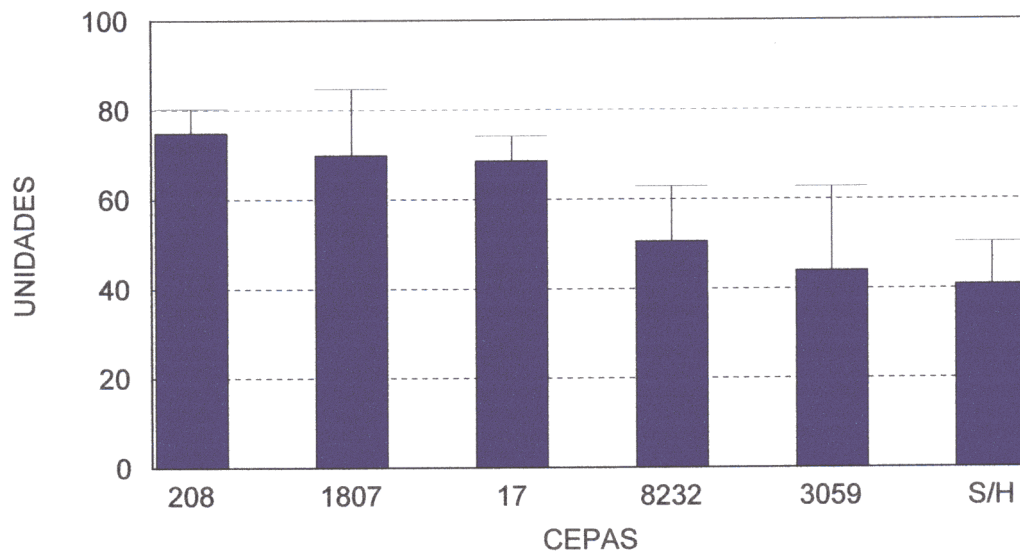
En función del índice de patogenicidad (Tabla 4.52) se han clasificado arbitrariamente en tres grupos:

- Cepas de alta patogenicidad (I.P.>40 unidades).
- Cepas de media patogenicidad (I.P.:20-40 unidades).
- Cepas de baja patogenicidad (I.P.<20 unidades).

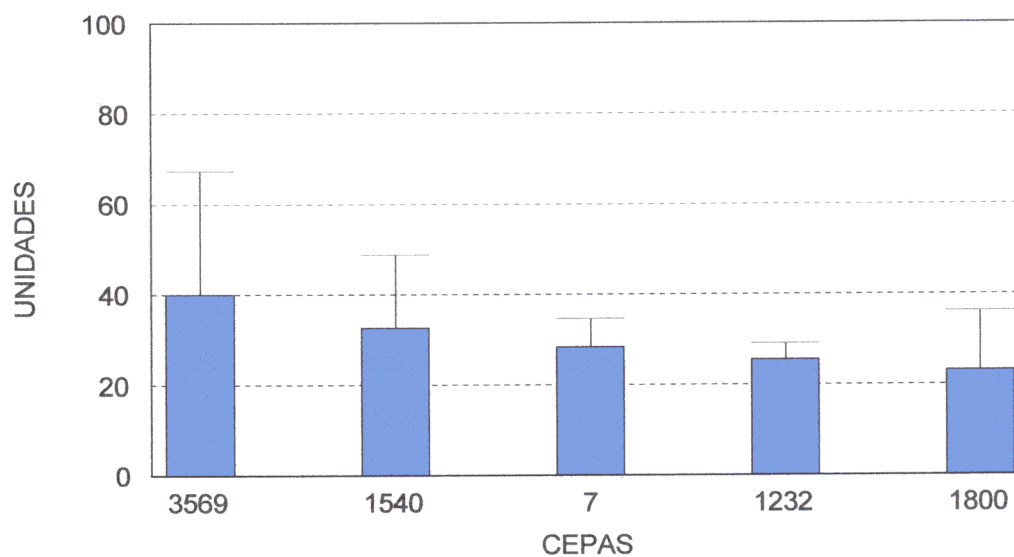
Por tanto, según esta clasificación, los 18 aislamientos de *T. vaginalis*, obtenidos en los Centros de Promoción de la Salud de Madrid, quedan agrupados tal como se representa en las gráficas 4.21 a 4.23.

La aplicación de técnicas multidimensionales, para la comparación entre los valores paramétricos de los distintos aislamientos, permite conocer las relaciones entre las variables del modelo experimental y la dispersión de las observaciones, poniendo en evidencia posibles agrupamientos (análisis estadístico de Componentes Principales). Una vez establecidos los grupos bien diferenciados, se procede a determinar la variable, o conjunto de variables, que mejor discriminen entre dichos grupos (análisis estadístico de Discriminantes).

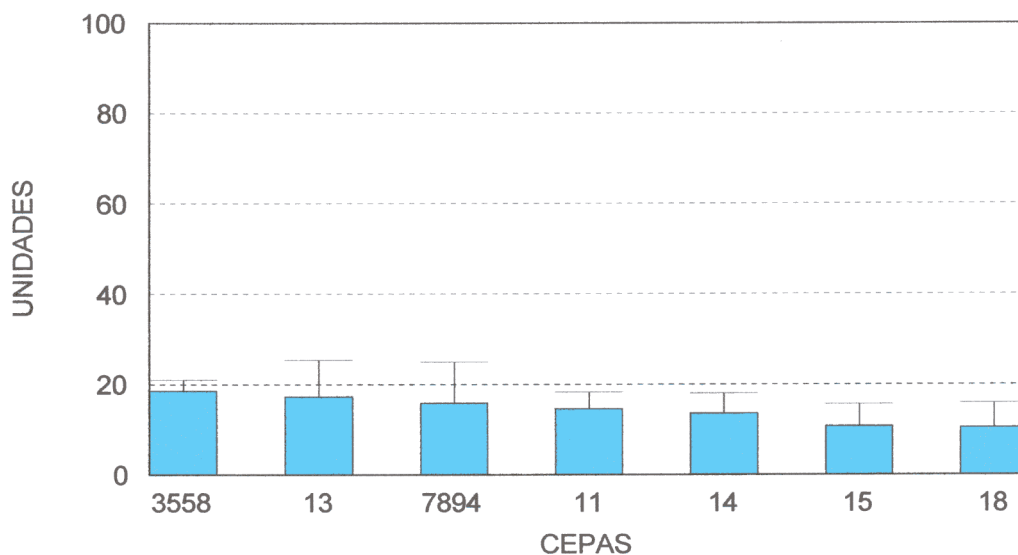
**GRÁFICA 4.21.** Patogenia experimental de los aislamientos de *T. vaginalis* considerados de patogenia alta en el modelo murino procedentes de la encuesta epidemiológica realizada en la Comunidad de Madrid.



**GRÁFICA 4.22.** Patogenia experimental de los aislamientos de *T. vaginalis* considerados de patogenia media.



**GRÁFICA 4.23.** Patogenia experimental de los aislamientos de *T. vaginalis* considerados de patogenia baja



El análisis estadístico requiere el tratamiento de los datos obtenidos en los ensayos de patogenia de cada una de las cepas, aunque el procesamiento matemático precise, únicamente, de los valores medios. A continuación se establece la tabla de valores de cada variable que permiten el cálculo estadístico multidimensional de Componentes Principales y Discriminantes (Tabla 4.53).

En el análisis de Componentes Principales, se han identificado como máximo 6 factores potenciales; los porcentajes de varianza explicados por cada uno de ellos vienen recogidos en la Tabla 4.54.1.

Posteriormente, se establece como criterio para la selección del número de factores a considerar, aquellos responsables de al menos el 75 % de la varianza observada; o la prueba gráfica de la pendiente de los valores propios de los factores (GRÁFICA 4.24).

TABLA 4.53. Valores medios de los parámetros, que definen el índice de patogenia.

CEPA	M	LA	P	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
208	37,40±4,42	1,80±1,47	10,00±0,00	12,00±0,00	7,80±1,98	5,80±3,04	74,80±5,51
1807	31,80±14,89	2,00±1,83	8,40±3,27	11,20±3,82	8,60±0,96	7,80±1,13	69,80±14,95
17	34,40±5,05	1,60±1,57	7,80±1,75	8,80±1,03	8,40±0,84	7,60±2,27	68,60±5,50
8232	12,20±11,90	2,60±1,64	9,60±1,26	10,20±2,57	8,40±2,63	7,60±3,09	50,60±12,18
3059	10,00±10,91	2,20±2,74	7,80±3,29	10,40±2,06	7,00±3,16	6,60±3,09	44,00±18,43
S/H	0,60±1,89	3,40±2,31	8,40±1,57	9,40±3,50	8,40±2,45	10,60±2,67	40,80±9,43
3569	11,00±14,30	2,60±2,11	5,80±3,93	9,00±2,70	6,40±2,95	5,20±3,29	40,00±27,57
1540	4,00±7,24	1,60±0,84	6,40±2,27	7,80±3,32	6,20±3,95	6,60±3,77	33,60±16,10
7	0,00±0,00	1,56±0,88	8,89±1,76	10,89±3,23	4,00±2,44	3,11±2,90	28,44±6,22
1232	0,00±0,00	0,22±0,63	6,67±3,58	7,33±2,67	7,33±1,68	4,00±1,57	25,56±7,49
1800	0,00±0,00	0,80±1,03	7,00±3,16	7,40±4,19	5,60±3,09	4,40±2,63	25,20±10,96
3558	0,00±0,00	0,00±0,00	5,80±1,34	6,20±0,63	2,80±1,39	4,20±0,63	17,60±4,59
13	2,60±8,22	0,00±0,00	3,60±1,57	5,00±1,41	4,00±0,00	2,00±0,00	17,20±8,22
7894	0,00±0,00	1,20±1,03	2,80±2,52	5,40±3,27	3,80±3,19	2,60±1,89	15,80±9,16
11	0,00±0,00	0,00±0,00	3,00±1,41	7,40±0,60	1,20±1,03	3,00±2,16	14,60±3,65
14	0,00±0,00	0,00±0,00	4,40±2,27	5,60±1,75	1,60±1,47	2,00±1,33	13,60±4,40
15	0,00±0,00	0,00±0,00	3,11±6,66	5,78±1,56	1,11±1,05	2,00±1,73	12,00±3,00
18	0,00±0,00	0,00±0,00	5,80±3,65	4,00±3,09	0,20±0,63	0,40±1,26	10,40±6,04

**ABREVIATURA:** M: Mortalidad. LA: Líquido ascítico.  
P: Peritoneo. B/P/E: Bazo/Páncreas/Estómago.  
H(V): Hígado visceral. H(D): Hígado diafragmático.  
IP: Índice de patogenia.

**TABLA 4.54.** Análisis de componentes principales aplicado al modelo de patogenicidad experimental de *T. vaginalis*.

1.- Varianza explicada por los distintos factores.

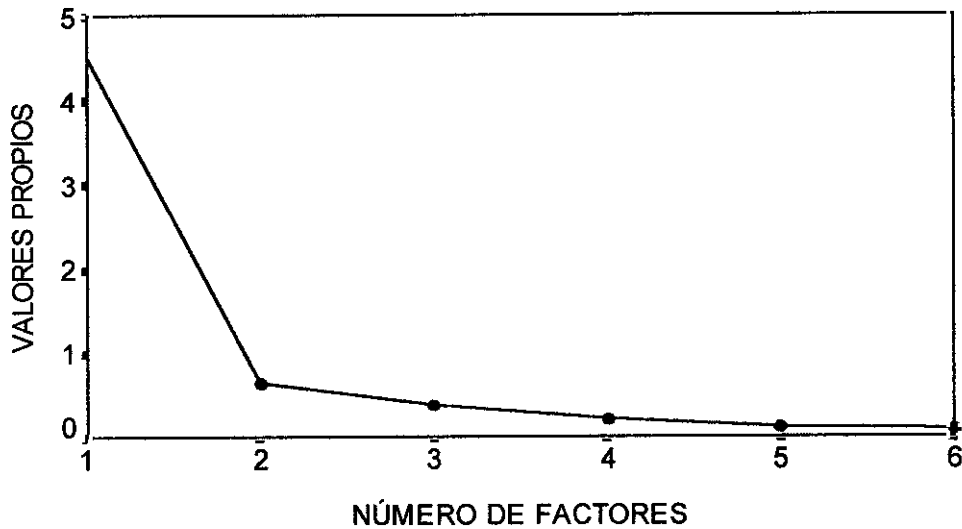
Variable	Factor	Valor propio	Porcentaje de varianza	Porcentaje acumulado
B/P/E	1	4,502	75,00	75,00
H(D)	2	0,655	10,99	86,00
H(V)	3	0,386	6,40	92,40
LA	4	0,229	3,80	96,20
M	5	0,121	2,00	98,20
P	6	0,105	1,80	100,00

2.- Correlación factores-variables (solución con un factor, o solución con dos factores, sin rotación)

Variable	Factor 1	Factor 2
B/P/E	0,905	0,100
H(D)	0,897	-0,273
H(V)	0,925	-0,069
LA	0,874	-0,358
M	0,708	0,657
P	0,868	0,076

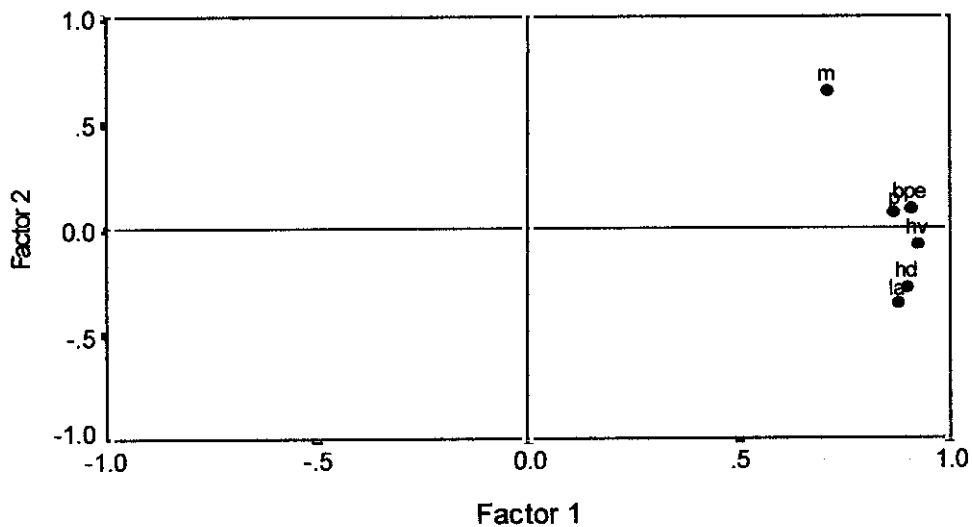
Según los cálculos realizados, es suficiente en principio con el primer factor para analizar de forma adecuada la población estudiada. Este factor que puede denominarse *lesiones* debido a su elevada correlación ( $\geq 87\%$ ) con todas las variables que representan lesiones, según se indica en la Tabla 4.54.2, permitiría diferenciar tres tipos de cepas según su índice patogenicidad en el modelo experimental.

**GRÁFICA 4.24.** Determinación del número de factores a extraer en el Análisis de Componentes Principales: prueba gráfica de los valores propios .



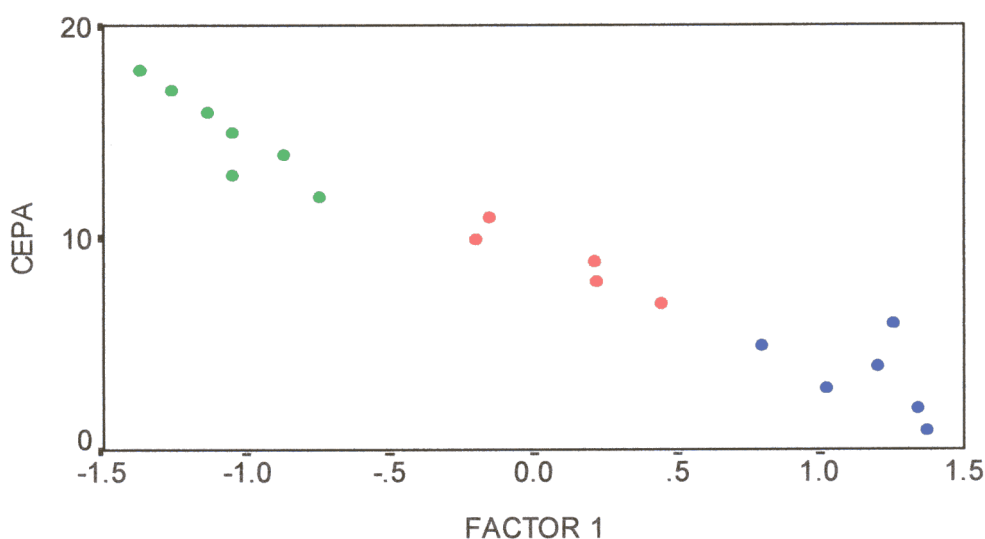
El segundo factor (que contribuye en la explicación del 10,9% de la varianza observada en la población), presenta una elevada correlación con la mortalidad ( $\geq 66\%$ ), como se recoge en la Tabla 4.53.2. La representación de las variables según los dos factores de variación más importantes permite explicar que el primer factor es debido, fundamentalmente, a las lesiones abdominales (factor *lesiones*) mientras que el segundo factor depende de la mortalidad (factor *mortalidad*), según aparece en la GRÁFICA 4.25.

**GRÁFICA 4.25.** Distribución de las variables en función de los factores de variación más importantes (Solución no rotada).



Representando la distribución de los aislamientos del estudio epidemiológico, en función del factor 1 (GRÁFICA 4.26), o bien de los factores 1 y 2 (GRÁFICA 4.27), se obtienen tres grupos netamente diferenciados, los correspondientes a las cepas de alta, media y baja patogenicia.

**GRÁFICA 4.26.** Análisis de Componentes Principales: distribución de los aislamientos en función de la patogenicia, considerando el factor 1 de variación (Solución no rotada).

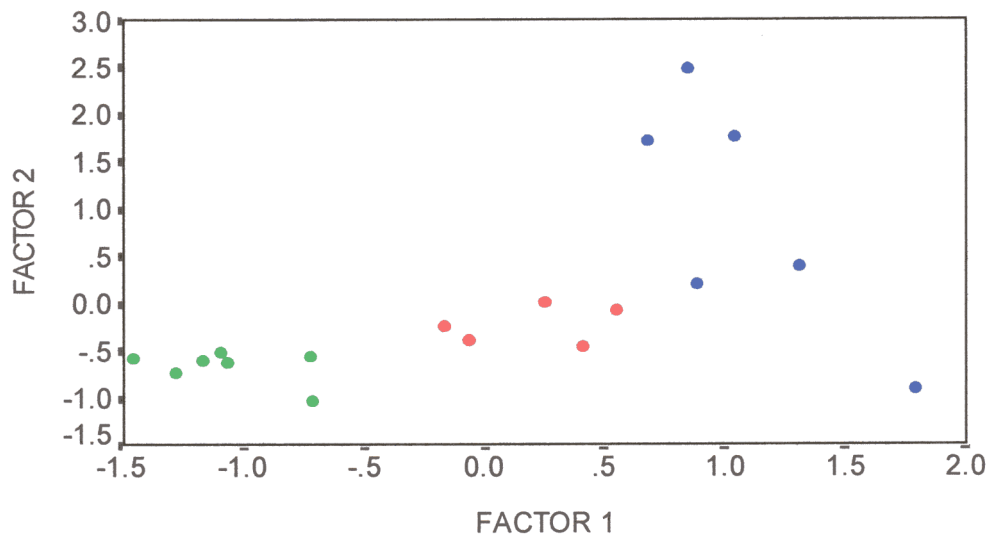


- S/H, 8232, 3059, 1807, 208, 17. Cepas de alta patogenicia.
- 3569, 1800, 1540, 1232, 7. Cepas de media patogenicia.
- 7894, 3558, 18, 15, 14, 13, 11. Cepas de baja patogenicia.

Considerando la existencia de tres grupos muestrales, se procede a la realización de un Análisis Discriminante. En dicho análisis se consideran como válidas todas las variables analizadas (las de lesiones y mortalidad); sin embargo y teniendo en cuenta la posibilidad de que no todas las variables pudieran tener la misma importancia en cuanto a la diferenciación de los grupos se refiere (posibilidad indicada por el resultado del Análisis de Componentes Principales), se sigue el método de selección gradual de variables. Los resultados vienen recogidos en la Tabla 4.55.



**GRÁFICA 4.27.** Análisis de Componentes Principales: distribución de los aislamientos en función de la patogenicidad, considerando los factores 1 y 2 de variación (Solución no rotada).



●	S/H, 8232, 3059, 1807, 208, 17.	Cepas de alta patogenicidad.
●	3569, 1800, 1540, 1232, 7.	Cepas de media patogenicidad.
●	7894, 3558, 18, 15, 14, 13, 11.	Cepas de baja patogenicidad.

**TABLA 4.55.** Resultados del análisis discriminante (muestras de alta, media y baja patogenicidad).

1. Número de muestras empleadas:

GRUPOS DE PATOGENIA	NÚMERO DE MUESTRAS
ALTA	6
MEDIA	5
BAJA	7
<b>TOTAL</b>	<b>18</b>

**TABLA 4.55.** Resultados del Análisis Discriminante (muestras de alta, media y baja patogenicia).

2.- Valores promedio de cada variable en cada grupo:

GRUPO	BPE	H(D)	H(V)	LA
ALTA	10,34 ± 1,16	7,67 ± 1,63	8,10 ± 0,60	2,26 ± 0,65
MEDIA	8,48 ± 1,50	4,66 ± 1,32	5,91 ± 1,23	1,35 ± 0,90
BAJA	5,57 ± 1,02	2,31 ± 1,16	2,11 ± 1,45	0,17 ± 0,45
<b>TOTAL</b>	<b>7,97 ± 2,39</b>	<b>4,75 ± 2,66</b>	<b>5,16 ± 2,88</b>	<b>1,12 ± 1,11</b>

GRUPO	M	P
ALTA	21,07 ± 15,36	8,66 ± 0,93
MEDIA	3,00 ± 4,80	6,95 ± 1,17
BAJA	0,37 ± 0,98	8,67 ± 1,29
<b>TOTAL</b>	<b>8,00 ± 12,91</b>	<b>6,40 ± 2,30</b>

3.- Procedimiento seguido en la selección gradual de variables:

Regla de selección: Minimización de la Lambda de Wilks.

Nivel de tolerancia mínimo.....0,001

Funciones discriminantes canónicas:

Número máximo de funciones.....2,000

Mínimo porcentaje de varianza acumulado.....100,000

Significación máxima de la Lambda de Wilks.....1,000

Probabilidad de cada grupo *a priori*.....0,333

4.- Funciones Canónicas Discriminantes:

Función	Valor propio	Porcentaje de varianza	Porcentaje acumulado	Correlación canónica
1	25,35	96,91	96,91	0,98
2	0,80	3,09	100,00	0,67

**TABLA 4.55.** Resultados del análisis discriminante (muestras de alta, media y baja patogenicia).

## 5.- Correlación entre las funciones discriminantes y las variables:

	H(V)	P	B/P/E	H(D)	LA	M
Función 1	0,48*	0,37*	0,37*	0,36*	0,29*	0,20
Función 2	-0,16	-0,11	-0,07	0,29	0,02	0,55*

\*Indica la mayor correlación absoluta entre cada variable y cada función discriminante.

## 6.- Coeficientes de las funciones discriminantes canónicas estandarizadas:

	H(V)	P	B/P/E	H(D)	LA	M
Función 1	0,71	0,72	0,44	0,34	0,22	0,21
Función 2	-0,81	-0,02	-0,42	0,86	0,11	1,06

## 7.- Resultado del proceso de clasificación realizado con el Análisis Discriminante (muestras de alta, media y baja patogenicia).

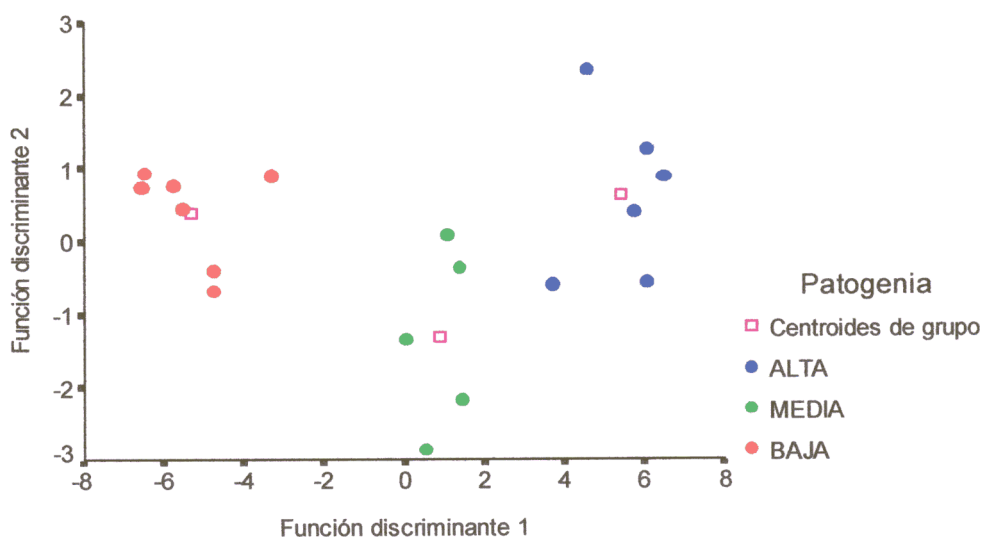
Grupo actual	Nº de casos	Grupo de patogenicia en el que son clasificados		
		Baja	Media	Alta
Alta	6	0,00 0,00 %	0,00 0,00 %	6,00 100,00 %
Media	5	0,00 0,00 %	5,00 100,00 %	0,00 0,00 %
Baja	7	7,00 100,00 %	0,00 0,00 %	0,00 0,00 %

Porcentaje de muestras correctamente clasificadas: 100,00 %.

En conclusión, a partir de las variables establecidas en el modelo experimental se puede diseñar una función canónica discriminante capaz de clasificar correctamente (100%) las cepas aisladas en función de la patogenicia.

La representación de las funciones canónicas discriminantes permite establecer un mapa territorial de distribución de los aislamientos en los grupos preestablecidos (cepas de alta, media y baja patogenicidad). A continuación se recoge en la GRÁFICA 4.28. dicha representación.

**GRÁFICA 4.28.** Mapa territorial obtenido en el Análisis Discriminante realizado con los aislamientos del estudio epidemiológico de la Comunidad de Madrid.



De otra parte, las variables que representan lesiones del modelo experimental presentan una elevada correlación positiva entre sí, mientras que estos coeficientes disminuyen cuando se comparan con la mortalidad, aunque el estadístico se mantenga positivo (Tabla 4.56).

**TABLA 4.56.** Correlaciones entre las distintas variables de las cepas de alta, media y baja patogenicidad.

Variable	B/P/E	H(D)	H(V)	LA	M
H(D)	0,71(p<0,0004)				
H(V)	0,75(p<0,0001)	0,87(p<0,0000)			
LA	0,76(p<0,0001)	0,84(p<0,0000)	0,78(p<0,0000)		
M	0,64(p<0,0020)	0,51(p<0,0160)	0,62(p<0,0028)	0,43(p<0,0385)	
P	0,82(p<0,0000)	0,68(p<0,0008)	0,75(p<0,0002)	0,68(p<0,0010)	0,57(p<0,0071)

#### 4.5. INMUNOMODULACIÓN POR EXTRACTOS VEGETALES DE LA RESPUESTA A LA INFECCIÓN INTRAPERITONEAL CON *T. vaginalis*.

##### 4.5.1. Valoración de la necropsia

##### 4.5.1.1. Efecto inmunomodulador del extracto *P. leucotomos*

##### 4.5.1.1.1. Selección de la dosis

Se ha realizado, en principio, en ratones NMRI, distribuidos en lotes de 10 animales, e infectados con *T. vaginalis* (día 0) según la metodología descrita en el apartado 3.2.2.2. de esta memoria. Las pautas de tratamiento con PAL ensayadas han sido las siguientes:

##### A) Preinfección

4 mg/Kg/día, los días -10 a 0 post-inoculación (p.i.).

20 mg/Kg/día, los días -10 a 0 post-inoculación.

##### B) Post-infección

20 mg/Kg/día, los días 3 a 7 p.i.

20 mg/Kg/día, los días 8 a 12 p.i.

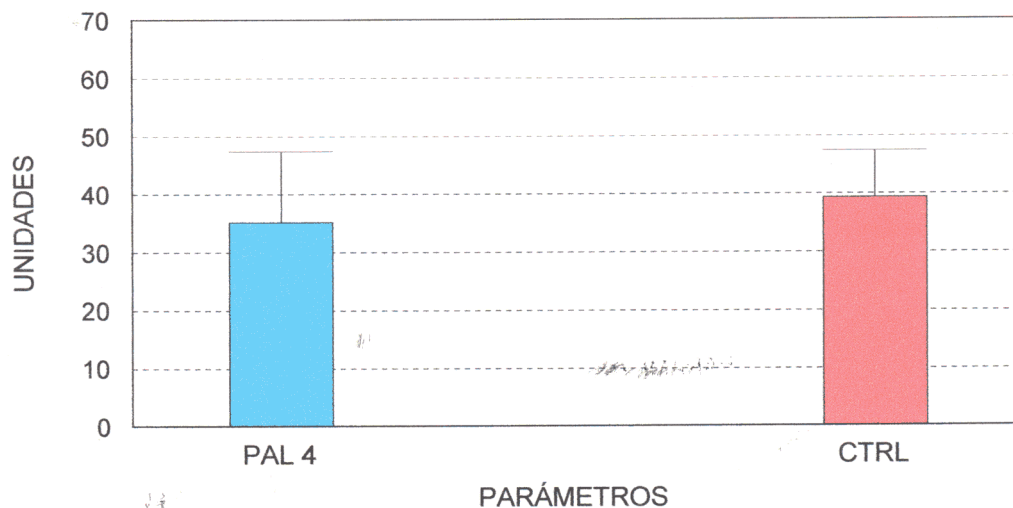
En cada una de las pruebas se dispuso del correspondiente lote de control de la infección, con el que se comparan los índices de patogenia de los lotes tratados mediante el test de la U de Mann-Whitney.

Una vez seleccionada la dosis de 20 mg/Kg/día, se pasa a comprobar su efecto en ratones BALB/c, incluyendo un lote adicional que recibe dosis de 40 mg/Kg/día en el mismo periodo de tratamiento.

En las pruebas consecutivas con fármacos de referencia se introducen lotes experimentales tratados con PAL que confirman dicha dosis y pauta de tratamiento.

**TABLA 4.57.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de PAL (4 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	0	0	6	12	6	8	32
	2	0	4	10	12	10	8	44
	3	0	0	8	12	8	6	34
	4	0	0	8	12	10	12	42
	5	0	0	6	12	4	4	26
	6	0	0	8	12	10	8	38
	7	14	2	8	12	4	2	42
	8	14	0	10	8	8	2	42
	9	14	2	8	10	8	12	54
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		4,67	0,89	8,00	11,33	7,56	6,89	39,33
D.E.		7,00	1,45	1,41	1,41	2,40	3,76	8,06
PAL 4		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	14	2	8	12	8	6	50
	2	6	2	8	12	8	12	48
	3	6	2	6	12	8	10	44
	4	6	2	6	12	8	10	44
	5	0	4	6	12	10	12	44
	6	0	0	4	6	6	4	20
	7	0	0	4	10	6	2	22
	8	0	0	6	10	8	6	30
	9	0	0	4	6	4	4	18
	10	0	0	8	12	6	6	32
MEDIA		3,20	1,20	6,00	10,40	7,20	7,20	35,20
D.E.		4,73	1,40	1,63	2,46	1,69	3,55	12,26

**GRÁFICO 4.29.** Índice de patogenia tratado con el extracto PAL (4 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*

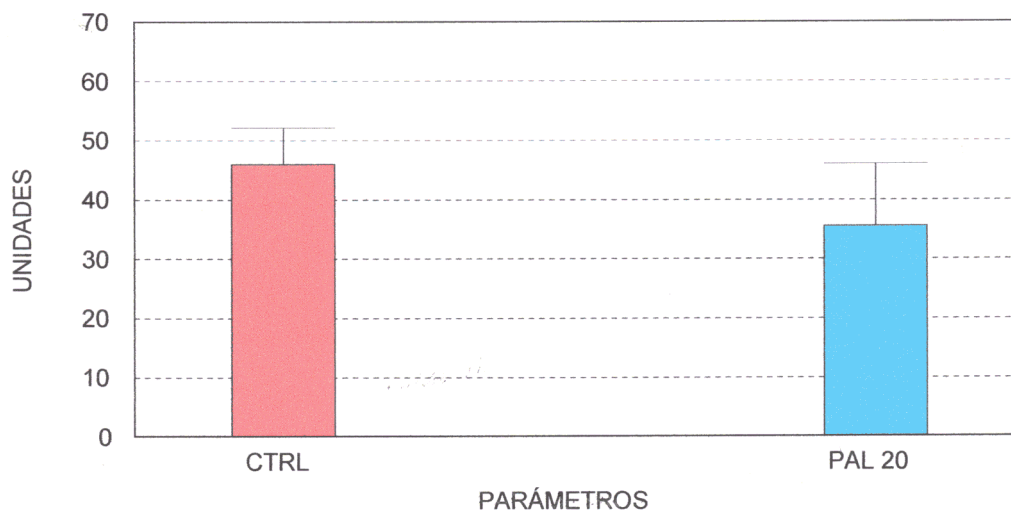
CEPA C1-NIH(10.000.000)

**TABLA 4.58.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de PAL (20 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL		M	L.A.	P.	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
RATÓN	1	26	4	10	4	4	2	50
	2	26	4	10	2	4	0	46
	3	14	2	10	12	8	8	54
	4	14	6	6	4	2	2	34
	5	14	6	10	12	6	4	52
	6	14	4	8	12	6	4	48
	7	6	0	10	12	8	8	44
	8	0	2	10	12	8	8	40
	9	0	4	10	12	10	10	46
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		12,67	3,56	9,33	9,11	6,22	5,11	46,00
D.E.		9,54	1,94	1,41	4,37	2,54	3,48	6,16

PAL 20		M	L.A.	P.	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
RATÓN	1	14	4	6	4	2	2	32
	2	14	4	10	10	6	4	48
	3	14	2	10	10	6	2	44
	4	14	4	10	12	6	2	48
	5	6	4	10	12	6	8	46
	6	0	2	4	8	8	6	28
	7	0	0	4	6	6	4	20
	8	0	0	10	10	8	8	36
	9	0	0	6	10	8	6	30
	10	0	0	10	6	4	4	24
MEDIA		6,20	2,00	8,00	8,80	6,00	4,60	35,60
D.E.		6,96	1,89	2,67	2,70	1,89	2,32	10,36

**GRÁFICO 4.30.** Índice de patogenia del lote tratado con el extracto PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.

CEPA C1-NIH(10.000.000/ratón)

**TABLA 4.59.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de PAL (4 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *t. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY	
	CONTROL	PAL
$\bar{x} \pm D.E.$		
CONTROL 39,33 $\pm$ 8,06	-	
PAL 4 mg/Kg/día 35,20 $\pm$ 12,26	41,0 (p>0,05)	-

**TABLA 4.60.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de PAL (20 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *t. vaginalis*.

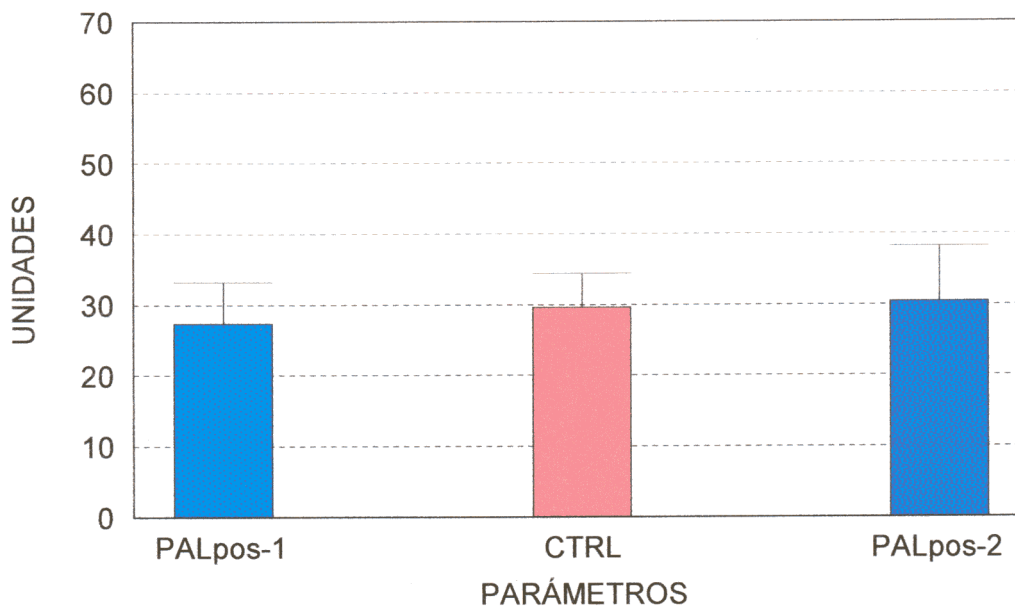
ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY	
	CONTROL	PAL
$\bar{x} \pm D.E.$		
CONTROL 46,00 $\pm$ 6,16	-	
PAL 20 mg/Kg/día 35,60 $\pm$ 10,36	23,5 (p<0,05)	-



**TABLA 4.60.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de PALpos 1 (días 3 a 7 p.i.) Y PALpos 2 (días 8 a 12 p.i.) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	14	0	4	12	6	4	40
2	0	0	6	12	8	6	32
3	0	0	4	10	6	4	24
4	0	0	4	10	8	4	26
5	0	0	6	8	6	6	26
6	0	0	8	8	8	6	30
7	0	0	4	12	8	6	30
8	0	0	4	10	6	6	26
9	0	0	4	10	8	6	28
10	0	0	10	8	8	8	34
MEDIA	1,40	0,00	5,40	10,00	7,20	5,60	29,60
D.E.	4,43	0,00	2,12	1,63	1,03	1,26	4,79
PALpos 1	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	0	4	8	4	8	24
2	0	0	4	12	6	6	28
3	0	0	4	12	8	10	34
4	0	0	6	12	8	6	32
5	0	0	8	12	10	6	36
6	0	0	2	8	4	10	24
7	0	0	4	6	6	4	20
8	0	0	4	6	8	2	20
9	0	0	6	8	8	2	24
10	14	0	8	4	2	4	32
MEDIA	1,40	0,00	5,00	8,80	6,40	5,80	27,40
D.E.	4,43	0,00	1,94	3,01	2,46	2,90	5,82
PALpos 2	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	6	0	2	12	10	8	38
2	0	0	8	10	10	8	36
3	0	0	4	12	8	8	32
4	0	0	6	12	6	2	26
5	0	0	2	8	8	6	24
6	0	0	4	6	6	8	24
7	0	0	2	10	4	4	20
8	0	0	6	10	8	6	30
9	6	0	6	8	4	4	28
10	6	0	10	12	10	8	46
MEDIA	1,80	0,00	5,00	10,00	7,40	6,20	30,40
D.E.	2,90	0,00	2,71	2,11	2,32	2,20	7,82

**GRÁFICO 4.31.** Índices de patogenia de los lotes experimentales PALpos 1 (días 3 a 7 p.i.) y PALpos 2 (días 8 a 12 p.i.) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.



CEPA C1-NIH(10.000.000/ratón)

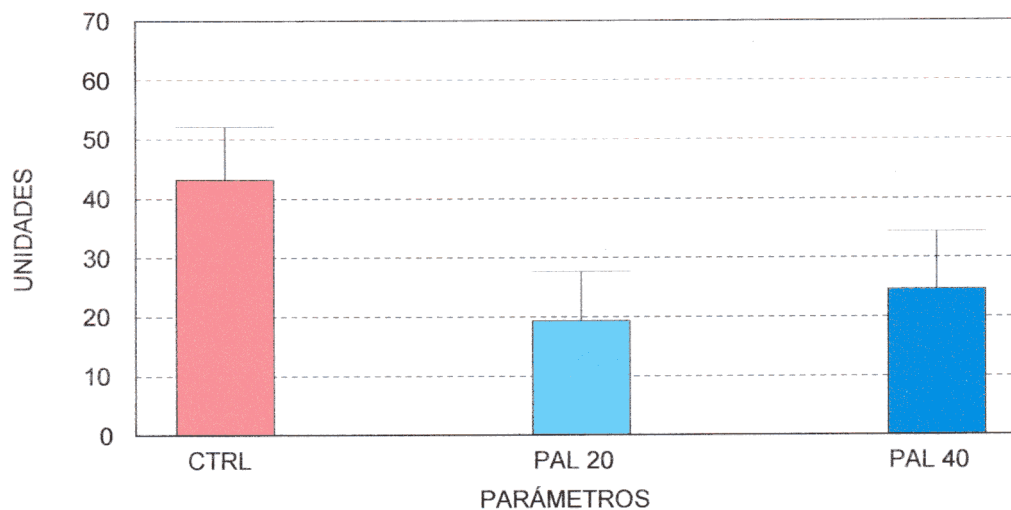
**TABLA 4.61.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de PALpos 1 (días 3 a 7 p.i.) Y PALpos 2 (días 8 a 12 p.i.) En el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	PALpos 1 20	PALpos 2 20
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 29,60 ± 4,79	-		
PALpos 1 27,40 ± 5,81	38,5 (p>0,05)	-	
PALpos 2 30,40 ± 7,82	49,5 (p>0,05)	39,0 (p>0,05)	-

**TABLA 4.62.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de PAL (20 mg/Kg/día) Y PAL (40 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* (RATÓN BALB/c).

CONTROL	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	2	8	10	8	8	36
2	6	0	10	8	6	6	36
3	6	2	10	12	10	12	52
4	6	4	10	12	10	4	46
5	6	2	10	12	10	10	50
6	6	2	8	12	10	12	50
7	6	4	10	12	10	12	54
8	0	0	4	4	10	10	28
9	0	4	8	12	10	12	46
10	0	0	8	8	10	8	34
MEDIA	3,60	2,00	8,60	10,20	9,40	9,40	43,20
D.E.	3,10	1,63	1,90	2,74	1,35	2,84	8,95
PAL 20	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	0	4	4	2	2	12
2	0	0	8	4	2	4	18
3	0	0	4	4	8	6	22
4	0	2	8	8	10	8	36
5	0	0	4	4	2	12	22
6	0	0	4	4	2	2	12
7	0	0	4	4	2	4	14
8	0	0	8	6	8	8	30
9	0	0	6	4	2	4	16
10	0	0	6	6	0	0	12
MEDIA	0,00	0,20	5,60	4,80	3,80	5,00	19,40
D.E.	0,00	0,63	1,84	1,40	3,46	3,56	8,22
PAL 40	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	0	8	8	6	8	30
2	0	0	6	8	6	4	24
3	0	4	8	4	2	8	26
4	0	2	4	4	2	4	16
5	0	0	4	4	2	4	14
6	0	0	10	12	10	12	44
7	0	0	4	4	2	4	14
8	0	0	6	6	8	8	28
9	0	0	6	4	2	4	16
10	0	2	8	10	8	6	34
MEDIA	0,00	0,80	6,40	6,40	4,80	6,20	24,60
D.E.	0,00	1,40	2,07	2,95	3,16	2,74	9,89

**GRÁFICO 4.32.** Índices de patogenia de los lotes experimentales PALpos 1 (días 3 a 7 p.i.) y PALpos 2 (días 8 a 12 p.i.) en el modelo experimental de *T. vaginalis* (BALB/c).



CEPA C1-NIH(10.000.000)

**TABLA 4.63.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de PAL (20 mg/Kg/día) Y PAL (40 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* (RATÓN BALB/c).

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	PALpre 20	PALpre 40
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 43,20 ± 8,95	-		
PALpre 20 19,40 ± 8,22	4,0 (p<0,01)	-	
PALpre 40 24,60 ± 9,89	7,0 (p<0,01)	32,5 (p>0,05)	-

#### 4.5.1.2. Eficacia comparada del extracto PAL con inmunomoduladores de referencia

Algunas de las experiencias cuyos resultados se recogen a continuación se han efectuado en paralelo a las indicadas en el apartado anterior, con el fin de poder utilizar el mismo control de infección; es por ello que los resultados de estos lotes no tratados coinciden exactamente con datos ya presentados.

Además, como en el caso anterior, las pruebas se efectuaron en ratones NMRI (10 animales/lote), recurriendo a BALB/c cuando hubo disponibilidad.

##### 4.5.1.2.1. Inmunosupresores: Ciclofosfamida, azatioprina y tacrólimo (FK-506)

Para la observación del comportamiento de los inmunosupresores en el método experimental de *T. vaginalis* se han ensayado ciclofosfamida, azatioprina y tacrólimo (FK-506).

En el grupo experimental tratado con ciclofosfamida, los ratones NMRI infectados reciben una única dosis del inmunosupresor por vía intraperitoneal de 100 mg/Kg.

Tras el periodo de observación y necropsia se concluye que los índices de patogenia (I. P.) de los grupos CTRL- $39,30 \pm 8,06$ - y ciclofosfamida (CPA)  $-28,89 \pm 6,50$ - presentan diferencias estadísticamente significativas según la prueba U de Mann-Whitney.

Confirmando que el tratamiento inmunosupresor con ciclofosfamida parece producir una disminución de la mortalidad y las lesiones abdominales en los ratones infectados intraperitonealmente por *T. vaginalis*.

Por otra parte, se ha tratado un lote de ratones NMRI infectados por *T. vaginalis* con una dosis intraperitoneal de 100 mg/Kg de azatioprina y otro lote con el tratamiento de PAL preinfección de 10 días a razón de 20 mg/Kg/día.

En dicho ensayo, los I. P. de los grupos PAL (20 mg/Kg/día)  $-35,60 \pm 10,30-$  y azatioprina (100 mg/Kg/1día)  $-37,00 \pm 7,61-$  presentan índices de patogenia que difieren significativamente del I.P. del control  $-46,20 \pm 5,69-$ , no existiendo diferencias significativas entre ellos. De nuevo, el tratamiento con un inmunosupresor como azatioprina reduce la mortalidad y las lesiones intraperitoneales de los ratones infectados por *T. vaginalis*.

Con la intención de obtener un nuevo enfoque, que contribuya a comprender la secuencia de reacciones inmunitarias desencadenadas tras la infección experimental de *T. vaginalis*, se ha utilizado un inmunosupresor de trasplantes (FK-506).

El fármaco de trasplantes actúa suprimiendo las respuestas inmunitarias, tanto a nivel humoral como las mediadas por células. Este inmunosupresor impide la activación de los linfocitos T en respuesta a estímulos mitogénicos o antigénicos. Siendo 100 veces más potente que la ciclosporina en inhibir selectivamente la secreción de diversos tipos de citocinas (IL-2, IL-3, IL-4, IL-6, IFN- $\gamma$ ). También es capaz de inhibir la activación de linfocitos B inducida por anticuerpos pero no la inducida por componentes bacterianos. Asimismo previene la generación de linfocitos citotóxicos.

En el modelo de patogenia experimental los ratones BALB/c reciben por vía oral, con sonda buco-gástrica, una dosis de 10 mg/Kg/día durante 10 días de FK-506, procurando la administración en estado de ayunas, para lo cual se les retiró el alimento al menos 12 horas antes.

En cuanto a los resultados, los I. P. del grupo CTRL  $-53,14 \pm 16,80-$  y FK-506  $-38,00 \pm 13,82-$  presentan diferencias significativas, según el estadístico de la U de Mann-Whitney.

**TABLA 4.64.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de ciclofosfamida (100 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	0	6	12	6	8	32
2	0	4	10	12	10	8	44
3	0	0	8	12	8	6	34
4	0	0	8	12	10	12	42
5	0	0	6	12	4	4	26
6	0	0	8	12	10	8	38
7	14	2	8	12	4	2	42
8	14	0	10	8	8	2	42
9	14	2	8	10	8	12	54
10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA	4,67	0,89	8,00	11,33	7,56	6,89	39,33
D.E.	7,00	1,45	1,41	1,41	2,40	3,76	8,06
CPA	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	0	4	8	8	8	28
2	0	0	4	10	10	4	28
3	0	0	4	10	8	6	28
4	0	0	4	8	6	2	20
5	0	0	8	12	8	6	34
6	0	0	4	6	6	6	22
7	0	4	10	8	8	8	38
8	0	0	4	8	6	6	24
9	0	0	10	10	8	10	38
10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA	0,00	0,44	5,78	8,89	7,56	6,22	28,89
D.E.	0,00	1,33	2,73	1,76	1,33	2,33	6,57

**TABLA 4.65.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de ciclofosfamida (100 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY	
	CONTROL	CICLOFOSFAMIDA
$\bar{x} \pm D.E.$		
CONTROL 39,33 $\pm$ 8,06	-	
CICLOFOSFAMIDA 28,89 $\pm$ 6,56	12,5 (p<0,05)	-

**TABLA 4.66.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de azatioprina (100 mg/kg/día) y pal (20 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL		M	L.A.	P.	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
RATÓN	1	26	4	10	4	4	2	50
	2	26	4	10	2	4	0	46
	3	14	2	10	12	8	8	54
	4	14	6	6	4	2	2	34
	5	14	6	10	12	6	4	52
	6	14	4	8	12	6	4	48
	7	6	0	10	12	8	8	44
	8	0	2	10	12	8	8	40
	9	0	4	10	12	10	10	46
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		12,67	3,56	9,33	9,11	6,22	5,11	46,00
D.E.		9,54	1,94	1,41	4,37	2,54	3,48	6,16

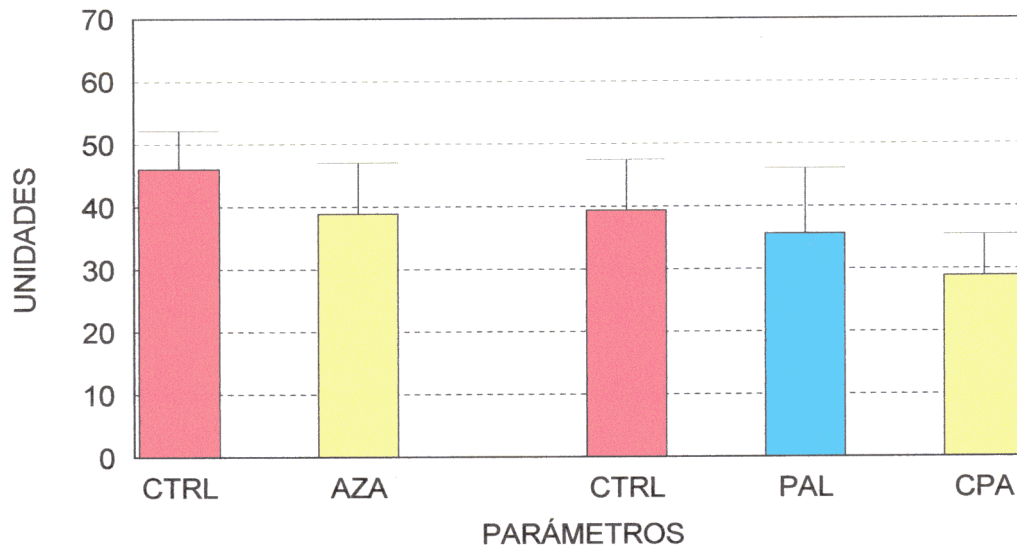
AZA		M	L.A.	P.	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
RATÓN	1	0	2	4	10	6	10	32
	2	32	4	4	0	2	4	46
	3	26	4	10	4	2	0	46
	4	14	4	8	8	4	2	40
	5	6	4	8	12	8	12	50
	6	6	2	10	12	6	6	42
	7	6	2	10	12	6	8	44
	8	0	6	12	10	6	8	42
	9	0	2	8	10	8	8	36
	10	0	2	6	10	8	12	38
	11	0	0	4	6	6	12	28
	12	0	0	4	4	6	8	22
MEDIA		7,50	2,67	7,33	8,17	5,67	7,50	38,83
D.E.		10,99	1,78	2,87	3,86	2,06	3,92	8,16

PAL 20		M	L.A.	P.	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
RATÓN	1	14	4	6	4	2	2	32
	2	14	4	10	10	6	4	48
	3	14	2	10	10	6	2	44
	4	14	4	10	12	6	2	48
	5	6	4	10	12	6	8	46
	6	0	2	4	8	8	6	28
	7	0	0	4	6	6	4	20
	8	0	0	10	10	8	8	36
	9	0	0	6	10	8	6	30
	10	0	0	10	6	4	4	24
MEDIA		6,20	2,00	8,00	8,80	6,00	4,60	35,60
D.E.		6,96	1,89	2,67	2,70	1,89	2,32	10,36



**GRÁFICO 4.33.** Índices de patogenia de los lotes experimentales AZA y CPA (100 mg/Kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.



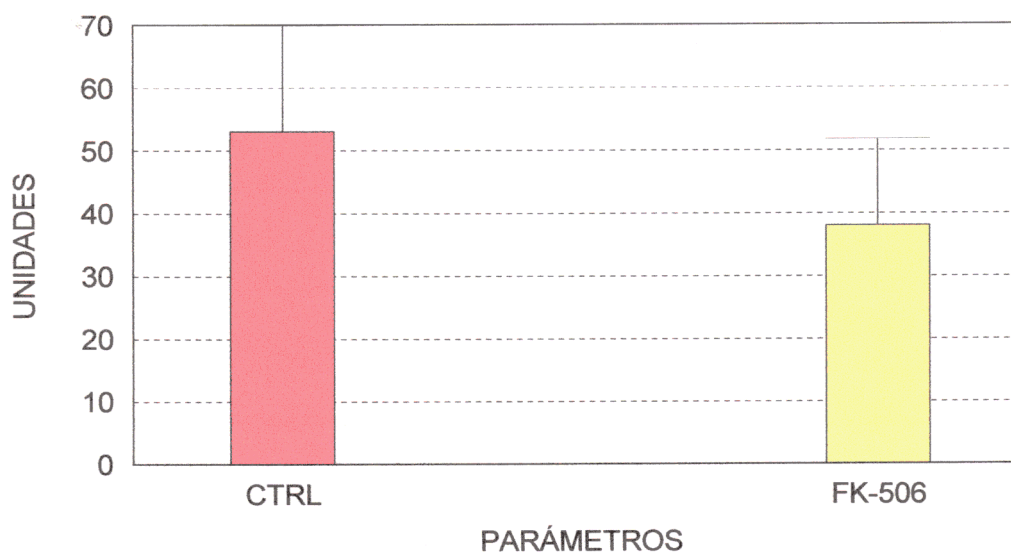
CEPA C1-NIH(10.000.000)

**TABLA 4.67.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de AZA y CPA (100 mg/Kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	AZATIOPRINA	PALpre 20
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 46,00 ± 6,16	-		
AZATIOPRINA 38,83 ± 8,15	33,5 (p>0,05)	-	
PALpre 20 mg/Kg 35,60 ± 10,36	23,5 (p<0,05)	51,0 (p>0,05)	-

**TABLA 4.68.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de tacrólimo (FK-506) (10 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* (RATÓN BALB/c).

CONTROL		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	32	4	10	10	8	8	72
	2	32	2	8	10	6	10	68
	3	26	4	10	12	6	10	68
	4	14	2	10	12	8	10	56
	5	0	0	8	12	8	6	34
	6	0	0	8	12	8	8	36
	7	0	0	8	12	6	12	38
	8	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		14,86	1,71	8,86	11,43	7,14	9,14	53,14
D.E.		15,14	1,80	1,07	0,98	1,07	1,95	16,81
FK-506		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D)	I.P.
RATÓN	1	26	4	8	10	6	10	64
	2	20	0	8	12	10	10	60
	3	0	0	6	6	8	12	32
	4	0	0	6	10	8	10	34
	5	0	0	6	10	6	6	28
	6	0	0	8	8	8	10	34
	7	0	0	6	8	8	10	32
	8	0	0	6	12	6	6	30
	9	0	0	4	10	4	10	28
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		5,11	0,44	6,44	9,56	7,11	9,33	38,00
D.E.		10,25	1,33	1,33	1,94	1,76	2,00	13,82

**GRÁFICO 4.34.** Índice de patogenia del lote experimental FK-506 (10 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis* (Ratón BALB/c).

**TABLA 4.69.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de FK-506 (10 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* (RATONES BALB/c).

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY	
	CONTROL	FK-506
$\bar{x} \pm D.E.$		
CONTROL 53,14 ± 16,80	-	
FK-506 38,00 ± 13,82	9,0 (p<0,05)	-

4.5.1.2.2. Inmunoestimulantes: Inmunofeón y timoestimulina

Tras el comportamiento del modelo experimental de patogenia en presencia de inmunosupresores, se han introducido en el sistema dos agentes inmunoestimulantes como son inmunofeón y timoestimulina.

Así, se ha observado que los ratones NMRI infectados por *T. vaginalis* y tratados con inmunofeón a razón de 13 mg/Kg/día por vía intraperitoneal (i. p.) durante 10 días presentan un incremento sustancial en la mortalidad y lesiones abdominales respecto a los ratones control.

Según el baremo, el I. P. del lote tratado con inmunofeón  $-53,80 \pm 6,82$ - presentan diferencias estadísticamente significativas respecto al control  $-47,11 \pm 1,45$ -.

Posteriormente, se ensaya en ratones NMRI infectados un tratamiento de timoestimulina en una dosis de 24 mg/Kg/día con una pauta de infección de 5 días y la habitual del extracto PAL (20 mg/Kg/día) durante los 10 días previos a la infección.

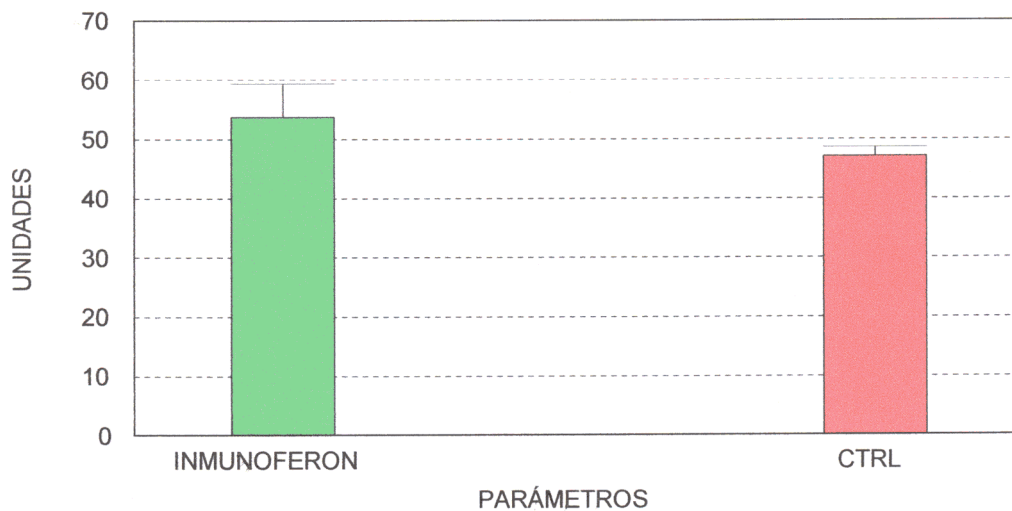
Los I. P. de los grupos CTRL  $-43,60 \pm 5,79$ - y TP-1  $-47,75 \pm 4,20$ - no presentan diferencias significativas. Sin embargo, el grupo PAL  $-34,60 \pm 3,65$ - difiere significativamente de los I. P. de los grupos anteriores.

Finalmente, se ha evaluado en ratones BALB/c, siguiendo el modelo experimental antecedente, el efecto de un tratamiento de timoestimulina (24 mg/Kg/día) durante 5 días. Los resultados indican que el I. P. de los grupos PAL  $-20,00 \pm 9,66$ - difiere muy significativamente del I. P. del control  $-43,20 \pm 8,90$ - y del TP-1  $-35,60 \pm 8,15$ -. Asimismo, los I. P. de los grupos TP-1 y control no presentan diferencias significativas.

En ambos casos, por tanto, la timoestimulina no presenta un efecto aparente en la mortalidad y las lesiones de los ratones infectados por *T. vaginalis*. Por contra, PAL mantiene su eficacia en la disminución de los I. P. del lote tratado respecto al control.

**TABLA 4.70.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de inmunoferón (1,30 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL		M.	L.A.	P.	B/P/E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	32	2	6	4	2	4	50
	2	14	6	8	8	6	6	48
	3	14	6	8	6	6	6	46
	4	6	0	6	12	10	12	46
	5	6	2	8	12	10	8	46
	6	6	4	10	10	8	10	48
	7	0	4	10	12	10	12	48
	8	0	2	10	12	10	12	46
	9	0	2	10	12	10	12	46
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		8,67	3,11	8,44	9,78	8,00	9,11	47,11
D.E.		10,30	2,02	1,67	3,07	2,83	3,18	1,45
Inmunoferón		M	L.A.	P.	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P
RATÓN	1	32	0	8	8	6	4	58
	2	32	0	10	10	6	4	62
	3	26	0	10	12	8	4	60
	4	26	0	10	12	6	6	60
	5	26	0	6	8	6	4	50
	6	20	2	10	12	6	8	58
	7	20	4	6	6	8	6	50
	8	20	2	6	10	8	8	54
	9	14	0	8	10	8	6	46
	10	8	2	6	8	8	8	40
MEDIA		22,40	1,00	8,00	9,60	7,00	5,80	53,80
D.E.		6,00	1,45	1,86	2,11	1,05	1,67	5,57

**GRÁFICO 4.35.** Índice de patogenia del lote experimental Inmunoferón (1,30 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.

CEPA C1-NIH(10.000.000/ratón)

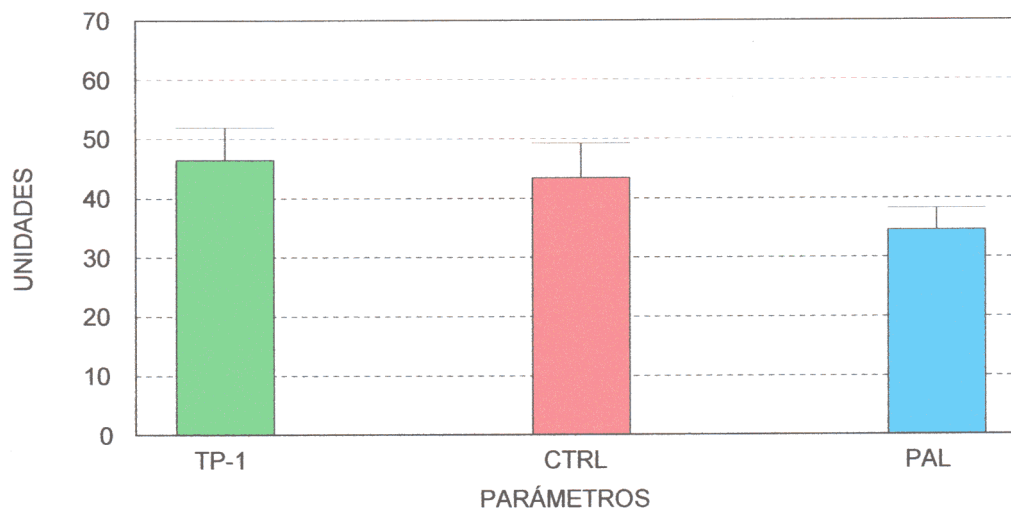
**TABLA 4.71.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de inmunoferón (1,30 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY	
	CONTROL	INMUNOFERÓN
$\bar{x} \pm D.E.$		
CONTROL 47,11 $\pm$ 1,45	-	
INMUNOFERÓN 53,80 $\pm$ 5,57	16,5 (p<0,05)	-

**TABLA 4.72.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de timoestimulina (24 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL	M	LA.	P.	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
RATÓN							
1	14	2	8	6	4	4	38
2	14	4	10	12	8	10	58
3	14	2	6	8	8	6	44
4	6	6	6	8	8	12	46
5	6	0	8	10	8	8	40
6	6	0	10	12	8	8	44
7	0	0	10	12	10	8	40
8	0	4	8	12	10	10	44
9	0	2	10	10	8	8	38
10	0	0	10	12	10	10	42
MEDIA	6,00	2,00	8,60	10,20	8,20	8,40	43,40
D.E.	6,11	2,11	1,65	2,20	1,75	2,27	5,82
TP-1	M	LA.	P.	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
RATÓN							
1	14	0	10	10	8	12	54
2	6	0	10	12	10	10	48
3	6	2	8	12	8	8	44
4	6	0	10	12	10	12	50
5	6	0	10	12	10	10	48
6	6	0	10	12	10	10	48
7	6	2	8	12	10	12	50
8	0	4	8	8	8	8	36
9	0	0	6	12	10	12	40
10							
MEDIA	5,56	0,89	8,89	11,33	9,33	10,44	46,44
D.E.	4,10	1,45	1,45	1,41	1,00	1,67	5,55
PAL 20	M	LA.	P.	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.
RATÓN							
1	14	0	6	2	2	4	28
2	6	0	8	8	6	6	34
3	6	0	8	8	6	6	34
4	6	0	8	10	4	6	34
5	6	0	10	8	4	6	34
6	6	0	6	10	10	6	38
7	6	0	10	10	8	8	42
8	0	0	8	12	10	6	36
9	0	0	6	10	8	8	32
10	0	0	8	10	8	8	34
MEDIA	5,00	0,00	7,80	8,80	6,60	6,40	34,60
D.E.	4,24	0,00	1,48	2,70	2,67	1,26	3,66

**GRÁFICO 4.36.** Índice de patogenia del lote experimental timoestimulina TP-1 (24 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.



CEPA C1-NIH(10.000.000)

**TABLA 4.73.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de timoestimulina (24 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

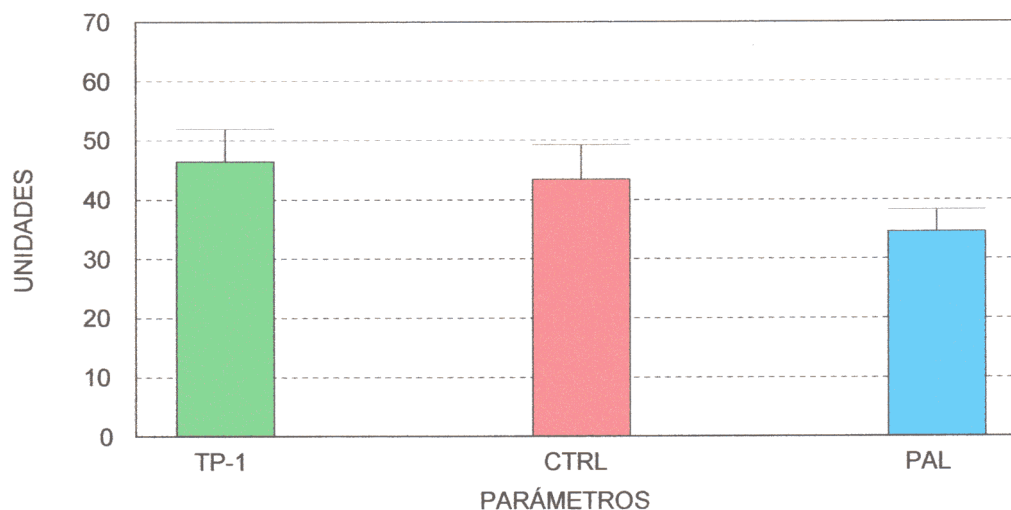
ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	TP-1	PALpre
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 43,40 ± 5,82	-		
TP-1 46,44 ± 5,55	26,5 (p>0,05)	-	
PALpre (20 mg/Kg) 34,60 ± 3,66	5,5 (p<0,01)	3,5 (p<0,01)	-



**TABLA 4.74.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de timoestimulina (24 mg/kg/día) y pal (20 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* (RATÓN BALB/c).

CONTROL	M.	LA.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.	
RATÓN	1	0	2	8	10	8	8	36
	2	6	0	10	8	6	6	36
	3	6	2	10	12	10	12	52
	4	6	4	10	12	10	4	46
	5	6	2	10	12	10	10	50
	6	6	2	8	12	10	12	50
	7	6	4	10	12	10	12	54
	8	0	0	4	10	10	10	28
	9	0	4	8	12	10	12	46
	10	0	0	8	8	10	8	34
MEDIA	3,60	2,00	8,60	10,20	9,40	9,40	43,20	
D.E.	3,10	1,63	1,90	2,74	1,35	2,84	8,95	
TP-1	M	LA.	P.	B/P/E.	H(V).	H(D).	I.P.	
RATÓN	1	0	0	6	10	10	8	34
	2	0	0	6	8	4	6	24
	3	6	4	10	12	10	10	52
	4	0	0	8	8	10	8	34
	5	0	2	10	6	2	4	24
	6	0	2	10	10	10	10	42
	7	0	0	10	10	10	8	38
	8	0	2	8	12	10	4	36
	9	0	0	10	12	10	6	38
	10	0	0	8	8	10	8	34
MEDIA	0,60	1,00	8,60	9,60	8,60	7,20	35,60	
D.E.	1,90	1,41	1,65	2,07	2,99	2,15	8,15	
PAL 20	M.	LA.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.	
RATÓN	1	0	0	4	4	2	2	12
	2	0	0	8	4	2	4	18
	3	0	0	4	4	8	6	22
	4	0	2	8	8	10	8	36
	5	0	0	4	4	2	12	22
	6	0	0	4	4	2	2	12
	7	0	0	4	4	2	4	14
	8	0	0	8	6	8	8	30
	9	0	0	6	4	2	4	16
	10	0	0	6	6	0	0	12
MEDIA	0,00	0,20	5,60	4,80	3,80	5,00	19,40	
D.E.	0,00	0,63	1,84	1,40	3,46	3,56	8,22	

**GRÁFICO 4.37.** Índice de patogenia del lote experimental timoestimulina TP-1 (24 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis* (Ratón BALB/c).



CEPA C1-NIH(10.000.000)

**TABLA 4.75.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de timoestimulina (24 mg/kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	TP-1	PALpre
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 43,20 $\pm$ 8,95	-		
TP-1 35,60 $\pm$ 8,15	28,0 (p>0,05)	-	
PALpre 20 19,40 $\pm$ 8,22	4,0 (p<0,01)	7,5 (p<0,01)	-

#### 4.5.1.2.3. Antiinflamatorios no esteroideos: Piroxicam y Metamizol

En orden a identificar la naturaleza e las lesiones abdominales, fundamentalmente presentes en el hígado, bazo, estómago y páncreas, se han introducido en el modelo de patogenia experimental dos antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) como piroxicam y metamizol.

En la primera experiencia con AINEs se introduce un tratamiento de piroxicam por vía oral, con sonda bucofaríngea, a razón de 10 mg/Kg/día en un periodo de 10 días. Incorporando, además, un lote tratado con PAL por vía intraperitoneal en la concentración habitual de 20 mg/Kg/día durante los 10 días previos a la infección.

El I. P. del grupo CTRL  $-25,11 \pm 2,84$ - presenta diferencias significativas respecto a los índices de patogenia de los lotes PAL  $-19,56 \pm 10,95$ - y piroxicam  $-21,60 \pm 2,63$ -, sin embargo, no existen diferencias significativas entre los I. P. de los dos últimos lotes entre sí.

FELDENE® (piroxicam) que tiene propiedades analgésicas y antipiréticas. También actúa en diversos puntos de la respuesta inflamatoria e inmunitaria como la inhibición de la síntesis de prostanoideos, incluidas prostaglandinas, por inhibición reversible de la enzima ciclooxigenasa., inhibición de la agregación neutrofílica e inhibición de la migración de polimorfonucleares y monocitos de la zona inflamada.

El efecto del antiinflamatorio repercute en las lesiones provocadas en la tricomonosis experimental, así los ratones tratados con piroxicam muestra un descenso significativo en la valoración media de las lesiones abdominales. Por su parte, el extracto PAL sigue presentando, no obstante, un efecto inmunomodulador más aparente sobre el conjunto de las lesiones en su lote.

En la segunda experiencia con AINEs, se han establecido tres lotes de ratones BALB/c, uno de ellos recibe el tratamiento habitual de PAL (20 mg/Kg/día), el otro recibe un tratamiento de metamizol (274,87 mg/Kg/día) ambos por vía intraperitoneal durante los 10 días previos a la infección y el tercero que no recibe tratamiento (grupo control).

El I. P. de los grupos PAL  $-40,80 \pm 5,09-$  y metamizol  $-48,20 \pm 9,13-$  difieren muy significativamente del grupo CTRL  $-56,60 \pm 9,93-$ ; aunque no entre sí.

Al contrastado efecto del extracto natural PAL, se une la disminución en el I.P. del lote tratado con metamizol, probablemente debido al mecanismo inhibidor de la ciclooxigenasa, que repercute en la producción de prostaglandinas, disminución de la IL-4, IL-6, aumento de la IL-10 (citocina antiinflamatoria) y descenso de la infiltración leucocitaria, hipersensibilidad tardía, y neutrofilia.

Nótese que la cepa de ratón es BALB/c, que presenta mayor susceptibilidad a la infección experimental por *Trichomonas vaginalis*, lo que palia el efecto inmunomodulador observable tras el tratamiento del extracto vegetal PAL.

La dosis que se ha ensayado de metamizol pertenece a una comunicación oral, en el XXXII Congreso de la Sociedad Europea de Investigación Quirúrgica en Corfú (Grecia), de García-Álvarez *et al.* (1997) que analiza *los tratamientos inmunomoduladores de Metamizol y SAMet en sepsis quirúrgicas en ratas*. Nuestra pretensión última en la experiencia desarrollada es poner de manifiesto la capacidad inmunomoduladora de metamizol en el modelo experimental de *Trichomonas vaginalis* para verificar la bondad de dicho modelo en el estudio de agentes que modifican la respuesta inmunitaria.

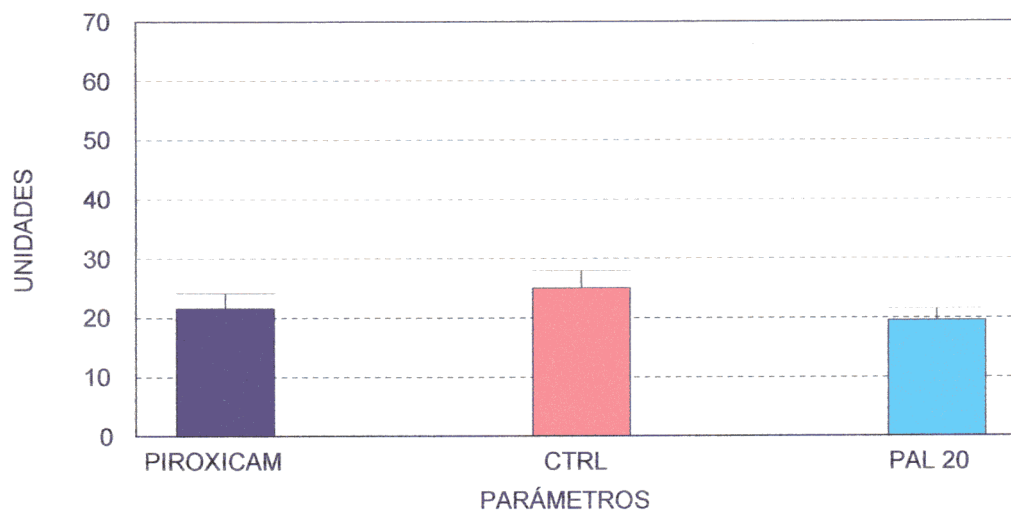
En la tercera experiencia, nuevamente en ratones NMRI, se ha evaluado el efecto sinérgico de PAL (20 mg/Kg/día) + metamizol (274,87 mg/Kg/día) en un tratamiento i. p. previo a la infección por *T. vaginalis* de 10 días. En la necropsia, el I.P. de los grupos experimentales control  $-55,50 \pm 9,30-$  y PAL+metamizol  $-49,60 \pm 15,04-$  no presentan diferencias estadísticamente significativas. Considerando la capacidad individual de cada

producto para disminuir las lesiones de tipo inflamatorio, parece contradictorio que la administración conjunta carezca de efectos sinérgicos.

**TABLA 4.76.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de piroxicam (10 mg/Kg/día) Y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	0	0	6	12	4	8	30
	2	0	0	6	8	4	8	26
	3	0	0	6	6	4	8	24
	4	0	0	6	6	4	4	20
	5	0	0	6	8	4	8	26
	6	0	0	8	6	4	10	28
	7	0	0	8	6	4	6	24
	8	0	0	6	6	4	8	24
	9	0	0	6	6	4	8	24
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		0,00	0,00	6,44	7,11	4,00	7,56	25,11
D.E.		0,00	0,00	0,88	2,03	0,00	1,67	2,85
PIROXICAM		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	0	2	6	10	2	4	24
	2	0	0	6	4	2	4	16
	3	0	0	4	8	2	8	22
	4	0	0	8	8	2	4	22
	5	0	0	10	6	4	6	26
	6	0	0	8	6	2	4	20
	7	0	0	8	8	2	4	22
	8	0	0	8	8	2	4	22
	9	0	0	6	6	4	4	20
	10	0	0	6	10	2	4	22
MEDIA		0,00	0,20	7,00	7,40	2,40	4,60	21,60
D.E.		0,00	0,63	1,70	1,90	0,84	1,35	2,63
PAL 20		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	0	0	8	8	2	4	22
	2	0	0	6	6	2	4	18
	3	0	0	8	6	2	4	20
	4	0	0	4	6	2	6	18
	5	-	-	-	-	-	-	-
	6	0	0	4	6	2	4	16
	7	0	0	6	8	2	4	20
	8	0	0	8	8	2	4	22
	9	0	0	8	4	2	6	20
	10	0	0	8	4	2	6	20
MEDIA		0,00	0,00	6,67	6,22	2,00	4,67	19,56
D.E.		0,00	0,00	1,73	1,56	0,00	1,00	1,94

**GRÁFICO 4.38.** Índice de patogenia del lote experimental piroxicam (10 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.



CEPA C1-NIH(10.000.000/ratón)

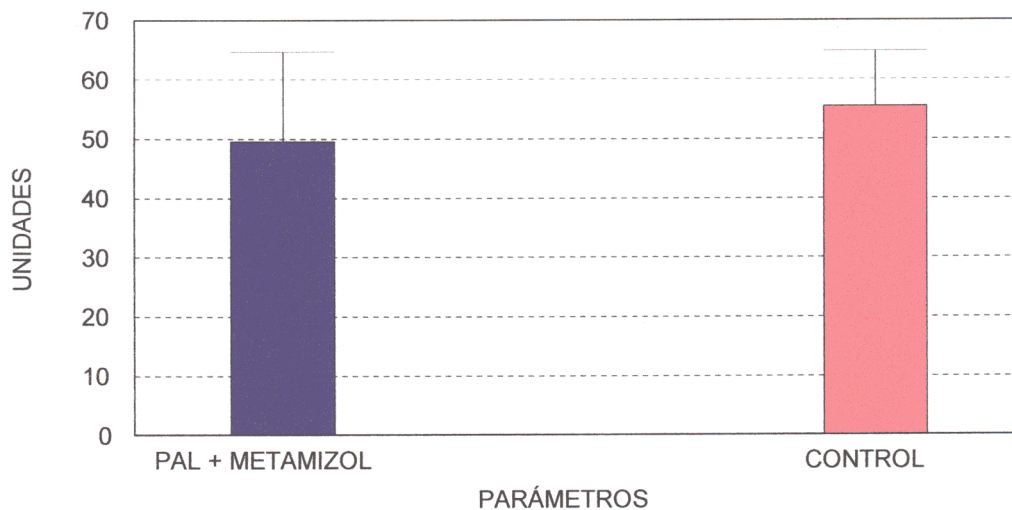
**TABLA 4.77.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de piroxicam (10 mg/kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	PIROXICAM	PALpre
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 25,11 ± 2,85	-		
PIROXICAM 21,60 ± 2,63	15,0 (p<0,05)	-	
PALpre 20 19,56 ± 1,94	4,0 (p<0,01)	21,5 (p<0,05)	-

**TABLA 4.78.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de PAL + METAMIZOL (274,87 mg/Kg/día) En el modelo de patogenia de *T. vaginalis* (RATÓN BALB/c).

CONTROL		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	26	4	10	12	6	8	66
	2	26	0	10	12	8	10	66
	3	20	4	10	12	10	10	66
	4	14	2	10	12	8	10	56
	5	8	0	10	12	8	10	48
	6	6	2	8	12	10	10	48
	7	6	4	6	12	10	12	50
	8	0	2	8	12	10	12	44
	9	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		13,25	2,25	9,00	12,00	8,75	10,25	55,50
D.E.		9,85	1,67	1,51	0,00	1,49	1,28	9,30
PAL+ MET		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D)	I.P.
RATÓN	1	38	2	10	12	4	6	72
	2	26	2	10	12	10	8	68
	3	26	2	10	12	8	4	62
	4	20	2	10	12	6	4	54
	5	20	4	10	12	4	0	50
	6	14	0	10	12	6	8	50
	7	14	0	10	12	6	4	46
	8	0	0	8	6	8	8	30
	9	0	0	10	12	6	6	34
	10	0	0	10	6	8	6	30
MEDIA		15,80	1,20	9,80	10,80	6,60	5,40	49,60
D.E.		12,87	1,40	0,63	2,53	1,90	2,50	15,05

**GRÁFICO 4.39.** Índice de patogenia del lote experimental PAL+metamizol (274,87 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis* (BALB/c).



**TABLA 4.79.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de PALpre + METAMIZOL (274,87 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

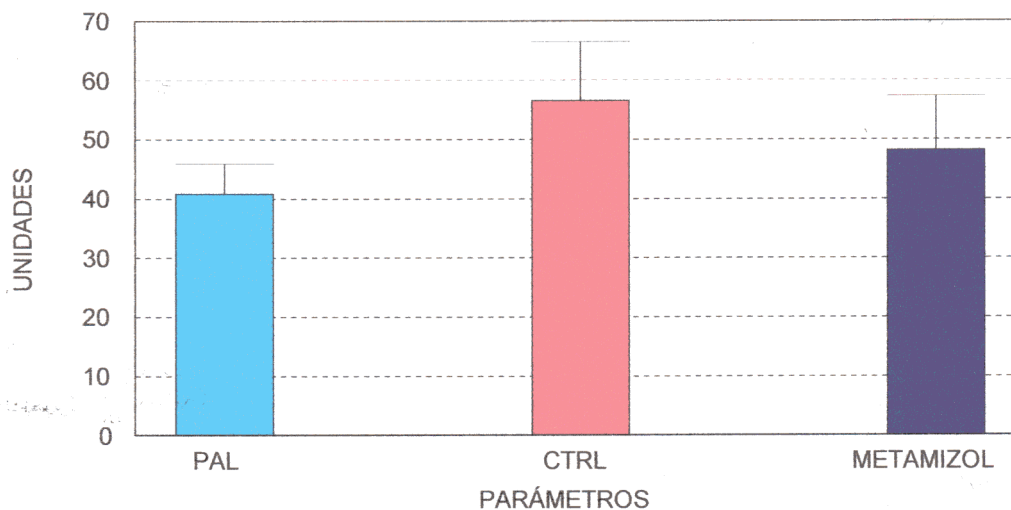
ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY	
	CONTROL	PAL + MET
$\bar{x} \pm D.E.$		
CONTROL 55,50 $\pm$ 9,30	-	
PAL 20 + METAMIZOL 49,60 $\pm$ 15,04	33,0 (p>0,05)	-



**TABLA 4.80.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de metamizol (274,98 mg/kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.	
RATÓN	1	50	2	8	8	2	2	72
	2	38	2	10	12	6	8	76
	3	20	0	10	12	4	6	52
	4	20	2	10	12	6	8	58
	5	14	0	10	12	8	10	54
	6	14	2	10	12	4	4	46
	7	14	2	10	12	6	8	52
	8	14	2	10	12	4	8	50
	9	14	0	10	12	8	8	52
	10	14	0	10	12	8	12	56
MEDIA		21,20	1,20	9,80	11,60	5,60	7,40	56,80
D.E.		12,59	1,03	0,63	1,26	2,07	2,84	9,67
PAL 20	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.	
RATÓN	1	20	2	10	8	0	4	44
	2	20	2	10	12	0	4	48
	3	14	4	10	12	2	4	46
	4	14	0	8	12	4	6	44
	5	8	0	10	12	4	4	38
	6	8	4	8	10	2	4	36
	7	6	0	10	12	4	2	34
	8	6	0	10	12	6	6	40
	9	6	0	10	12	8	8	44
	10	6	2	10	12	4	0	34
MEDIA		10,80	1,40	9,60	11,40	3,40	4,20	40,80
D.E.		5,75	1,65	0,84	1,35	2,50	2,20	5,09
METAMIZOL	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.	
RATÓN	1	32	2	10	12	6	6	68
	2	20	4	10	12	2	2	50
	3	14	2	8	12	8	8	52
	4	14	4	10	12	6	8	54
	5	8	2	10	12	4	8	44
	6	8	2	10	12	6	6	44
	7	6	0	8	12	6	6	38
	8	6	2	8	12	8	8	44
	9	6	2	10	12	6	4	40
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		12,67	2,22	9,33	12,00	5,78	6,22	48,22
D.E.		8,72	1,20	1,00	0,00	1,86	2,11	9,13

**GRÁFICO 4.40.** Índice de patogenia de los lotes experimentales metamizol (274,98 mg/Kg/día) Y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.



CEPA C1-NIH(10.000.000/ratón)

**TABLA 4.81.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de metamizol (274,98 mg/Kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	METAMIZOL	PALpre 20
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 56,80 $\pm$ 9,67	-		
METAMIZOL 48,22 $\pm$ 9,13	18,5 (p<0,05)	-	
PALpre 20 40,80 $\pm$ 5,09	1,5 (p<0,01)	22,5 (p>0,05)	-

#### 4.5.1.2.4. Otros: DIFUR, S-Amet y saponinas de *Q. saponaria*

Para completar la comprensión del escenario inmunológico generado tras la infección experimental de *T. vaginalis* se han ensayado otros productos con potencial actividad inmunomoduladora.

Así, inicialmente, se ha realizado un estudio comparativo de la capacidad inmunomoduladora de dos extractos, en teoría, de idéntica procedencia natural.

Por un lado, el extracto bruto PAL de *Polypodium leucotomos* (A.S.A.C Pharmaceutical International AIE) y, por otro, el fármaco DIFUR® (extracto de *Polypodium leucotomos*, según I. F. Cantabria S.A.) se evalúan frente al modelo experimental de tricomonosis intraperitoneal.

En cuanto a los resultados en la cepa de ratón NMRI, el I. P. del lote tratado con DIFUR  $-46,44 \pm 12,64$ - presenta diferencias estadísticamente significativas respecto al del grupo control (CTRL)  $-34,88 \pm 9,98$ -, y también PAL  $-29,80 \pm 9,11$ -. Sin embargo, los I.P. de los grupos control y PAL no presentan diferencias estadísticamente significativas entre sí (aunque se señala la misma tendencia que en las experiencias precedentes).

A continuación, se ha evaluado la incidencia del fármaco S-Amet (16,80 mg/Kg/día) en ratones NMRI tratados durante los 10 días previos a la infección experimental. Los grupos experimentales control  $-55,50 \pm 9,30$ - y S-Amet  $-44,40 \pm 12,95$ - no presentan diferencias estadísticamente significativas para un nivel de confianza del 5%. Se destaca especialmente el nivel de confianza, ya que para 6,8% existen diferencias significativas entre los grupos control y S-AMET.

Para finalizar, se ha contrastado la naturaleza adyuvante de un extracto bruto de saponinas de *Quillaja saponaria* y su capacidad para potenciar la modulación de la respuesta inmunitaria en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* en presencia o ausencia del extracto PAL.

No obstante, uno de los hechos a tener en cuenta en esta experiencia es la elevada mortalidad que se produce por la administración oral del extracto bruto de saponinas. Para paliar esta circunstancia se han ensayado dos tratamientos de 400 y 200 mg/Kg/día durante 3 días (-10, -5 y 0 post-inoculación). En los lotes tratados con la mayor concentración de saponinas (SPN1) o sinérgicamente con PAL (PAL + SPN1) el porcentaje de mortalidad de los ratones infectados con *T. vaginalis* es aproximadamente del 40 %. Si bien, la dosis de 400 mg/Kg/día parece encontrarse en el margen de inocuidad para los extractos purificados de *Quillaja saponaria*, esto no es así para un extracto bruto. La mortalidad que aquí se computa es previa a la infección experimental y por tanto ajena a cualquier efecto de la virulencia del parásito. Por tanto, en el I.P. no aparece consignado su efecto.

Los resultados de la valoración de la necropsia los ratones NMRI señalan que el I.P. del grupo control  $-30,67 \pm 3,46$ - presenta diferencias estadísticamente significativas con el resto de I. P. de los grupos PAL (20 mg/Kg/10 día)  $-24,89 \pm 6,09$ -, saponina (SPN1)  $-19,43 \pm 8,46$ - y PAL + saponina (SPN1)  $-12,80 \pm 3,90$ - para un nivel de confianza del 5%. No existiendo diferencias significativas entre los I. P. de los grupos experimentales PAL y SPN1, aunque si se produzcan dichas diferencias entre los de los grupos PAL y PAL + SPN1. Finalmente, tampoco se observan diferencias significativas entre los I.P. de los grupos SPN1 y PAL + SPN1.

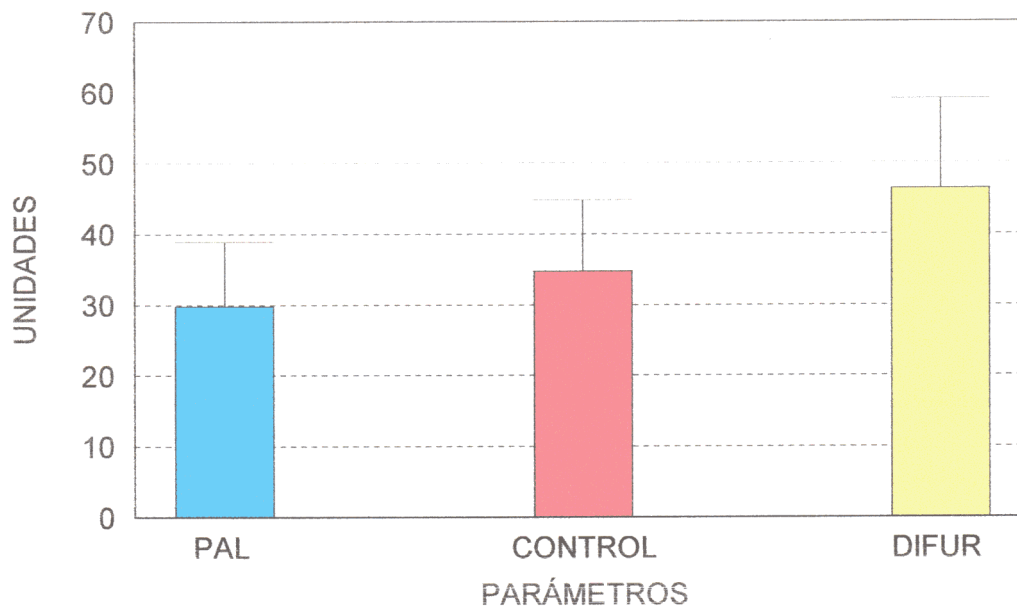
Por su parte, en el lote tratado con la concentración inferior (200 mg/Kg/día) manteniendo la pauta de 3 días, no se registran muertes achacables al tratamiento con el adyuvante (SPN2).

De tal manera que, el I.P. del lote tratado con SPN2 + PAL (20 mg/Kg/día)  $-17,11 \pm 6,49$ - presenta diferencias significativas respecto al I.P. de los grupos control  $-31,12 \pm 4,26$ - y SPN2  $-30,00 \pm 7,48$ -, no existiendo dichas diferencias entre los I.P. de los lotes control y SPN2.

**TABLA 4.82.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de DIFUR (20 mg/Kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL	M.	LA.	P.	B/P/E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	26	2	10	12	4	4	58
2	0	2	8	12	10	8	40
3	0	0	6	10	8	8	32
4	0	0	10	12	6	6	34
5	0	0	10	12	6	10	38
6	0	0	0	10	8	8	26
7	0	0	4	8	6	10	28
8	0	0	4	10	6	8	28
9	0	0	0	10	6	8	24
10	0	0	10	12	8	10	40
MEDIA	2,60	0,40	6,20	10,80	6,80	8,00	34,80
D.E.	8,22	0,84	4,05	1,40	1,69	1,89	9,99
DIFUR 20	M.	LA.	P.	B/P/E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	26	4	10	12	2	6	60
2	26	4	10	12	4	6	62
3	26	4	10	12	6	4	62
4	14	4	10	12	8	4	52
5	6	0	8	8	8	8	38
6	0	0	8	12	4	6	30
7	0	0	8	12	8	6	34
8	0	0	10	12	8	0	40
9	0	0	10	12	10	8	40
10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA	10,89	1,78	9,33	11,56	6,44	5,33	46,44
D.E.	12,21	2,11	1,00	1,33	2,60	2,45	12,64
PAL 20	M.	LA.	P.	B/P/E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	6	4	8	12	8	10	48
2	0	0	10	10	4	4	28
3	0	0	6	12	6	10	34
4	0	0	10	12	8	6	36
5	0	0	10	10	8	4	32
6	0	0	10	12	6	6	34
7	0	0	4	6	4	6	20
8	0	0	8	8	4	6	26
9	0	0	4	4	4	4	16
10	0	0	2	10	6	6	24
MEDIA	0,60	0,40	7,20	9,60	5,80	6,20	29,80
D.E.	1,90	1,26	3,01	2,80	1,75	2,20	9,11

**GRÁFICO 4.42.** Índice de patogenia de los lotes experimentales DIFUR (20 mg/Kg/día) Y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.



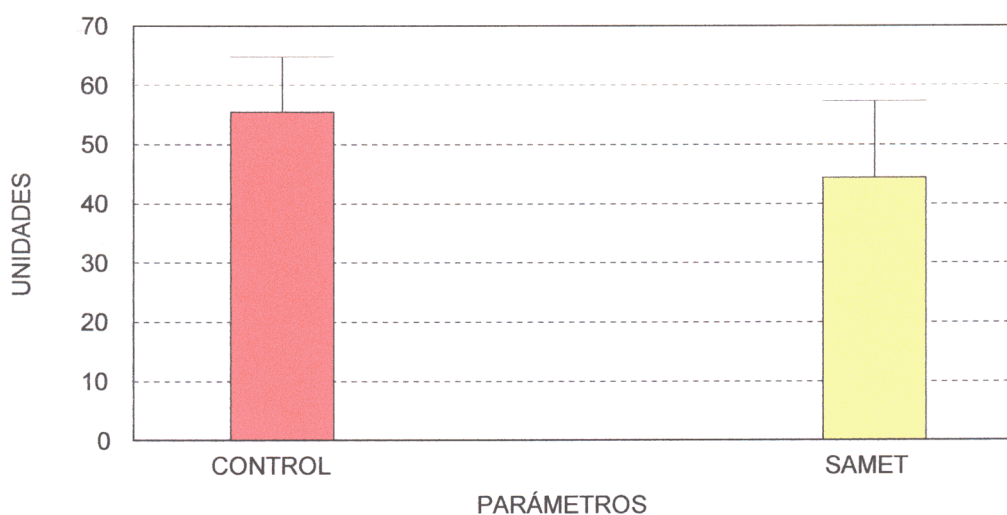
CEPA C1-NIH(10.000.000/ratón)

**TABLA 4.83.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de DIFUR (20 mg/Kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	DIFUR	PALpre 20
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 34,80 ± 9,99	-		
DIFUR 46,44 ± 12,64	19,0 (p<0,05)	-	
PALpre 20 29,80 ± 9,11	35,5 (p>0,05)	11,0 (p<0,01)	-

**TABLA 4.84.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de S-AMET (16,80 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	26	4	10	12	6	8	66
	2	26	0	10	12	8	10	66
	3	20	4	10	12	10	10	66
	4	14	2	10	12	8	10	56
	5	8	0	10	12	8	10	48
	6	6	2	8	12	10	10	48
	7	6	4	6	12	10	12	50
	8	0	2	8	12	10	12	44
	9	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		13,25	2,25	9,00	12,00	8,75	10,25	55,50
D.E.		9,85	1,67	1,51	0,00	1,49	1,28	9,30
S-Amet		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	26	2	10	12	8	4	62
	2	26	2	10	12	4	8	62
	3	20	0	10	8	4	8	50
	4	14	2	10	12	6	8	52
	5	14	2	10	10	4	6	46
	6	6	4	10	12	6	8	46
	7	0	0	6	12	2	4	24
	8	0	0	10	12	10	8	40
	9	0	0	8	10	6	6	30
	10	0	0	6	12	6	8	32
MEDIA		10,60	1,20	9,00	11,20	5,60	6,80	44,40
D.E.		10,83	1,40	1,70	1,40	2,27	1,69	12,95

**GRÁFICO 4.43.** Índice de patogenia del lote experimental S-amet (16,80 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.

CEPA C1-NIH(10.000.000/ratón)

**TABLA 4.85.** Sinopsis del índice de patogenicidad y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de S-AMET (16,80 mg/Kg/día) en el modelo de patogenicidad experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY	
	CONTROL	S-AMET
$\bar{x} \pm D.E.$		
CONTROL 55,50 $\pm$ 9,30	-	
S-AMET 44,40 $\pm$ 12,95	19,5 (p>0,05)	-



**TABLA 4.86a.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de saponinas (400 mg/Kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL	M.	LA.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	0	8	10	8	8	34
2	0	0	10	8	4	6	28
3	0	0	6	8	4	8	26
4	0	0	8	10	6	6	30
5	0	0	10	10	4	8	32
6	0	0	4	10	6	8	28
7	-	-	-	-	-	-	-
8	0	0	8	10	8	10	36
9	0	2	10	8	8	6	34
10	0	0	8	8	6	6	28
MEDIA	0,00	0,22	8,00	9,11	6,00	7,33	30,67
D.E.	0,00	0,67	2,00	1,05	1,73	1,41	3,46
PAL 20	M.	LA.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	8	4	10	8	6	4	40
2	0	0	2	12	4	4	22
3	-	-	-	-	-	-	-
4	0	0	8	10	6	0	24
5	0	0	6	6	6	4	22
6	0	0	6	8	4	4	22
7	0	0	8	10	6	4	28
8	0	0	6	8	6	2	22
9	0	0	10	8	6	0	24
10	0	0	6	8	2	4	20
MEDIA	0,89	0,44	6,89	8,67	5,11	2,89	24,89
D.E.	2,67	1,33	2,47	1,73	1,45	1,76	6,09
SAPONINA (SPN1)	M.	LA.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	-	-	-	-	-	-	-
2	0	0	6	0	0	4	10
3	0	0	8	6	6	0	20
4	0	2	8	8	6	2	26
5	0	0	8	8	8	6	30
6	0	0	6	8	6	6	26
7	0	0	2	6	0	0	8
8	0	0	4	6	0	6	16
9	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA	0,00	0,29	6,00	6,00	3,71	3,43	19,43
D.E.	0,00	0,76	2,31	2,83	3,55	2,76	8,46

**TABLA 4.86b.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de saponinas (400 mg/Kg/día) + PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

SPN1+PAL	M.	LA.	P	B/P/E.	H(V).	H(D).	I.P.	
RATÓN	1	0	0	2	8	0	0	10
	2	0	0	8	6	0	0	14
	3	0	0	0	8	0	0	8
	4	0	0	2	4	6	6	18
	5	0	0	6	8	0	0	14
	6	-	-	-	-	-	-	-
	7	-	-	-	-	-	-	-
	8	-	-	-	-	-	-	-
	9	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA	0,00	0,00	3,60	6,80	1,20	1,20	12,80	
D.E.	0,00	0,00	3,29	1,79	2,68	2,68	3,90	

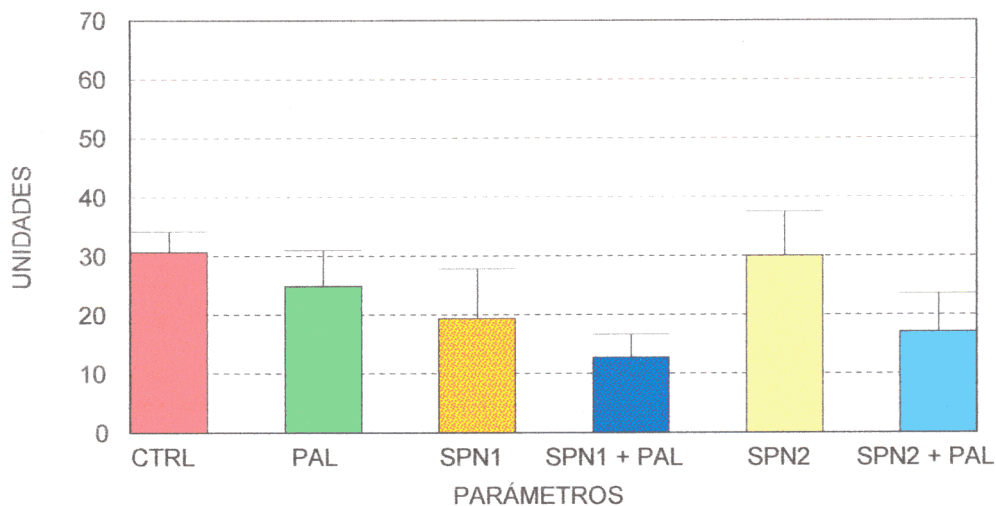
**TABLA 4.87.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de timoestimulina (24 mg/Kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY			
	CONTROL	PALpre 20	SAPONINA (SPN1)	SPN1+PALpre
$\bar{x} \pm D.E.$				
CONTROL 30,67 ± 3,46	-			
PALpre 20 24,89 ± 6,09	11,5 (p<0,01)	-		
SPN1 19,43 ± 8,46	5,5 (p<0,01)	22,5 (p>0,05)	-	
SPN1+PALpre 12,80 ± 3,90	0,0 (p<0,01)	0,0 (p<0,01)	9,0 (p>0,05)	-

**TABLA 4.88.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de saponinas (200 mg/Kg/día) y saponinas (200 mg/Kg/día) + PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	2	10	8	8	8	36
2	0	0	6	8	6	6	26
3	0	2	6	8	8	10	34
4	0	4	10	8	6	6	34
5	0	2	8	8	8	10	36
6	0	0	6	8	6	6	26
7	0	2	6	8	6	8	30
8	0	0	8	10	6	8	32
9	0	0	6	8	6	6	26
10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA	0,00	1,33	7,33	8,22	6,67	7,56	31,11
D.E.	0,00	1,41	1,73	0,67	1,00	1,67	4,26
SPN2	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	2	10	12	8	4	36
2	0	2	10	12	8	4	36
3	0	0	6	8	4	4	22
4	0	0	4	6	4	8	22
5	0	0	4	12	6	4	26
6	0	0	8	8	6	6	28
7	0	0	10	10	10	10	40
8	0	0	8	8	4	2	22
9	6	0	10	8	6	8	38
10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA	0,67	0,44	7,78	9,33	6,22	5,56	30,00
D.E.	2,00	0,88	2,54	2,24	2,11	2,60	7,48
SPN2+PAL 20	M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	0	2	4	0	0	6
2	0	0	2	4	8	6	20
3	0	0	8	6	4	6	24
4	0	0	6	8	2	0	16
5	0	0	6	6	6	8	26
6	0	0	6	0	0	6	12
7	0	0	8	0	4	4	16
8	0	0	8	4	0	0	12
9	0	0	8	0	6	8	22
10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA	0,00	0,00	6,00	3,56	3,33	4,22	17,11
D.E.	0,00	0,00	2,45	2,96	3,00	3,38	6,49

**GRÁFICO 4.44.** Índice de patogenia de los lotes experimentales SPN1 (400 mg/Kg/día), SPN2 (200 mg/Kg/día), SPN1+PAL, SPN2+PAL Y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.



CEPA C1-NIH(10.000.000)

**TABLA 4.90.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de las saponinas SPN2 (200 mg/Kg/día) y SPN2 + PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	SPN2	SPN2 + PALpre
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 31,11 ± 4,26	-		
SPN2 30,00 ± 7,48	38,5 (p>0,05)	-	
SPN2 + PALpre 17,11 ± 6,49	1,5 (p<0,01)	8,0 (p<0,01)	-

#### 4.5.2. EFECTO INMUNOMODULADOR DEL EXTRACTO CTP

Las experiencias siguientes van encaminadas a elucidar la actividad inmunomoduladora del extracto vegetal CTP (propiedad de A.S.A.C. Pharmaceutical International AIE).

Inicialmente, se han establecido 5 lotes experimentales de ratones NMRI correspondientes a los grupos tratados con CTP (20 mg/Kg/día) durante 10 días, además, se ha ensayado la co-administración de CTP (20 mg/Kg/10 días) + metamizol (274,87 mg/Kg/10 día); CTP + SPN2 (200 mg/Kg/3 días) y CTP + PAL (20 mg/Kg/10 días). Todos los productos se administran por vía intraperitoneal, excepto, obviamente, las saponinas por vía oral.

Los resultados, tras la valoración de la necropsia, indican que el I.P. del lote control -  $29,78 \pm 3,53$ - presenta diferencias significativas respecto a los I.P. de los lotes CTP -  $16,60 \pm 5,81$ - y CTP + metamizol -  $22,54 \pm 7,58$ -, ambas para un nivel de confianza del 5%. Además, los índices de patogenia de los grupos CTP y CTP + metamizol no presentan diferencias significativas para el nivel de confianza prefijado; aunque se mantiene la tendencia observada en la sinergia entre PAL y metamizol, ya que el tratamiento conjunto de CTP y metamizol provoca una disminución en el I.P. inferior a la que induce el tratamiento de CTP.

Por otra parte, el I.P. del grupo control presenta diferencias estadísticamente significativas, respecto al I.P. del grupo SPN2 + CTP -  $13,42 \pm 3,41$ -, y por supuesto, frente al I.P. del grupo experimental CTP + PAL -  $7,75 \pm 5,39$ -, ambas para un nivel de confianza del 5%. Aún más, los grupos CTP + PAL, SPN2 + CTP presentan diferencias significativas para el nivel de confianza establecido.

Se confirma el efecto adyuvante del extracto bruto de saponinas que potencia la actividad inmunomoduladora del extracto CTP, asimismo, merece especial mención el sinergismo de PAL y CTP patente por la ínfima entidad de las lesiones valoradas en el lote.

En un experiencia independiente, se pretende verificar el efecto de CTP y del sinergismo CTP + PAL , en una cepa de ratón como BALB/c más susceptible a la infección experimental

de *T. vaginalis*. Se ha mantenido las pautas de tratamiento y dosis empleadas en los ensayos precedentes.

Según se desprende de la evaluación de la necropsia realizada a los ratones BALB/c, el I. P. del lote control  $-60,89 \pm 3,02$ - muestra diferencias significativas respecto al I.P. del grupo CTP (20 mg/Kg/10 días)  $-50,00 \pm 3,40$ -, y por supuesto, del I.P. del lote experimental CTP (20 mg/Kg/10 días) + PAL (20 mg/Kg/10 días)  $-48,00 \pm 2,82$ -, ambos para un nivel de confianza del 5%. Los I.P. de los lotes con CTP y CTP + PAL, en este caso, no muestran diferencias significativas.

La inmunomodulación del extracto CTP se muestra menos rotunda en la infección de la cepa BALB/c, quizás por su mayor sensibilidad a la infección por *T. vaginalis*, o bien, por la elevada virulencia del lote de parásitos inoculados, según se desprende del I.P. lote control.

**TABLA 4.91.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de CTP (20 mg/Kg/día) Y CTP+ METAMIZOL (274,98 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

CONTROL	M.	LA.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	-	-	-	-	-	-	-
2	0	0	8	6	6	8	28
3	0	0	6	10	6	2	24
4	0	0	8	8	8	4	28
5	0	0	10	6	8	6	30
6	0	0	10	8	8	6	32
7	0	0	10	10	8	4	32
8	0	0	10	10	8	6	34
9	0	0	6	10	6	4	26
10	0	0	8	10	8	8	34
MEDIA	0,00	0,00	8,44	8,50	7,33	5,33	29,78
D.E.	0,00	0,00	1,67	1,77	1,00	2,00	3,53
CTP + MET	M.	LA.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	0	10	8	6	8	32
2	0	0	6	6	4	2	18
3	0	0	8	8	8	8	32
4	0	0	6	4	0	0	10
5	0	0	8	12	6	0	26
6	0	0	4	8	8	4	24
7	0	0	10	8	2	8	28
8	0	0	4	12	2	2	20
9	0	0	4	4	2	2	12
10	0	0	10	8	2	2	22
MEDIA	0,00	0,00	6,67	7,78	4,22	3,78	22,44
D.E.	0,00	0,00	2,45	2,91	2,91	3,38	8,05
CTP 20	M.	LA.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN							
1	0	0	4	4	2	2	12
2	0	0	6	6	4	2	18
3	0	0	8	6	6	4	24
4	0	0	8	6	6	6	26
5	0	0	8	6	2	2	18
6	0	0	0	0	2	4	6
7	0	0	4	4	4	4	16
8	0	0	6	4	4	4	18
9	0	0	8	4	2	2	16
10	0	0	6	6	0	0	12
MEDIA	0,00	0,00	5,80	4,60	3,20	3,00	16,60
D.E.	0,00	0,00	2,57	1,90	1,93	1,70	5,82

**TABLA 4.92.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de CTP + PAL (20 mg/Kg/día) Y CTP + SPN2 (200 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

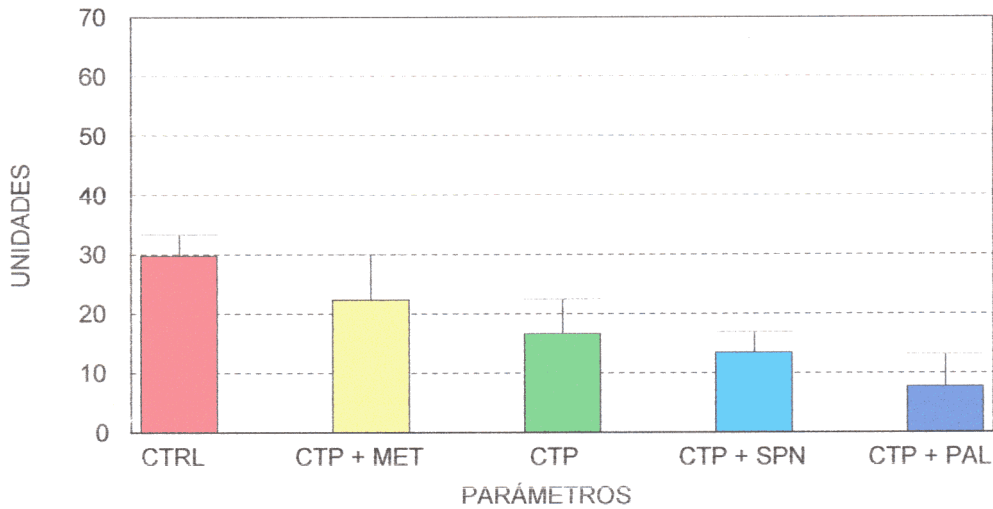
CONTROL		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	0	0	4	12	4	6	26
	2	0	0	8	8	4	8	28
	3	0	0	6	10	4	8	28
	4	0	0	4	10	6	6	26
	5	0	0	10	8	4	8	30
	6	0	0	8	8	4	6	26
	7	0	0	10	12	4	4	30
	8	0	0	6	10	8	8	32
	9	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		0,00	0,00	7,00	9,75	4,75	6,75	28,25
D.E.		0,00	0,00	2,39	1,67	1,49	1,49	2,25
CTP + SPN2		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	0	0	2	4	4	2	12
	2	-	-	-	-	-	-	-
	3	0	0	4	8	2	2	16
	4	0	0	6	8	4	0	18
	5	0	0	6	6	0	0	12
	6	0	0	2	4	2	4	12
	7	0	0	4	0	2	2	8
	8	0	0	8	4	0	4	16
	9	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		0,00	0,00	4,57	4,86	2,00	2,00	13,43
D.E.		0,00	0,00	2,23	2,79	1,63	1,63	3,41
CTP + PAL		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	0	0	4	0	0	0	4
	2	0	0	2	4	0	4	10
	3	0	0	0	6	0	6	12
	4	0	0	0	2	2	0	4
	5	0	0	0	4	0	0	4
	6	0	0	0	6	0	2	8
	7	0	0	0	0	2	0	2
	8	0	0	4	6	4	4	18
	9	-	-	-	-	-	-	-
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA		0,00	0,00	1,25	3,50	1,00	2,00	7,75
D.E.		0,00	0,00	1,83	2,56	1,51	2,39	5,39



**TABLA 4.93.** Valoración paramétrica del ensayo de inmunomodulación de CTP + PAL (20 mg/Kg/día) y CTP (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *t. vaginalis* (RATÓN BALB/c).

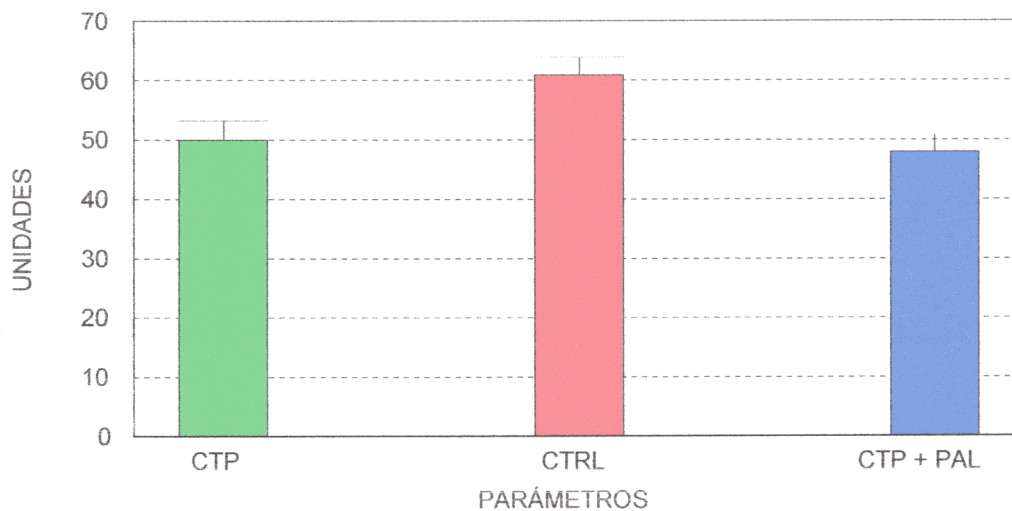
CONTROL	M.	LA.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.	
RATÓN	1	32	0	10	10	4	6	62
	2	32	2	10	12	2	6	64
	3	32	2	10	10	2	4	60
	4	32	4	8	8	4	6	62
	5	26	0	8	8	6	8	56
	6	26	2	10	10	6	6	60
	7	26	2	10	12	4	4	58
	8	26	2	10	10	8	10	66
	9	20	0	10	12	8	10	60
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA	28,00	1,56	9,56	10,22	4,89	6,67	60,89	
D.E.	4,24	1,33	0,88	1,56	2,26	2,24	3,02	
CTP 20	M.	LA.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.	
RATÓN	1	32	0	10	4	0	0	46
	2	32	0	10	8	2	0	52
	3	32	2	10	6	0	0	50
	4	32	0	10	8	0	0	50
	5	32	2	10	10	2	0	56
	6	32	0	10	10	0	0	52
	7	32	0	10	6	2	0	50
	8	32	0	10	6	2	2	52
	9	32	0	10	6	0	0	48
	10	26	0	10	8	0	0	44
MEDIA	31,40	0,40	10,00	7,20	0,80	0,20	50,00	
D.E.	1,90	0,84	0,00	1,93	1,03	0,63	3,40	
CTP+PAL 20	M	LA.	P	B/P/E	H(V)	H(D)	I.P.	
RATÓN	1	38	0	10	0	0	0	48
	2	38	0	8	0	0	0	46
	3	38	0	10	0	0	0	48
	4	38	0	10	0	0	0	48
	5	38	0	10	4	0	0	52
	6	38	0	8	4	0	0	50
	7	32	0	10	4	0	4	50
	8	32	0	10	0	2	4	48
	9	32	0	10	0	0	0	42
	10	-	-	-	-	-	-	-
MEDIA	36,00	0,00	9,56	1,33	0,22	0,89	48,00	
D.E.	3,00	0,00	0,88	2,00	0,67	1,76	2,83	

**GRÁFICO 4.45.** Índice de patogenia de los lotes experimentales CTP, CTP + MET (274,98 mg/Kg/día), CTP + SPN2, CTP + PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.



CEPA C1-NIH(10.000.000/ratón)

**GRÁFICO 4.46.** Índice de patogenia de los lotes experimentales CTP, CTP + PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis* (RATÓN: BALB/c).



CEPA C1-NIH(10.000.000)

**TABLA 4.94.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de CTP (20 mg/Kg/día), CTP+MET (274,98 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	CTP	CTP + MET
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 29,77 $\pm$ 3,53	-		
CTP 20 16,60 $\pm$ 5,82	2,0 (p<0,01)	-	
CTP + MET 22,44 $\pm$ 8,05	17,0 (p<0,05)	26,5 (p>0,05)	-

**TABLA 4.95.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de CTP + PAL (20 mg/Kg/día), CTP + SPN2 (200 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	CTP+SAPONINA	CTP + PAL
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 28,25 $\pm$ 2,25	-		
CTP+SAPONINA 13,42 $\pm$ 3,41	0,0 (p<0,01)	-	
CTP + PAL 7,75 $\pm$ 5,39	0,0 (p<0,01)	10,5 (p<0,05)	-

**TABLA 4.96.** Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de CTP (20 mg/Kg/día), CTP + PAL (20 mg/Kg/día) En el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* (RATÓN: BALB/c).

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	CTPpre	CTP + PAL
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 60,89 $\pm$ 3,02	-		
CTP 50,00 $\pm$ 3,40	0,5 (p<0,01)	-	
CTP + PAL 48,00 $\pm$ 2,83	0,0 (p<0,01)	28,0 (p>0,05)	-

#### 4.5.3. Evaluación serológica del tipo de respuesta inmunitaria frente a *Trichomonas vaginalis* en el modelo murino de infección intraperitoneal.

Adicionalmente a la necropsia, de entre las experiencias más significativas en ratones BALB/c, se han recolectado sueros, extraídos por la técnica de Nöller, para intentar esclarecer el tipo de respuesta inmunitaria murina frente a la infección intraperitoneal de *T. vaginalis*.

Si en una primera etapa, la evaluación de las lesiones y la mortalidad permite una aproximación al conocimiento de la patogenia; en esta segunda, para investigar la actividad potencial de los extractos vegetales inmunomoduladores es preciso profundizar en la respuesta inmunológica que se establece en el modelo parasitario.

En este sentido, se han realizado determinaciones serológicas de las subclases de inmunoglobulinas G ( $G_1, G_{2a}, G_{2b}, G_3$ ), con la intención de establecer el tipo de respuesta Th1/Th2 que controla la infección experimental del parásito. Para, posteriormente, desarrollar mediante un *kit* de ELISA indirecto (ENDOGEN, Inc., Cambridge MA, U.S.A.) determinaciones séricas de los niveles de interleucina-4 (IL-4) e interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) a lo largo del tiempo de experimentación.

##### 4.5.3.1. Determinación sérica mediante ELISA indirecto de las subclases de inmunoglobulina G (IgG) inducidas en el modelo de inmunomodulación de *Trichomonas vaginalis*.

Como ensayo preliminar al estudio de la dinámica serológica de las citocinas en el modelo parasitario, se realiza una evaluación de las subclases de IgG a lo largo del proceso experimental. Se persigue establecer una hipótesis del tipo de respuesta inmunológica (Th1/Th2) que apoyase, o no, los resultados que se producen en la determinación de los niveles en suero de IL-4 e IFN- $\gamma$ . La valoración se realiza mediante un ELISA indirecto, siendo la lectura de absorbancia a  $\lambda=490$  nm.

A continuación, en la Tabla 4.97. se indica la evolución de las inmunoglobulinas (IgG+IgM e IgG) y las subclases de la inmunoglobulina G (IgG<sub>1</sub>, IgG<sub>2a</sub>, IgG<sub>2b</sub> e IgG<sub>3</sub>) en el modelo de inmunomodulación de *T. vaginalis* a lo largo del periodo experimental. Los resultados expresan el valor medio ( $\bar{x}$ ) y la desviación estándar (D.E.) de la densidad óptica (DO<sub>p</sub>-DO<sub>i</sub>) obtenida de 7 determinaciones independientes por duplicado, según se define en la propia tabla.

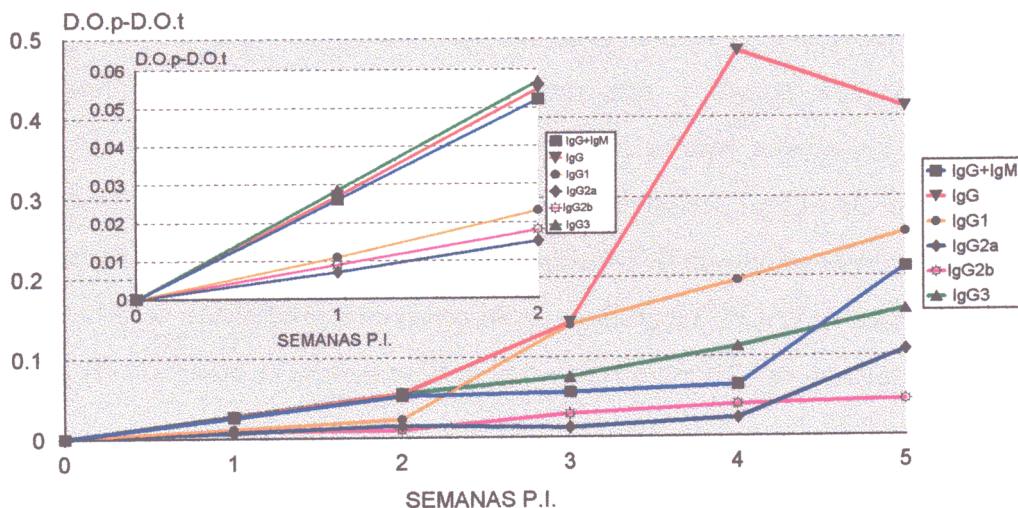
Más adelante, la Gráfica 4.47. recoge la evolución temporal de las subclases de IgG a lo largo de 5 semanas, aún cuando, el tramo crítico de mayor interés se limita al periodo de observación de las lesiones y la mortalidad (2 semanas), recogido en un recuadro ampliado en la misma.

**TABLA 4.97.** Evolución serológica de la respuesta humoral inducida por *T. vaginalis* en el modelo murino de infección intraperitoneal, según el método de ELISA ( $\lambda=490$  nm).

DOP - DOT <sup>a</sup>	SEMANAS P.I. <sup>c</sup>				
	1 <sup>b</sup>	2 <sup>b</sup>	3 <sup>b</sup>	4 <sup>b</sup>	5 <sup>b</sup>
Ig G + Ig M	0,026 ± 0,010	0,052 ± 0,013	0,055 ± 0,023	0,064 ± 0,025	0,211 ± 0,038
Ig G	0,027 ± 0,011	0,055 ± 0,017	0,143 ± 0,035	0,483 ± 0,070	0,412 ± 0,075
Ig G <sub>1</sub>	0,011 ± 0,005	0,023 ± 0,003	0,140 ± 0,056	0,195 ± 0,065	0,255 ± 0,050
Ig G <sub>2a</sub>	0,007 ± 0,003	0,015 ± 0,009	0,012 ± 0,004	0,023 ± 0,010	0,107 ± 0,043
Ig G <sub>2b</sub>	0,009 ± 0,004	0,010 ± 0,004	0,029 ± 0,018	0,040 ± 0,010	0,045 ± 0,017
Ig G <sub>3</sub>	0,028 ± 0,009	0,055 ± 0,013	0,075 ± 0,020	0,112 ± 0,035	0,158 ± 0,036

- a. DO<sub>p</sub>: Diferencia entre la densidad óptica del suero problema (procedente de ratones infectados con *T. vaginalis*) frente a antígeno y la seroalbúmina bovina (BSA).  
DO<sub>t</sub>: Diferencia entre la densidad óptica del suero negativo (procedente de ratones no infectados con *T. vaginalis*) frente a antígeno y la seroalbúmina bovina (BSA).
- b. Se expresa el valor medio ( $\bar{x}$ ) de densidad óptica (DOP-DOt) para n=7 determinaciones independientes por duplicado ± la desviación estándar (D.E.) correspondiente.
- c. SEMANAS P.I.: Semana post-infección.

**GRÁFICA 4.47.** Dinámica de las subclases de la inmunoglobulina G (IgG) en el modelo experimental de *Trichomonas vaginalis* en un periodo de 5 semanas p.i.



4.5.3.2. Determinación sérica mediante ELISA indirecto de las citocinas interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-4 (IL-4).

La elucidación de la respuesta inmunomoduladora de los extractos vegetales PAL y CTP en el modelo experimental de *T. vaginalis*; hasta el momento, ha venido determinada por la evaluación diferencial de las lesiones características de la infección intraperitoneal del flagelado en la cepa murina seleccionada.

En orden a establecer una evidencia molecular directa de la actividad inmunomoduladora de los extractos, se ha realizado la valoración por ELISA indirecto de las citocinas interferón- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e interleucina-4 (IL-4).

Si de una parte, IFN- $\gamma$  es un marcador específico de la respuesta mediada por linfocitos Th1, y de otra, la IL-4 es un marcador alternativo de las respuestas mediadas por linfocitos Th2; ambas determinaciones permiten caracterizar el tipo de respuesta inmunitaria preponderante en el modelo experimental de *T. vaginalis* libre de tratamiento. Asimismo, se verifica la modulación de las citocinas tras un tratamiento de 10 días previo a la infección (-10,0) con los extractos vegetales PAL y CTP. La comparación entre el lote no tratado (CONTROL) y los tratados (PAL, CTP, PAL+CTP) permitirá establecer el efecto inmunomodulador de los extractos sobre la respuesta inmune murina, en particular, sobre las citocinas que coordinan el balance de las respuestas Th1/Th2.

En cuanto a los resultados, se observa un incremento muy significativo de IFN- $\gamma$  sérico en el lote CONTROL tras la infección que alcanza su máximo el día +10 postinfección (6824,935 pg/ml) y que posteriormente disminuye hasta recuperar, aproximadamente, los niveles basales (870,011 pg/ml). Tanto el tratamiento de PAL (357,719 pg/ml en el día +10 p.i.) como de CTP (647,967 pg/ml en el día +10 p.i.) modulan negativamente los niveles séricos de IFN- $\gamma$  respecto al CONTROL establecido. Asimismo, el tratamiento sinérgico de PAL+CTP produce un descenso en la producción de IFN- $\gamma$  que alcanza un máximo relativo de 1770 pg/ml el día 0. para alcanzar niveles basales el día 15 p.i.



No obstante, los perfiles de las citocinas presentan dinámicas muy diferentes, si bien el lote tratado con PAL desde el nivel basal (870,011 pg/ml en el día -5 p.i.) desciende hasta 178,937 pg/ml el día de la inoculación de la infección, para posteriormente mantenerse en 357,719 pg/ml el día +10 p.i.; por contra, el lote tratado con CTP desde el nivel basal (880,325 pg/ml en el día -5 p.i.) asciende ligeramente hasta 1770,805 pg/ml el día de inoculación de *T. vaginalis* para descender progresivamente hasta 127,365 pg/ml el día +15 p.i.

De otra parte, en el ensayo de determinación sérica de IL-4 se presenta un incremento de la interleucina en el lote CONTROL, que tras la infección alcanza su máximo el día +10 postinfección (42,540 pg/ml) y que, posteriormente, disminuye hasta los niveles basales (19,710 pg/ml). En este caso, el tratamiento de PAL anticipa el máximo nivel de IL-4 (45,510 pg/ml) en el día +5 p.i., aunque, independientemente del desfase, la dinámica de las concentraciones sea idéntica con la mostrada por el lote CONTROL. Por su parte, el lote tratado con CTP muestra un abrupto incremento de IL-4 que alcanza su máxima expresión el día de la inoculación del parásito y que disminuye paulatinamente a medida que progresa el tiempo de observación experimental.

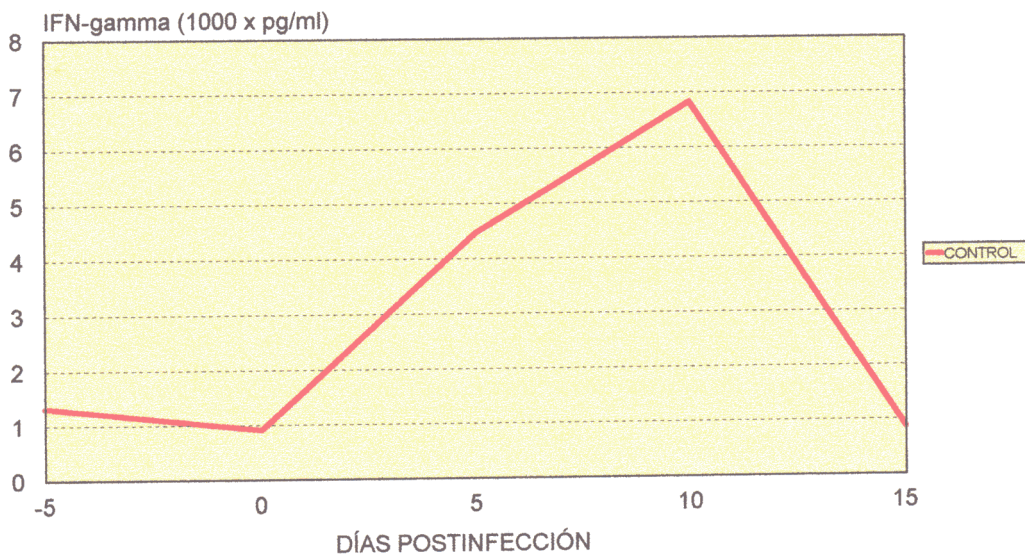
Ambos extractos parecen, pues, anticipar la presencia del máximo nivel de IL-4 en el suero de los ratones BALB/c infectados con *T. vaginalis*, aunque no sean capaces de incrementarlo respecto al lote CONTROL. Siendo el extracto CTP quien manifiesta un comportamiento inmunomodulador más aparente, que llega a alcanzar la máxima concentración de IL-4 sérica, al menos, 10 días antes que su lote CONTROL establecido. El tratamiento con PAL + CTP, en una primera etapa, favorece que la producción de IL-4 siga el patrón del tratamiento con CTP (hasta el día 0). Posteriormente, la dinámica, aunque con incremento en las concentraciones de IL-4, mantiene el perfil del tratamiento con PAL.

De forma pormenorizada, se presentan a continuación, las tablas y gráficas de las evoluciones de las concentraciones de IFN- $\gamma$  e IL-4 en los lotes CONTROL y tratados con PAL, CTP y PAL+CTP en el modelo de inmunomodulación de *Trichomonas vaginalis*.

**TABLA 4.98.** Dinámica de la concentración sérica de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c infectados intraperitonealmente por *T. vaginalis* (GRUPO CONTROL).

DÍAS POSTINFECCIÓN	D.O. 1	D.O. 2	D.O. $\bar{x}$	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
-5	0,200	0,227	0,213	1323,800
0	0,162	0,144	0,153	907,831
5	0,554	0,788	0,671	4469,780
10	1,017	1,010	1,013	6824,935
15	0,154	0,141	0,147	870,011

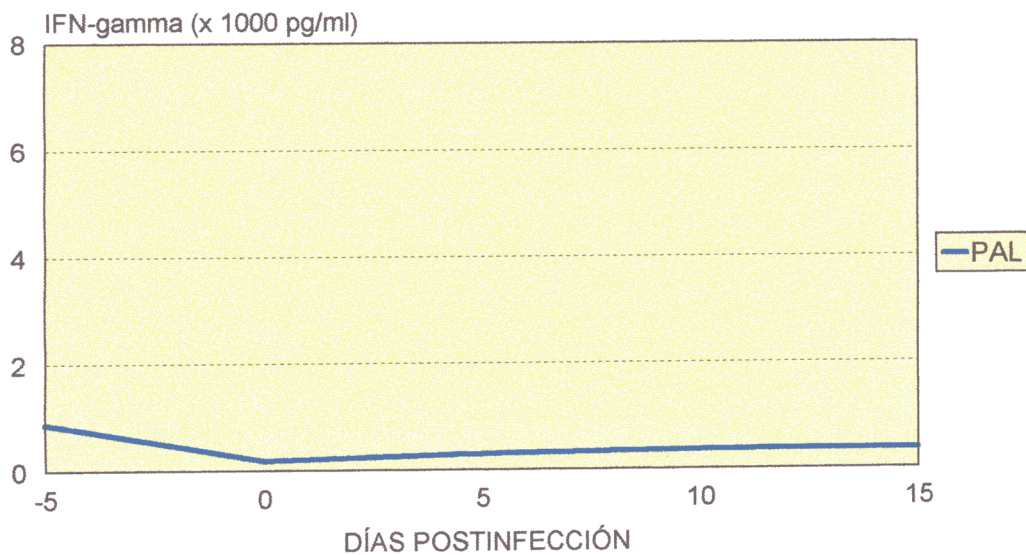
En la tabla se expresan los valores medios de densidad óptica ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) y la concentración de IFN- $\gamma$  calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IFN- $\gamma$  recombinante.

**GRÁFICA 4.48.** Evolución de la concentración de interferón- $\gamma$  en el curso de la infección intraperitoneal de ratones BALB/c con *T. vaginalis* sin tratamiento (grupo control).

**TABLA 4.99.** Dinámica de la concentración sérica de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c infectados con *T. vaginalis* y tratados con PAL (GRUPO PAL).

DÍAS POSTINFECCIÓN	D.O. 1	D.O. 2	D.O. $\bar{x}$	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
-5	0,162	0,133	0,148	870,011
0	0,052	0,042	0,047	178,937
5	0,055	0,074	0,065	299,273
10	0,069	0,077	0,073	357,719
15	0,057	0,095	0,076	378,351

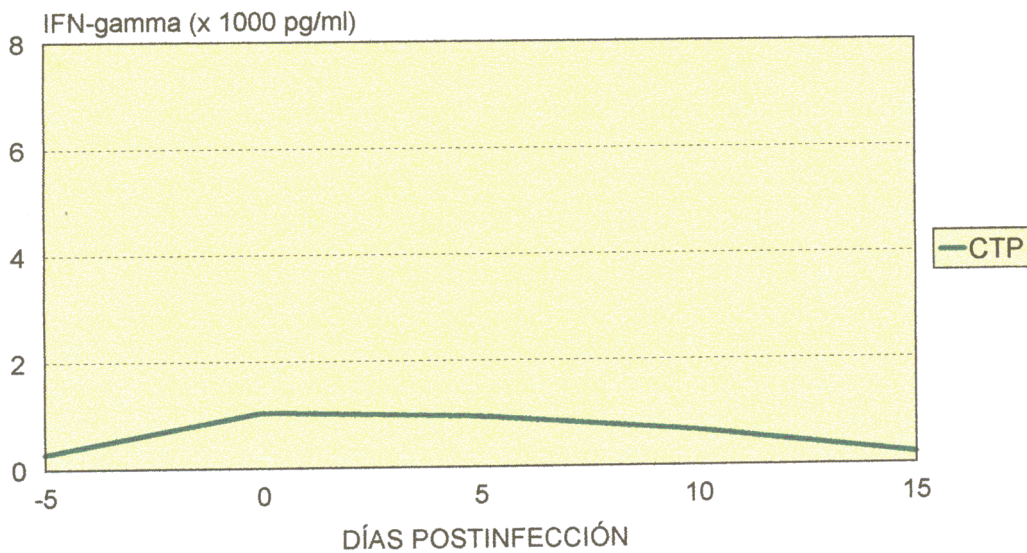
En la tabla se expresan los valores medios de densidad óptica ( $\lambda = 450$  nm) y la concentración de IFN- $\gamma$  calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IFN- $\gamma$  recombinante.

**GRÁFICA 4.49.** Evolución de la concentración de IFN- $\gamma$  en el curso de la infección intraperitoneal con *T. vaginalis* tras el tratamiento con PAL (días -10 a 0 p.i.).

**TABLA 4.100.** Dinámica de la concentración sérica de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c infectados con *T. vaginalis* y tratados con CTP (GRUPO CTP).

DÍAS POSTINFECCIÓN	D.O. 1	D.O. 2	D.O. $\bar{x}$	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
-5	0,069	0,053	0,061	275,200
0	0,203	0,142	0,172	1041,920
5	0,171	0,145	0,158	942,212
10	0,118	0,113	0,115	649,967
15	0,045	0,055	0,050	199,560

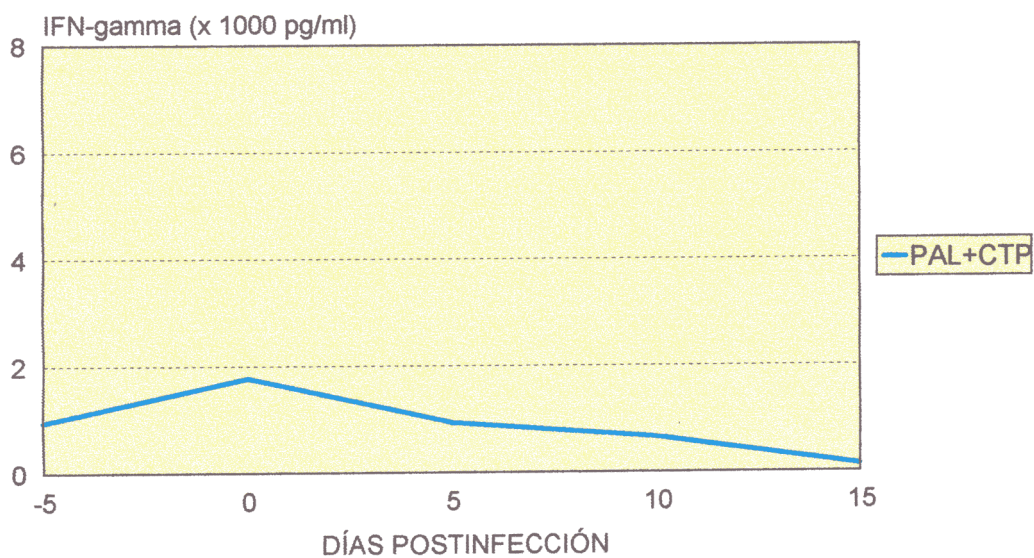
En la tabla se expresan los valores medios de densidad óptica ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) y la concentración de IFN- $\gamma$  calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IFN- $\gamma$  recombinante.

**GRÁFICA 4.50.** Evolución de la concentración de interferón- $\gamma$  en el curso de la infección intraperitoneal con *T. vaginalis* tras el tratamiento con CTP (días -10 a 0 p.i.).

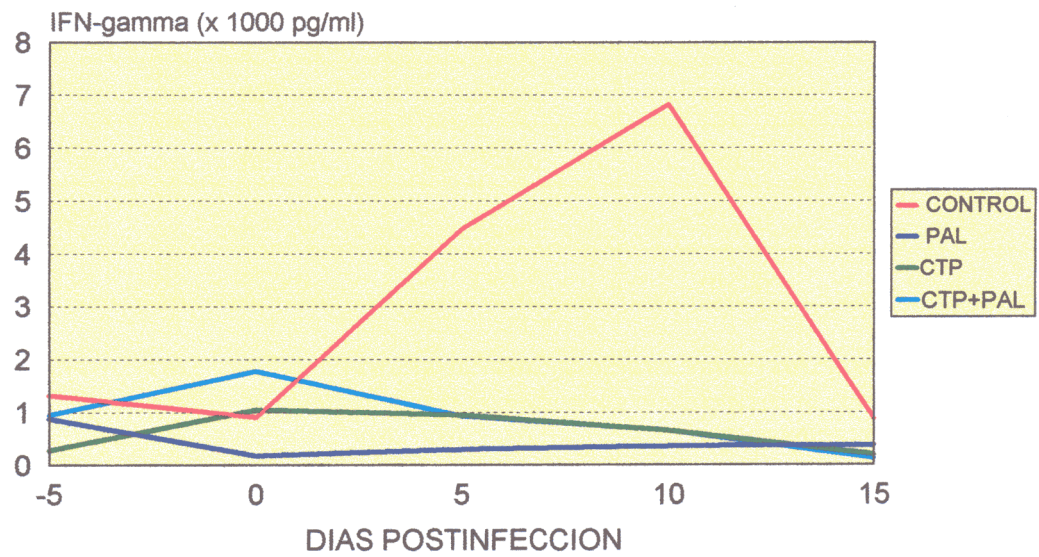
**TABLA 4.101.** Dinámica de la concentración sérica de IFN- $\gamma$  en ratones BALB/c infectados con *T. vaginalis* Y tratados con PAL+CTP (GRUPO PAL+CTP).

DÍAS POSTINFECCIÓN	D.O. 1	D.O. 2	D.O. $\bar{x}$	IFN- $\gamma$ (pg/ml)
-5	0,175	0,123	0,149	880,325
0	0,343	0,214	0,278	1770,805
5	0,156	0,150	0,153	907,830
10	0,118	0,113	0,115	649,967
15	0,046	0,033	0,039	127,360

En la tabla se expresan los valores medios de densidad óptica ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) y la concentración de IFN- $\gamma$  calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IFN- $\gamma$  recombinante.

**GRÁFICA 4.51.** Evolución de la concentración de interferón- $\gamma$  en el curso de la infección intraperitoneal con *T. vaginalis* tras el tratamiento con CTP (días -10 a 0 p.i.).

**GRÁFICA 4.52.** Sinopsis de la evolución de la concentración de IFN- $\gamma$  en los lotes control, y tratados con PAL, CTP, PAL+CTP.

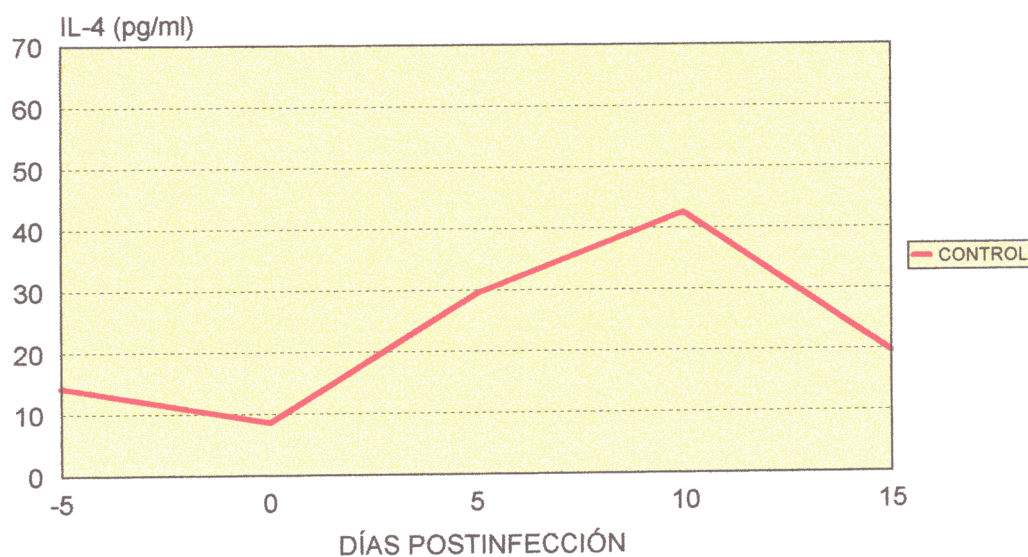


**TABLA 4.102.** Dinámica de la concentración sérica de IL-4 en ratones balb/c infectados con *T. vaginalis* (GRUPO CONTROL).

DÍAS POSTINFECCIÓN	D.O. 1	D.O. 2	D.O. $\bar{x}$	IL-4 (pg/ml)
-5	0,126	-	0,126	14,295
0	0,102	0,105	0,103	8,490
5	0,160	0,209	0,184	29,389
10	0,264	0,207	0,235	42,540
15	0,169	0,125	0,147	19,710

En la tabla se expresan los valores medios de densidad óptica ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) y la concentración de IL-4 calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón IL-4 recombinante.

**GRÁFICA 4.53.** Evolución de la concentración de interleucina-4 en el curso de la infección intraperitoneal de ratones BALB/c con *T. vaginalis* (grupo control).

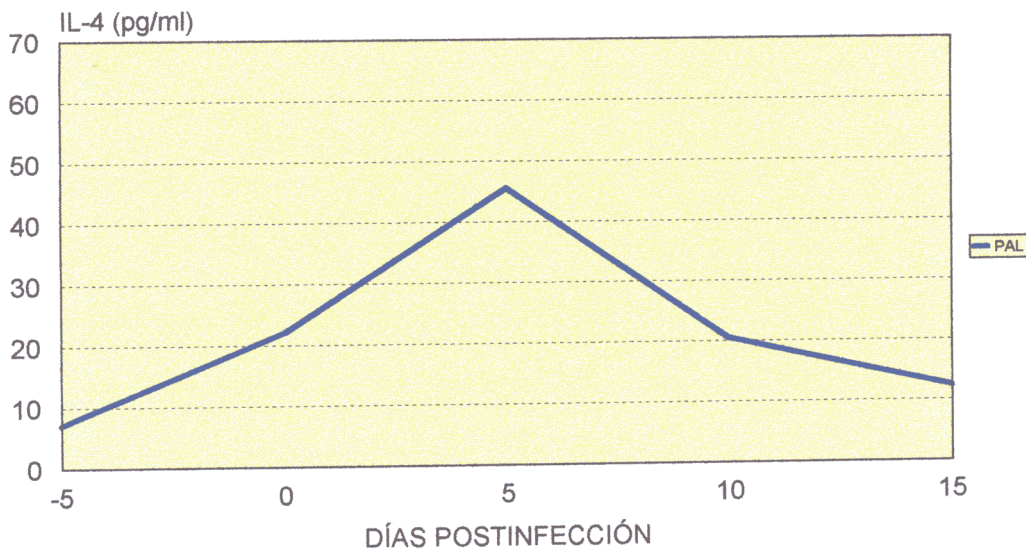


**TABLA 4.103.** Dinámica de la concentración sérica de IL-4 en ratones BALB/c infectados con *T. vaginalis* y tratados con PAL (GRUPO PAL).

DÍAS POSTINFECCIÓN	D.O. 1	D.O. 2	D.O. $\bar{x}$	IL-4 (pg/ml)
-5	0,098	-	0,098	7,071
0	0,156	0,155	0,155	22,036
5	0,248	0,246	0,247	45,510
10	0,150	-	0,150	20,487
15	0,121	0,116	0,118	12,350

En la tabla se expresan los valores medios de densidad óptica ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) y la concentración de IL-4 calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IL-4 recombinante.

**GRÁFICA 4.54.** Evolución de la concentración de interleucina-4 en el curso de la infección intraperitoneal con *T. vaginalis* tras el tratamiento con PAL (días -10 a 0).



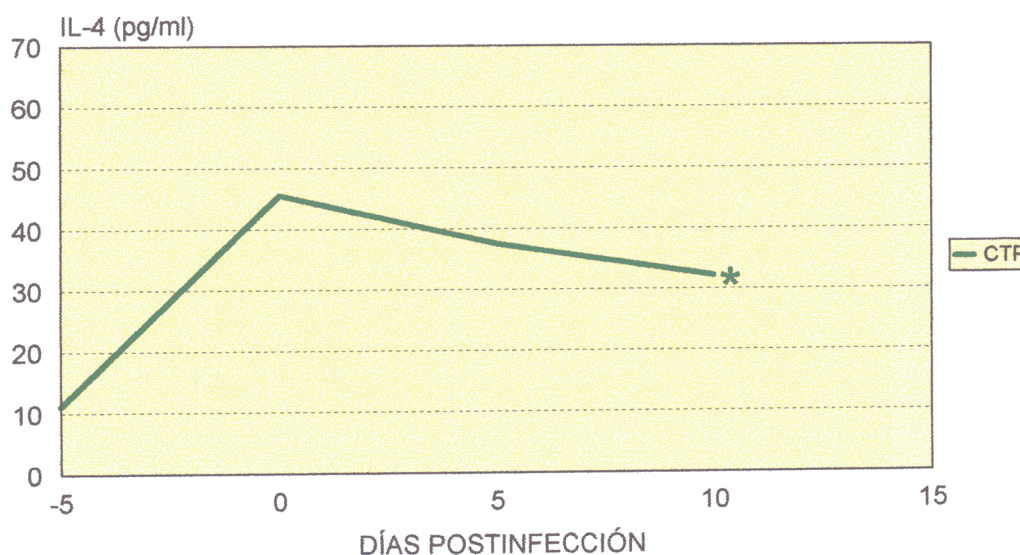


**TABLA 4.104.** Dinámica de la concentración sérica de IL-4 en ratones balb/c infectados con *T. vaginalis* y tratados con CTP (GRUPO CTP).

DÍAS POSTINFECCIÓN	D.O. 1	D.O. 2	D.O. $\bar{x}$	IL-4 (pg/ml)
-5	0,104	0,123	0,113	11,100
0	0,277	0,217	0,247	45,510
5	0,231	0,200	0,215	37,380
10	0,195	-	0,195	32,090
15	-	-	-	-†

En la tabla se expresan los valores medios de densidad óptica ( $\lambda = 450$  nm) y la concentración de IL-4 calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IL-4 recombinante.

†) No se dispone de suero del día decimoquinto ya que los ratones de dicho lote habían muerto previamente.

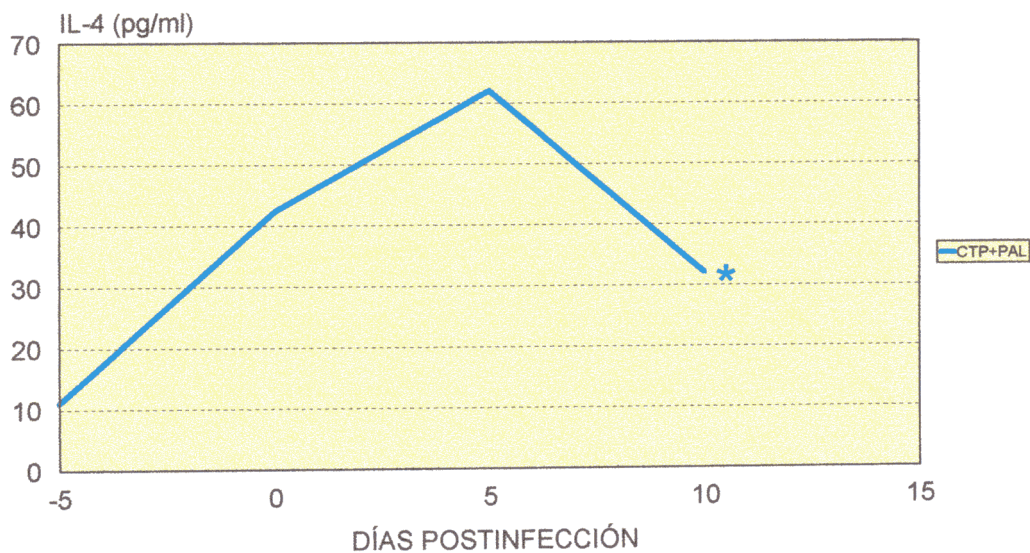
**GRÁFICA 4.55.** Evolución de la concentración de interleucina-4 en el curso de la infección intraperitoneal con *T. vaginalis* tras el tratamiento con CTP (días -10 a 0). El asterisco señala la última determinación disponible.

**TABLA 4.105.** Dinámica de la concentración sérica de IL-4 en ratones BALB/c infectados con *T. vaginalis* y tratados con PAL+CTP (GRUPO PAL+CTP).

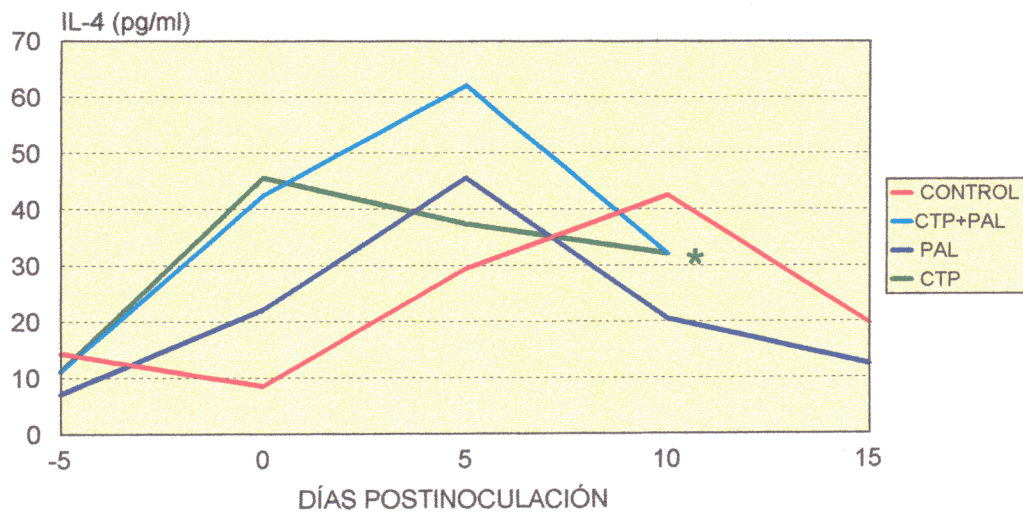
DÍAS POSTINFECCIÓN	D.O. 1	D.O. 2	D.O. $\bar{x}$	IL-4 (pg/ml)
-5	0,104	0,123	0,113	11,060
0	0,311	0,159	0,235	42,410
5	0,311	-	0,311	62,020
10	0,195	-	0,195	32,090
15	-	-	-	-†

En la tabla se expresan los valores medios de densidad óptica ( $\lambda = 450 \text{ nm}$ ) y la concentración de IL-4 calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IL-4 recombinante.

†) No se dispone de suero del día decimoquinto ya que los ratones de dicho lote habían muerto previamente.

**GRÁFICA 4.56.** Evolución de la concentración de interleucina-4 en el curso de la infección intraperitoneal con *T. vaginalis* tras el tratamiento con PAL+CTP (días -10 a 0). El asterisco señala la última determinación disponible.

**GRÁFICA 4.57.** Sinopsis de la evolución de la concentración de IL-4 en los lotes CONTROL y tratados con PAL, CTP y PAL+CTP. El asterisco señala la ausencia de suero disponible el decimoquinto día por el deceso de los ratones supervivientes.





## **DISCUSIÓN**

---



## 5.- DISCUSIÓN

### 5.1. CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VITRO*

#### 5.1.1. Sobre el cribado farmacológico in vitro frente a *T. vaginalis*

*Trichomonas vaginalis* es un arquetípico modelo experimental en el cribado farmacológico antiprotozoósico de organismos de metabolismo anaerobio. Las características del flagelado, que tiene un ciclo biológico muy corto (máximo crecimiento entre 24 y 48 horas), sin formas de resistencia (quistes), la escasa dificultad que conlleva su cultivo (medio Diamond modificado) y el nulo riesgo para el experimentador que manipula razonablemente los cultivos, permiten el diseño de un ensayo farmacológico primario rápido, económico y fiable, que son cualidades fundamentales en la valoración biológica de potenciales principios activos (de síntesis o naturales) frente a agentes infecciosos (parásitos).

La técnica utilizada en nuestro laboratorio, donde se evalúan productos de síntesis o extractos vegetales como antiprotozoósicos, sigue el método propuesto por Howes (1969), salvo que los productos a ensayar se adicionan 6 horas después de la resiembra, momento en el que se inicia el crecimiento logarítmico, y que permite observar y registrar independientemente la actividad citocida y citostática (Herrero *et al.*, 1992). Para ello, calculamos el índice de crecimiento (IC) en cada lote ensayado, incluido los controles. Este IC es el cociente entre el nº de tricomonádidos al final del periodo de incubación (24 o 48 horas) y el nº existente en la hora 0 (o de adición del potencial fármaco). Cuando el IC es mayor que uno ( $IC > 1$ ), se calcula el porcentaje de actividad citostática (%AC) para los productos de síntesis o el porcentaje de crecimiento (%C) para los productos naturales, esto se explica porque los extractos vegetales, con relativa frecuencia, no sólo no inhiben el crecimiento de los protozoos sino que lo favorecen probablemente por la presencia de azúcares o lípidos que son utilizados como nutrientes suplementarios.

Ambos índices señalan en qué proporción se inhibe la división de los flagelados en presencia del producto. Si el IC es menor que uno ( $IC < 1$ ), el parámetro establecido es el

porcentaje de reducción (%R) y expresa en qué proporción la presencia del compuesto es capaz de eliminar los tricomonádidos presentes en el inóculo inicial.

Desde el punto de vista de la síntesis, los métodos clásicos para la búsqueda de nuevos compuestos químicos útiles en la terapéutica antiprotozoósica son tres: la aproximación empírica, racional y selectiva.

El cribado empírico recoge la evaluación de la actividad biológica de un gran número de compuestos sin antecedentes de la actividad buscada. El éxito evidente de este método radica en la cantidad de productos que se someten al ensayo que, por tanto, debe ser lo más sencillo y rápido posible en esta etapa inicial.

La aproximación racional parte de un conocimiento exhaustivo de la biología molecular del parásito, o al menos, de las rutas metabólicas que pueden ser bloqueadas sin perjuicio para el hospedador; el cual elude el daño por una toxicidad diferencial (cualitativa o cuantitativa) en relación a dicho proceso. En contra del método racional se argumenta la limitación que la selección de una diana provoca, respecto al conjunto de procesos bioquímicos que, potencialmente, podrían señalarse como objetivos diferenciales (parásito/hospedador). Llegándose a señalar que, *si la aproximación racional es irrestible y la empírica humillante, ésta última es provechosa y la primera infructuosa* (Campbell, 1983, citado por Martínez Grueiro, 1987).

Finalmente, la aproximación selectiva surge de la cooperación del cribado empírico y racional, por cuanto las observaciones empíricas son utilizadas para incrementar la actividad o reducir la toxicidad de los compuestos químicos en los que se ha detectado actividad farmacológica.

En este área se puede circunscribir, habitualmente, nuestro trabajo, ya que partiendo de un compuesto que se ha mostrado activo (cabeza de serie), se plantea la síntesis de otros nuevos, introduciendo múltiples modificaciones (análogos estructurales).



Si, habitualmente, nuestra aportación en la búsqueda de nuevos agentes quimioterápicos se ha centrado en la aplicación de modelos de cribado empírico y selectivo, en el futuro, el apoyo al método de aproximación racional, deberá ser un objetivo prioritario. En cualquier caso, mientras el futuro nos alcanza, se presenta la evaluación farmacológica selectiva de tres series de productos de síntesis con potencial actividad antiprotozoósica.

#### 5.1.2. Sobre la actividad antiprotozoósica de los compuestos de síntesis ensayados

##### 5.1.2.1. Actividad de los derivados de tetrahidro-2H-1,3,5-tiadiazin-2-tionas.

Esta serie incluye derivados con demostrada actividad antibacteriana, antifúngica, antivírica y antihelmíntica como profármacos (Ertan *et al.*, 1992). La actividad antimicrobiana de estos compuestos parece residir en los ácidos isotiocianico y ditiocarbámico, que se forman por hidrólisis del anillo de las tiadiazinas disustituidas. En virtud de la situación descrita, se sintetizaron nuevos compuestos (Suárez *et al.*, 1996; Pérez *et al.*, 1997) con posible actividad antiprotozoósica, probablemente, relacionada con la inhibición de cisteín-proteinasas.

La presencia de cisteín-proteinasas ha sido detectada en la mayoría de los grupos de protozoos parásitos. Una nueva aproximación en la investigación de fármacos antiprotozoósicos es el diseño de profármacos que pudieran inactivar la cisteín-proteinasas del parásito (North *et al.*, 1990). Toda vez que la interacción entre el isotiocianato y la cisteína ha quedado demostrada (Goksoyr, 1964), los derivados de tiadiazinas disustituidas parecen constituirse en firmes candidatos para la inhibición de las proteinasas.

Rieche *et al.* (1966) señalan que la naturaleza del sustituyente de la posición 3 influye significativamente sobre la actividad antimicrobiana y, además, los sustituyentes en la posición 5 promueven una mayor toxicidad. La actividad óptima se obtiene en compuestos que presentan grupos lipofílicos en la posición 3 e hidrofílicos en la posición 5.

En este contexto y siguiendo nuestro interés en fármacos antiprotozoósicos (Atienza *et al.*, 1992), se han sintetizado y ensayado 34 nuevos compuestos derivados de tetrahidro-2H-

1,3,5-tiadiazin-2-tiona frente a *T. vaginalis* y *Trypanosoma cruzi*. De una parte, la presencia en la posición 5 del radical carboxialquil disminuye la toxicidad del compuesto frente a células humanas (Ertan *et al.*, 1992), y de otra, en la posición 3 se unen, alternativamente, 4 tipos de sustituyentes que modifican la naturaleza de los derivados de tiadizinas. Los radicales implicados son (a) furfurilo (1a:1n), (b) ciclohexilo (2a:L-2n), (c) pentacarboxil (3a:L-3n) y (d) 2'-etanocarboxil (4a).

En cuanto a la actividad farmacológica, todos los derivados de tiadiazinas ensayados, excepto L-1e, muestran una muy importante propiedad tricomonocida, oscilando sus actividades entre el 93% y el 100% a 100 µg/ml. Los compuestos D-1j y 1m mantienen su eficacia a 10 µg/ml con porcentajes de reducción (%R) del 100% y 94% respectivamente, para también 1m (1 µg/ml) mantener un porcentaje de reducción del 59%, con un efecto tricomonocida próximo al que produce metronidazol a 0,1 µg/ml (%R=52%). Además los compuestos tiadiazínicos tipo (b) y (c) muestran leves actividades citostáticas a ambas dosis (10 y 1 µg/ml).

La naturaleza de los sustituyentes en la posición 3 y 5 no introduce importantes diferencias en la actividad tricomonocida (% reducción) de las series estudiadas, ya que la mayoría de los compuestos pierde su actividad tricomonocida a 10 µg/ml; este hecho parece indicar que, el carácter de los sustituyentes de la posición 3 ensayados, no influye demasiado en la actividad tricomonocida *in vitro*. Con respecto a la estereoisomería de los compuestos, D-1j (C.M.C. ≤ 10 µg/ml) fue más tricomonocida que L-1j (C.M.C. ≤ 100 µg/ml).

Ninguno de los compuestos resulta más activo que metronidazol.

Se debe señalar que todos los compuestos muestran una alta actividad tripanocida a 100 µg/ml con un rango de reducción entre el 95-100%, con la sola excepción de L-1e y 3h (%R=83,00 y 89,00 respectivamente). La concentración mínima citocida (C.M.C.) de la mayoría de los compuestos es menor o igual a 10 µg/ml; mucho menor que la producida por nifurtimox (10-100 µg/ml).

Para concluir, se ha probado la actividad citotóxica de la mayoría de estos productos sobre células HeLa (Pérez *et al.*, 1997) y, en general, muestran una fuerte toxicidad. Los derivados tiadiazínicos tipo (a) tienen una concentración inhibitoria ( $CI_{50}$ ) menor de 5  $\mu\text{g/ml}$ , lo que da una idea de la fuerte toxicidad inespecífica. En los (b) la  $CI_{50}$  es, generalmente, mayor de 10  $\mu\text{g/ml}$ , con valores superiores e inferiores muy próximos a esta concentración. En el caso de los derivados tipo (c) es el 3m el de mayor toxicidad inespecífica, el resto de los valores tienen una  $CI_{50}$  cercana a 10  $\mu\text{g/ml}$ . El producto 3p es muy tóxico, si se prueba en el momento de la disolución del producto, pero con el tiempo pierde parte de su actividad (Muelas, 1998).

No obstante, puesto que han demostrado ser citotóxicos sobre líneas celulares tumorales, su actividad como posibles anticancerosos no ha sido descartada (Ochoa, 1998).

#### 5.1.2.2. Actividad de la serie CP -tieno(2,1)benzotiazepinas S,S-dióxidos y dibenzo(c,f)tiazepinas S,S-dióxidos-.

Las benzotiazepinas, clásicamente, se han identificado con compuestos bloqueadores de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  (clase III) y se prescriben para el tratamiento de trastornos cardiovasculares, como la angina de pecho, la hipertensión, la arritmia, entre otros usos. El mecanismo de acción parece ser la interacción con la glicoproteína del canal. Es muy probable que la eficacia como antihipertensores de los bloqueantes de los canales de  $\text{Ca}^{2+}$  se deba a su capacidad natriurética (eliminación de  $\text{Na}^+$ ) (Avendaño, 1994).

No obstante, el ensayo como antiprotozoósicos no parece obedecer a ningún criterio *a priori* relacionado con su estructura, al menos, según la información de que disponemos.

En cualquier caso, su analogía estructural con las fenotiazinas (Chan *et al.*, 1998), inhibidores clásicos de la tripanotión reductasa, les hacen buenos candidatos como potenciales agentes tripanocidas.

En el cribado farmacológico antiprotozoósico frente a *T. vaginalis* de la serie CP destacan dos compuestos: CP-20 con un porcentaje de reducción del 100% (100  $\mu\text{g/ml}$ ) y una

actividad citostática entre 20-40% (10 µg/ml), y CP-216 que presenta asimismo un porcentaje de reducción del 100% (100 µg/ml) y una actividad citostática que oscila entre el 60 y 30% (10 µg/ml) en los recuentos a 24 y 48 horas, respectivamente.

Además, los productos CP-1, CP-5, CP-7, CP-47, CP-169 y CP-237 presentan una actividad citostática superior al 50% tanto a 24 como a 48 horas. Ningún significado especial merecen los porcentajes de reducción a 48 horas de los productos CP-1 y CP-5 que son debidos a los bajos índices de los testigos.

#### 5.1.2.3. Actividad de la serie de las aminas acomplejadas con Cu<sup>2+</sup>.

Los compuestos 6-ACA y D-ASPA tienen una actividad citocida próxima al 100% tanto a 24 horas como 48 horas para las concentraciones 100 y 10 µg/ml, presentando para 1 µg/ml porcentajes de actividad citostática inferiores al 50%. El resto de las aminas acomplejadas con Cu<sup>2+</sup> (2-AIB, T-2AIB, T-DASPA y L-ALN) a 100 µg/ml muestran porcentajes de reducción en torno al 100%, excepto L-ASPA que, únicamente, alcanza un 2,56%. A la concentración intermedia (10 µg/ml), T-2AIB y T-DASPA muestran una actividad citostática alrededor del 85%. Mientras que, L-ASPA, L-ALN y 2-AIB, presentan un 68%. La inhibición del crecimiento para T-2AIB, T-DASPA, L-ASPA, L-ALN y 2-AIB, a la concentración de 1 µg/ml, desciende a niveles generalmente inferiores al 30%.

Los compuestos derivados de aminas acomplejadas con Cu<sup>2+</sup> presentan cierta analogía estructural con derivados de tiadiazinas y, quizás, 5-nitroimidazoles, lo que parece haber determinado su elección para los ensayos como potenciales agentes antiprotozoosicos.

Por otra parte, es imprescindible contemplar otras alternativas en el desarrollo farmacológico; además de los productos de síntesis, conviene recordar que los productos de origen natural ofrecen una vía alternativa.

### 5.1.3. Cribado farmacológico antiprotozoósico de extractos vegetales iberoamericanos

En el cribado farmacológico de extractos vegetales frente a *T. vaginalis*, únicamente CNL (Tablas 4.33 y 4.34), procedente de las hojas de *Neurolaena lobata*, ha presentado un 100% de actividad citocida al cabo de 24 horas para la concentración de 1 mg/ml; además para el ensayo a 0,5 mg/ml en 48 horas se produce un porcentaje de reducción (%R) del 90,14%. No obstante, para la concentración inferior ensayada (0,1 mg/ml), se obtiene una actividad citostática (%AC) próxima al 56% (%C<sub>24-48</sub>:44,21-43,10), tanto a 24 como a 48 horas.

El extracto CNL, se ha ensayado frente a formas epimastigotes de *T. cruzi* en nuestro laboratorio, con porcentajes de actividad tripanocida del 95% a 1 y 0,5 mg/ml.

Estos resultados son coherentes con los presentados por Cáceres y otros (1998), con otro extracto de la misma planta; asimismo Berger y colaboradores (1998) coinciden en la observación de la actividad citocida frente a *T. cruzi*.

El análisis fitoquímico del extracto realizado por Villar y colaboradores (1997) destaca la presencia de flavonoides como potenciales agentes de la actividad tripanocida. CNL es, sin duda, el extracto vegetal más prometedor como agente antiprotozoósico, de cuantos se hayan ensayado en nuestro laboratorio en los dos modelos: *T. vaginalis* y *T. cruzi*.

Por su parte, los extractos SCP y CBT (Tablas 4.9 y 4.10) manifiestan actividades citostáticas entre el 60% (%C<sub>24-48</sub>:37,99-45,62) y 70% (%C<sub>48</sub>:32,51) respectivamente, para la concentración de 1 mg/ml.

A continuación, el extracto CMC de *Mikania cordifolia* (Tablas 4.9 y 4.10) muestra una actividad citostática que ronda el 40% a las concentraciones de 1 (%C:54,10), 0,5 (%C:66,12) y 0,1 mg/ml (%C:64,20) a 24 horas, que se mantiene a la mayor concentración al cabo de 48 horas. Los prometedores resultados condujeron al fraccionamiento de este último extracto, en aras de purificar el principio activo presente en el extracto bruto. De los

subextractos seleccionados por el método de solventes que se recoge en MATERIAL Y MÉTODOS, las fracciones CMC-B (f. metanólica) y CMC-C (f. butanólica) (Tablas 4.12 y 4.14) presentan una actividad citostática a 1 mg/ml del 75% y que se mantiene al 74,27% para CMC-C (0,5 mg/ml), pero que desciende al 66,12% para CMC-B (0,5 mg/ml) en las primeras 24 horas. Posteriormente, CMC-B pierde su actividad citostática a 48 horas mientras que CMC-C mantiene a 1 mg/ml una actividad citostática del 64,74% y 42,75% a 0,5 mg/ml. Por contra, las fracciones CMC-A y CMC-D carecen de actividad tricomonocida.

Finalmente, merece especial mención el extracto PPN de *Scutia buxifolia* (Tabla 4.17) que presenta una actividad citostática del 48,88% en las primeras 24 horas de contacto, para mitigarse más tarde.

También destaca el extracto CSM (Tabla 4.22) que en el recuento a 48 horas parece manifestar cierta actividad citostática, que oscila entre el 38,72% a 1 mg/ml y 66,02% a 0,1 mg/ml; esta circunstancia es un tanto inusual pero perfectamente explicable ya que, en ocasiones, cuanto menor es la concentración, obviamente hasta cierto punto, mejor es la disolución del extracto y por tanto la disponibilidad del principio activo se ve reforzada; o bien, el efecto observado es fruto de la falta de sincronización de los cultivos tras la dispensación de dicho extracto que puede actuar meramente como una fuente adicional de nutrientes. Además conviene señalar que de las fracciones del extracto APB cribadas frente a *T. vaginalis*, sólo APB-C (f. butanólica) (Tablas 4.23 y 4.24) presenta una actividad citostática sostenida al cabo de 48 horas en torno al 45% para 1 mg/ml, 40% para 0,5 mg/ml y 20% para 0,1 mg/ml. Por último y por ello no menos importante, el extracto MMT (Tablas 4.33 y 4.34), cuya actividad citostática, cercana al 40% a 24 horas, aumenta de forma espectacular al cabo de 48 horas para alcanzar un 85% a la mayor concentración ensayada (1 mg/ml). Aún más, al cabo de 48 horas persiste una actividad inhibidora del crecimiento de los flagelados del 20% a la concentración de 0,1 mg/ml.

El resto de los extractos ensayados en el modelo de cribado farmacológico *in vitro*, frente a *T. vaginalis*, manifiestan actividades citostáticas inferiores al 40%, carentes de interés para la consecución de uno de nuestros objetivos prioritarios, cual es la búsqueda de nuevos

---

principios vegetales de naturaleza antiprotozoósica.

Por otra parte, los porcentajes de crecimiento establecidos por algunos extractos, que superan de manera muy significativa el máximo crecimiento de los cultivos no tratados (testigos), nos deben invitar a la reflexión sobre posibles actividades biológicas que expliquen fehacientemente estos resultados.

En este sentido, podemos destacar el extracto PAL de *Polypodium leucotomos* (Tablas 4.31 y 4.32) que en un modelo de linfoproliferación (Sempere, 1996) ha confirmado cierta capacidad moduladora de la división celular, coincidiendo con porcentajes de crecimiento superiores a los de los cultivos control en nuestro modelo de cribado.

No obstante, para otros extractos como CTD, CGV (Tablas 4.19 y 4.20), SCP-C y SCP-D (Tablas 4.26 y 4.28) no se han señalado propiedades moduladoras del crecimiento celular, a pesar de los elevados índices de crecimiento que acreditan en los ensayos de farmacología experimental realizados. Por lo que habrá que aceptar la posibilidad de que algunos extractos actúen como suplementos nutricionales de los medios de cultivo exclusivamente. Además, los cultivos de flagelados tratados con el extracto CTP (Tablas 4.33 y 4.34), que ha demostrado atesorar cierta actividad moduladora de la proliferación celular, presentan índices de crecimiento en el cribado farmacológico análogos a los que presentan los controles, por lo que parece arriesgado establecer conclusiones ajenas a la actividad antiprotozoósica con los parámetros del cribado farmacológico *in vitro*.

## 5.2. MODELO DE PATOGENIA EXPERIMENTAL DE *T. vaginalis*

Uno de los desafíos más sugerentes, que presenta la investigación en *T. vaginalis*, es averiguar la razón de la alta variabilidad existente en la patogenia mostrada tanto clínica como experimentalmente.

La caracterización de la heterogeneidad intraespecífica de nuestro modelo puede efectuarse a través del estudio del perfil biológico de aislamientos de diferente grado de patogenia. Al abordar este trabajo, nos hemos planteado la revisión de un modelo murino de infección experimental, que nos permita disponer de un método fiable de evaluación de la patogenia, como criterio de catalogación de los aislamientos naturales.

Tal modelo permite, de una parte, conocer la capacidad de infección del parásito expresada mediante un índice de patogenia, obtenido de la necropsia y la valoración de las lesiones características, así como conocer la susceptibilidad a la infección de distintas cepas de ratón. De otra parte, y una vez seleccionadas las condiciones y cepa de ratón más idóneas, el modelo está en disposición de ser utilizado para el cribado farmacológico *in vivo*.

El fundamento de la técnica radica en la inoculación intraperitoneal de *T. vaginalis* en ratón y la subsecuente observación de las lesiones producidas. Cabe pues, inicialmente, plantearse la conveniencia de la vía de inoculación. La elección de dicha vía se apoya en los trabajos clásicos de patogenia (Reardon *et al.*, 1961; Teras & Roigas, 1966 y Cavier, 1972). Además de la experiencia más próxima de Toyos (1974), de quien se recoge el método de valoración de la necropsia y cuya optimización es uno de nuestros objetivos. La sencillez de la técnica, a pesar de que la localización del parásito difiere de la habitual en las infecciones naturales, permite su aplicación en el cribado farmacológico de rutina. El ensayo se inicia con la concentración y posterior inoculación de una cepa virulenta de *T. vaginalis* en un lote de ratones; para, a continuación, realizar el tratamiento con potenciales fármacos y observar los cambios en el porcentaje de mortalidad o índice de patogenia comparado con los de los controles no tratados.



En cuanto a las vías alternativas, la infección subcutánea ha sido uno de los modelos desarrollados con más éxito. Siendo suscrito por Honigberg (1961), Frost y Honigberg (1962), Kulda *et al.* (1974) y Honigberg *et al.* (1984).

Bajo condiciones controladas, el porcentaje de crecimiento de la lesión y la duración de la fase progresiva de su desarrollo es característico de la cepa tomada. En consecuencia, el volumen de la lesión puede ser utilizado para estimar la virulencia de una cepa.

Sin embargo, la ausencia de pericia en la medición de las lesiones, la muestra requerida (dado que se precisa la valoración de 30 abscesos intactos, para obtener datos reproducibles); además de la frecuente ruptura del absceso, son entre otros, los factores que desaconsejaron el empleo de dicha vía.

Por otro lado, la alternativa de la infección experimental intravaginal presenta el aliciente de la localización del parásito, que es similar a la observada en la infección natural. No obstante, la necesidad de tratamientos previos con derivados estrogénicos para instaurar adecuadamente el parásito, la realización de inoculaciones repetidas (o bien, una dosis simple con un inóculo muy elevado) e incluso el variable porcentaje de infección, entre el 15-100% según el estudio y número de animales inoculados, hacen poco práctica tal vía de inoculación. En último caso, este método largo y laborioso debería estar reservado, en el terreno del cribado farmacológico, al ensayo de compuestos seleccionados previamente mediante un proceso más rápido.

El establecimiento del modelo murino intraperitoneal requiere la caracterización de los agentes que participan en la interacción parásito-hospedador. De una parte, el parásito debe poseer un alto grado de infectividad, a tal efecto, se ha dispuesto de la cepa C1-NIH de *T. vaginalis* procedente de la ATCC (Maryland, U.S.A.). La elección de dicha estirpe, ha supuesto una contribución decisiva para el desarrollo y la validación del modelo, siendo muy apta para los estudios de patogenia en ensayos intraperitoneales murinos, según su descripción en el catálogo de la ATCC y la bibliografía (Reardon, 1961).

Según los datos publicados por Teras & Roigas (1966), las cepas de baja virulencia, que circulan en la naturaleza, constituyen el 10%, según un amplio estudio epidemiológico. Las cepas de alta y media virulencia se dividen a partes iguales, constituyendo el 90% restante.

Sin embargo, el descenso en la virulencia después del mantenimiento en cultivos axénicos durante tiempo prolongado (Coombs, 1987), o tratamientos con antibióticos (Ivey & Hall, 1964; Ivey, 1975) justifican que cepas aisladas en nuestro laboratorio, de cierto grado patogénico no sean útiles en estos ensayos en el momento presente, en coherencia con los resultados obtenidos por Laan (1965) y Laan y colaboradores (1966). Si bien se ha propuesto la inoculación intraperitoneal en ratón como método para recuperar la patogenicidad, su resultado práctico nos parece incierto. Por tanto, la conservación en N<sub>2</sub> líquido a -196 °C en crioviales es el único método fiable, a nuestro juicio, para preservar la patogenia contrastada de una estirpe (Yaeger, 1988).

Puesto que nos enfrentamos a un diseño experimental que debe contemplar numerosas variables, parece recomendable que la revisión se efectúe con una cepa de referencia catalogada como patógena (*T. vaginalis* cepa C1-NIH), la cual debe manipularse en condiciones adecuadas para preservar su virulencia.

En cuanto a la cepa de hospedador (ratón), en la descripción del modelo de Toyos (1974) se omite la realización de un estudio previo para determinar la susceptibilidad a la infección. De forma intuitiva, se puede definir dicha susceptibilidad como la facilidad con que se establece una infección experimental en una cepa de ratón, esto es, la capacidad de inducir lesiones productivas en órganos característicos originando focos necróticos o abscesos tricomonádidos (Bogovsky & Teras, 1958). Uno de los objetivos de esta Memoria es estudiar la susceptibilidad murina a la cepa de referencia.

En nuestro caso, se ha contado con cuatro cepas murinas; dos no consanguíneas (CD-1, NMRI) y dos consanguíneas (BALB/c y C57Bl/10J). Los resultados obtenidos relativos a la susceptibilidad del hospedador se discuten a continuación.

Los índices de patogenicidad registrados tras la infección experimental intraperitoneal son muy similares en las cepas no consanguíneas NMRI y CD-1, con un valor medio de 17,90 y 17,88, respectivamente, no estimándose diferencias estadísticamente significativas en las pruebas en el intervalo de 15 y 30 días.

Al utilizar la cepa consanguínea C57Bl/10J se obtiene un índice de patogenicidad, con un valor medio de 19,40, relativamente superior a los índices obtenidos en las pruebas con las cepas no consanguíneas. Igualmente no se observan diferencias significativas entre las experiencias a 15 y 30 días.

Por último, la valoración de la patogenicidad en la otra cepa consanguínea BALB/c muestra un índice de patogenicidad muy superior, con un valor medio de 39,25, en los periodos de observación de 15 y 30 días. Lo que nos permite postular que BALB/c, de las estirpes de ratón probadas, posee la mayor susceptibilidad a la cepa patógena C1-NIH de *T. vaginalis*. Los resultados obtenidos son coherentes con los de Landolfo *et al.* (1979) en cuanto a dicha cepa y confirman el buen criterio de Toyos al seleccionar una cepa endogámica.

Sin embargo, no se puede afirmar que, en general, las cepas consanguíneas sean más susceptibles al parásito que las no consanguíneas, según se desprende de los datos que nos ofrece el ensayo con la cepa C57Bl/10J -seleccionada por su alto nivel de respuesta inmunogénica-. En cualquier caso, la consanguinidad es un factor genético que no tiene, necesariamente, que implicar un mayor nivel de respuesta inmunológica.

No obstante, hay que resaltar el interés en la consecución de experimentos homogéneos para comparar los resultados obtenidos en distintas pruebas. El empleo de individuos consanguíneos favorece dicha uniformidad en los ensayos.

A pesar de ello, Delachambre (1981) indica que las pruebas de virulencia basadas en la inoculación intraperitoneal ó subcutánea son poco fiables en determinadas condiciones experimentales. La imposibilidad de obtener resultados reproducibles está basada, según sus postulados, en la heterogeneidad de las reacciones frente al parásito por parte del hospedador

de una misma cepa. Este efecto individual hace necesario un estudio estadístico en toda apreciación de la misma naturaleza. Kulda (1990) critica las conclusiones expuestas por el investigador francés achacando sus resultados exclusivamente a las condiciones de investigación.

De forma simultánea a la selección de cepa de ratón más adecuada para el modelo, se ha realizado la evaluación del tiempo de desarrollo experimental para acometer la necropsia de los ratones infectados que no han muerto en el proceso.

La duración óptima de la prueba es el resultado de un compromiso entre la brevedad que se exige a cualquier experiencia de patogenia, muy especialmente si se contempla la vertiente de su aplicación posterior al cribado farmacológico, y la presencia de forma patente de las lesiones características (peritonitis fibrinopurulenta con abscesos y focos necróticos en órganos abdominales) en el roedor.

A este respecto, mientras algunos autores (Teras & Roigas, 1966; Toyos, 1974) proponen 11 días como duración experimental, otros consideran necesario alargar el tiempo de observación (Cavier, 1972). En esta línea, Kulda (1990), en un ensayo en que inocula  $10^6$  tricomonádidos, recomienda el seguimiento durante 21 días, en virtud a que los testigos mueren entre el 5º y el 21º días postinfección. Para este autor limitar la experiencia a 10 días puede hacer disminuir la sensibilidad del ensayo.

Ante esta disyuntiva, planteamos en nuestro trabajo el desarrollo de experimentos en dos periodos de observación (15 y 30 días) para discriminar la duración más idónea. Los índices de patogenia resultantes no parecen ser estadísticamente diferentes para la cepa de ratón más susceptible, BALB/c, por lo que se recomienda el análisis a los 15 días para la evaluación de la infección experimental.

Finalmente, en cuanto al método de valoración de las lesiones y la mortalidad propuesto por Toyos, es necesario reconocer el meritorio esfuerzo realizado para diseñar de forma tan pormenorizada la valoración de lesiones por órganos considerando su extensión. Lo que

permite la cuantificación de un índice de patogenia individual; siendo la media resultante del lote de ratones, el índice de patogenia de la cepa. En la tabla 5.2. se resume el diseño experimental de distintos métodos de valoración.

**TABLA 5.2.** Ensayos murinos de infección intraperitoneal de *T. vaginalis* que emplean la cuantificación de las lesiones y la mortalidad como criterios para la evaluación de la patogenia con nuestro diseño experimental.

VARIABLES	A	B	C	D
<b>Ratón</b>				
Peso	18-20 g	18-20 g	18-20 g	20-25 g
Nº/lote	10-12	10-20	10-20	10
<b>Inóculo</b>				
Nº parásitos	$4 \times 10^6$ / ratón	$10^6$ / ratón	$10^7$ / ml	$10^7$ / ratón
Vol. medio	0.5 ml	0.5 ml	0.8 ml	0.5 ml
<b>Observación</b> (días)	10	21	11	15
<b>Criterio</b>	Muerte. Necrosis hepática. L. estómago/bazo. Peritonitis purulenta. Presencia del parásito.	Necrosis hepática. L. pancreática. L. peritoneal/ ascitis. Presencia del parásito.	Muerte. Necrosis hepática. L. estómago/bazo/ páncreas. L. peritoneal/ascitis.	Muerte. Necrosis hepática. L. estómago/bazo/ páncreas. L. peritoneal/ascitis.
<b>Valoración</b>	Muerte en 10 días I.V. = 0 Tabla de valoración de lesiones en los supervivientes.	Valoración de cada lesión individual. 0 (nada)-4 (máximo). Ausencia de parásito se divide entre dos. Valor total = $\Sigma$ valores parciales.	Elaborada tabla de valoración de las lesiones.	Tabla de valoración de las lesiones de Toyos modificada.
<b>Virulencia</b>	0-10 /ratón	0-16 /ratón	0-50 /ratón	0-100 /ratón
Máxima	0	16	50	100
Mínima	10	0	0	0

A: Teras y Roigas (1966). Índice de virulencia (I.V.).  
B: Cavier *et al.* (1972). Índice medio de infección (I.M.I.).

C: Toyos (1974). Índice de patogenia (I.P.).  
D: Nogal Ruiz *et al.* (1997).

El método de Toyos (1974) recoge la filosofía del elaborado por los investigadores estonios Teras y Roigas (1966), siendo más objetivo aunque más complejo que el presentado por Cavier *et al.* (1972).

Habiendo sido fijados previamente los elementos primordiales del modelo, cuales son: los agentes, la vía de inoculación, el tiempo de observación y la tabla de valoración, nos hemos propuesto determinar el mínimo inóculo que, sin restar sensibilidad al método, obvie en lo posible la limitación que supone trabajar con elevadas concentraciones del parásito en los ensayos.

Se han probado tres concentraciones: 10.000.000, 5.000.000 y 1.000.000 *T.vaginalis* (*T.v.*)/ratón, que incluyen el rango más comúnmente citado en la literatura científica. Desde Toyos (1974), que trabaja con el máximo número de protozoos:  $10^7$  *T.v.*/ml, hasta Cavier *et al.* (1972) que utilizan  $10^6$  *T.v.*/ratón, pasando por Teras y Roigas (1966) que emplean 4.000.000. Sin considerar los casos especiales, como Cavier *et al.* (1972), que rebajan las cifra a 250.000 *T.v.*/ratón empleando hospedadores preparados inmunológicamente.

En nuestro caso, la elección del inóculo se realiza en función de la estirpe de ratón más susceptible a la infección experimental y del tiempo que aporte más información. En cuanto a los probados, con el inicial de  $10^7$  *T.v.*/ratón se consigue una infección intraperitoneal muy aparente, afectando de forma ostensible a órganos vitales del abdomen, lo que puede conducir a la muerte del animal. A medida que desciende la concentración del inóculo, en la prueba con 5.000.000 *T.v.*/ratón, el índice de patogenia se equipara con el de las cepas de ratón menos susceptibles probadas -NMRI y CD-1-. Para la mínima concentración de  $10^6$  *T.v.*/ratón, la infección experimental es muy poco relevante.

Por otra parte, no hay que olvidar otros aspectos, que aunque menos directamente, pueden incidir en los resultados de la valoración. Así se ha considerado el inóculo como un parámetro clave, pero no menos interesante resulta el control del volumen de inoculación, ya que la dispersión del inóculo aumenta cuanto mayor sea dicho volumen.

En coincidencia con los autores estonios (Teras & Roigas, 1966) y franceses (Cavier *et al.*, 1972) optamos por el volumen de 0,5 ml frente a 0,8 ml que propone Toyos (1974).

En último término, conviene destacar que el medio de cultivo, en cierto modo, también influye en la expresión fenotípica del parásito. De tal manera que, la presencia de componentes como agar en el medio puede favorecer los estados ameboides-adherentes de *T. vaginalis*, que los autores relacionan con las expresiones fenotípicas más virulentas (Hollander, 1976; Hollander *et al.*, 1987). El medio de cultivo que hemos empleado es el tradicional TYM (o de Diamond) sin agar; por su parte, Toyos utiliza un medio Diamond clásico enriquecido con 0,05 g de agar. Como se indicó anteriormente, la atenuación de la virulencia del parásito puede producirse por la presencia de elevadas concentraciones de antibiótico en el medio (Ivey, 1975; Honigberg, 1978). En este sentido, Toyos emplea un medio de cultivo con menor concentración de antibiótico que el nuestro, con el riesgo, por contra, de perder el carácter axénico.

En definitiva, el objetivo de este estudio ha sido procurar el perfeccionamiento de un modelo murino de patogenia intraperitoneal de *T. vaginalis*. Para, una vez conseguida la validación con la cepa de referencia, C1-NIH de *T. vaginalis*, a continuación, profundizar en el conocimiento de la posible correlación existente entre la patogenia de los aislamientos epidemiológicos y sus manifestaciones clínicas. Y en una etapa posterior, introducir las modificaciones oportunas que permitan su aplicación renovada a la quimioterapia experimental *in vivo*.

### 5.3. EVALUACIÓN PATOGENICA DE LOS AISLAMIENTOS CLÍNICOS DE LA COMUNIDAD DE MADRID (1994-1996).

El estudio epidemiológico realizado en Madrid (1994-1996) por nuestro Departamento, en colaboración con los Centros de Promoción de la Salud del Ayuntamiento, ha permitido la obtención y axenización de 18 aislamientos, lo que supone un porcentaje de prevalencia del 1,23% (Rodríguez Gallego, 1995). Esta prevalencia contrasta con los datos preestablecidos en nuestro país. Así, en un estudio publicado por Perea *et al.* en 1981, se dan cifras del 13 % sobre una población de 345 pacientes en Sevilla, mientras que Orduña Domingo y otros (1991), en Valladolid, determinan para el grupo de edad de máxima frecuencia de E.T.S. (21-25 años) un 23 % de prevalencia, equiparable al 22,10% de casos positivos diagnosticados en mujeres que ejercen la prostitución en la provincia de Soria (Ulloa *et al.*, 1993). Si bien las poblaciones estudiadas no son homogéneas, en el drástico descenso de las enfermedades de transmisión sexual, tales como sífilis o infecciones gonocócicas, y las bajas cifras de tricomonosis en nuestro estudio epidemiológico, parecen intervenir las campañas de prevención contra el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (Rodríguez Gallego, 1995).

Los 18 aislamientos de *T. vaginalis* axenizados y criopreservados han sido sometidos al modelo de patogenia murina intraperitoneal con una doble intención; por una parte, clasificar en función de la patogenia experimental, y por otra, validar los parámetros que constituyen el baremo del índice de patogenia (I.P.).

Si inicialmente se ha aceptado un criterio arbitrario de clasificación: I.P. >40, I.P. 20-40 y I.P. <20, para establecer una proporción del 33,3% (6/18), 27,8% (5/18) y 38,9% (7/18) para los aislamientos de alta, media y baja patogenia, respectivamente, más tarde, se ha validado dicha clasificación a través de un análisis multidimensional de las variables que componen el baremo. Los resultados contrastan con los presentados por otros autores, en modelos murinos de patogenia intraperitoneal de cepas aisladas en casos de vaginitis aguda o crónica. En la tabla 5.3. se recogen los ensayos más representativos frente a los nuestros.



**TABLA 5.3.** Porcentajes de aislamientos de alta, media y baja patogenia de *T. vaginalis* estimada por diversos ensayos murinos intraperitoneales.

AUTORES	AÑO	Nº DE CEPAS	Nº RATONES POR CEPA	% PATOGENIA EN RATÓN		
				ALTA	MEDIA	BAJA
TERAS	1954	50	7	56	26	18
ROIGAS	1961	24	10	29	66	4
LAAN	1966	48	10	54	38	8
TERAS <i>ET AL.</i>	1966	98	10	47	41	12
KULDA	1990	25	20	44	44	12
NUESTROS RESULTADOS	1996	18	10	33	28	39

No obstante, los criterios de clasificación no son completamente homogéneos en los diferentes ensayos; quizás la pormenorizada valoración paramétrica establecida a través de nuestro baremo tienda a equiparar los grupos experimentales. Además, la mayor parte de los aislamientos obtenidos en nuestra encuesta epidemiológica proceden de exploraciones ginecológicas rutinarias y es posible que muchas de las mujeres fueran portadoras asintomáticas de cepas poco patógenas. Si además se tiene en cuenta como se aborda más adelante, que la correlación patogenia clínica-experimental dista bastante de ser perfecta, las cifras no son tan distintas como en principio pudieran parecer. Esta cuestión es crítica para determinar la virulencia de los aislamientos y explicaría la mayor proporción de cepas de baja virulencia presentes en nuestro estudio.

Finalmente, conviene señalar que los periodos de axenización aplicados a los aislamientos pueden intervenir en la disminución de la patogenia experimental, ya que es

necesario un tiempo de cultivo más o menos prolongado, por resiembras sucesivas, para la actuación tanto de antibióticos como de antifúngicos, que interfieren en la expresión fenotípica de *T. vaginalis*.

Según la revisión de Ponce (1995), las técnicas de análisis multidimensional se han aplicado a relativamente pocos trabajos en el campo de la Parasitología, siendo los más destacados sobre *Naegleria* (Pernin *et al.*, 1985), *Schistosoma* (Merelender *et al.*, 1987), *E. granulosus* (Hobbs *et al.*, 1990; Eckert *et al.*, 1993), *Entamoeba* (Blanc, 1992), un estudio de interacciones parásito-hospedador (Renaud *et al.*, 1992), *Sarcocystis* (Fenger *et al.*, 1994), tricostrongilidos (Hoberg & Lichtenfels, 1994), y el trabajo realizado por Ponce y Cuesta (1996) con *E. granulosus* que es capaz de diferenciar muestras de varios hospedadores intermediarios (muestras ovinas, bovinas, suinas y equinas) a través los parámetros morfométricos correspondientes, obteniéndose resultados compatibles con las pruebas biológicas previamente realizadas.

En términos generales, el análisis estadístico multidimensional verifica la bondad de los parámetros que componen la tabla de valoración. Así, se ha determinado, según el Análisis de Componentes Principales, que el ensayo de patogenia murina intraperitoneal de *T. vaginalis* presenta dos tipos de factores o componentes, que podemos denominar *lesiones abdominales* y *mortalidad*, los cuales contribuyen a explicar la varianza del modelo experimental en un 86%. La representación de los distintos aislamientos, en función de ambos factores, permite comprobar la existencia de 3 grupos diferenciados (aislamientos de alta, media y baja patogenia).

A continuación, considerando la existencia de 3 grupos de muestras, se ha procedido a la realización de un Análisis Discriminante, para determinar la variable o conjunto de variables que mejor discriminen entre los diferentes grupos. En dicho análisis, tras la aplicación del método de selección gradual de variables, se consideraron como válidas todas las variables contenidas en los dos factores (*lesiones abdominales* y *mortalidad*). Como resultado del análisis, las funciones canónicas discriminantes clasificaron el 100% de las observaciones en los grupos preestablecidos.

Posteriormente, se ha iterado el proceso considerando una única variable, para determinar, en función de las observaciones correctamente agrupadas, qué parámetro es el más representativo de la patogenia global.

En la tabla 5.4. se expresan los porcentajes de casos correctamente agrupados en función de una única variable.

TABLA 5.4. Análisis Discriminante del modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* considerando una única variable: Porcentaje de casos bien agrupados por variable.

VARIABLE	TODAS	LP.	H(V).	H(D).	B/P/E.	L.A.	P.	M.
%CASOS (*) BIEN AGRUPADOS	100,00	88,89	83,30	77,78	77,78	72,22	72,22	66,67

I.P. : Índice de patogenia. H(V): Hígado visceral. H(D): Hígado diafragmático. B/P/E.: Bazo/Páncreas/Estómago. L.A.: Líquido ascítico. P.: Peritoneo. M.: Mortalidad.

(\*) Se consideran el conjunto de observaciones correctamente clasificadas, esto es, aquellas cuyo grupo actual coincide con el predictivo.

En función de los resultados, la variable H(V), que representa las lesiones en la cara visceral del hígado murino, es la que mayor número de observaciones clasifica correctamente y la que menor información suministra es la mortalidad (M), ambas según la tabla de valoración establecida.

De una parte, en coincidencia con nuestros resultados, Toyos (1974) señala que en el hígado se asientan la mayor parte de las lesiones (70%), seguido de bazo y páncreas (25%). Siendo la lesión más importante por su frecuencia la necrosis hepática focal, que puede llegar a constituirse en un granuloma o absceso tricomonádido. Según Kulda (1990), la diseminación de la infección experimental parece depender de la virulencia de la cepa, indicando que las cepas de alta virulencia muestran un doble tropismo hacia el hígado y el páncreas, llegando incluso a apuntar que, las cepas de baja virulencia son incapaces de colonizar el hígado y sólo

provocan peritonitis fibrinopurulentas crónicas. En este sentido, Teras y Roigas (1966) también manifiestan que el primer órgano afectado es el hígado en su modelo de patogenia intraperitoneal. Sin embargo, Gobert (1971) y Escario (1985) señalan que la lesión más característica de la infección experimental de *T. vaginalis* es la que afecta al páncreas, y que se extiende al bazo (esplenomegalia) y estómago interesando después al hígado visceral.

De otra parte, en cuanto a la mortalidad, Escario y colaboradores (datos no publicados), refieren la importancia individual de cada uno de los parámetros, que componen el baremo de la necropsia en el ensayo intraperitoneal de Toyos para caracterizar la patogenia de cada cepa. Tras someter a examen 24 aislados de *T. vaginalis* de procedencia española, las conclusiones obtenidas de una regresión lineal de los índices parciales por parámetro sugieren que la utilización de la mortalidad, como criterio único es insatisfactorio para discriminar la patogenia de los aislados, además de uno de los apartados menos informativos.

En la misma línea, Cavier y su equipo (1972) no consideran la mortalidad entre los parámetros de evaluación de la patogenia de *T. vaginalis*. Asimismo, Toyos (1974) no considera la muerte acaecida en las 48 horas iniciales postinoculación, atribuyéndosela a un error de manipulación experimental (traumatismos, hemorragias, *shocks*,...). Bajo nuestro punto de vista, parece cuestionable la validez de un ensayo intraperitoneal cuando *T. vaginalis* provoca el deceso del hospedador murino en tan breve plazo.

La coincidencia, pues, de los autores consultados es unánime respecto a la escasa representatividad de la mortalidad (M) en el conjunto de la patogenia (IP). Nosotros compartimos dicha valoración en función de los resultados generados por el Análisis Discriminante para una variable.

Finalmente, no parece existir una buena correlación entre la patogenia experimental murina de los 18 aislamientos de *T. vaginalis* y las manifestaciones (signos y síntomas) clínicas presentes en las pacientes del estudio epidemiológico. En el mismo sentido, los investigadores estonios (Teras, 1954; Teras & Roigas, 1966), que comparan la virulencia estimada sobre la base de un ensayo intraperitoneal con la sintomatología clínica, llegan a la conclusión de que

la correlación dista de ser perfecta, aunque indican que son más las cepas que presentan alta virulencia en ratón procedentes de casos agudos o subagudos de tricomonosis humana que de casos crónicos. Kulda (1990) afirma que la correlación entre la virulencia de las cepas en el modelo murino de infección intraperitoneal y la severidad de la tricomonosis en los pacientes humanos no es necesariamente perfecta. Y más recientemente, Bhatt *et al.* (1993) señalan la ausencia de correlación entre la patogenia clínica y la experimental en un modelo intraperitoneal.

Según señala Romero (1999), el modelo murino de infección intraperitoneal con *T. vaginalis* permite detectar las variaciones en la patogenia de nuevos aislamientos con fines de caracterización, si bien no se aprecia una correlación entre el cuadro clínico en el hospedador natural y las lesiones inducidas en los animales.

La determinación de la patogenia experimental de los 18 aislamientos ha revelado interesantes diferencias entre ellos, lo que refuerza la hipótesis de que el modelo murino de infección intraperitoneal puede ser utilizado como uno de los criterios para la caracterización de nuevos aislamientos de *T. vaginalis*.

## 5.4. CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VIVO*

### 5.4.1. Modelo experimental de cribado farmacológico *in vivo* frente a *T. vaginalis*

La adaptación del modelo murino de patogenia para el cribado farmacológico *in vivo* ha permitido la evaluación de los compuestos tiadiazínicos más interesantes, que han resultado activos en los ensayos *in vitro*.

El modelo de cribado *in vivo* se basa en la inoculación de cultivos axénicos de *T. vaginalis* en ratón, que provocan exudados fibrinosos y focos necróticos a nivel de los órganos abdominales, o en algunos casos, torácicos, e incluso la muerte en un periodo breve de tiempo. De los posibles métodos de valoración, los propuestos por Teras y Roigas (1966), Cavier y otros (1972), Toyos (1974) y Escario (1985), que con algunas variaciones, proponen la puntuación de diferentes lesiones y la expresión de la patogenia en forma de índice, parecen los más adecuados para el ensayo de quimioterápicos. En nuestro diseño experimental, se asume el baremo establecido por Toyos, con las modificaciones introducidas por Escario respecto a la expresión porcentual y el periodo de tiempo de 15 días. En el estudio de tricomonidas la vía de infección intraperitoneal es la más profusamente empleada (Escario, 1985).

El tiempo de tratamiento que hemos empleado en nuestro diseño experimental difiere del propuesto por Escario (1985), pasando de tratar 6 días (2º, 3º, 4º, 7º, 8º y 9º postinoculación), a una nueva pauta de tratamiento más extensa en el tiempo que comprende 7 días (3º, 4º, 5º, 6º, 10º, 11º y 12º p.i.), por su mayor eficacia para la discriminación de productos activos frente al agente patógeno.

Probablemente la vigencia de la infección intraperitoneal se haya alcanzado tras superarse los modelos de infección subcutánea que tuvieron mayor protagonismo en su momento. Siendo muy destacables las aportaciones que con dicho modelo realizaron Lynch y colaboradores (1955); Honigberg (1961), cuyo ensayo ha servido para la evaluación de la acción tricomonida de los 5-nitroimidazoles administrados por vía oral; así como Heeres y

otros (1976), cuyos ratones infectados subcutáneamente reciben los fármacos por vía oral durante 7 días. Al séptimo día p.i. se sacrifican y se expresan los resultados en forma de dosis eficaz ( $DE_{50}$ ), según la presencia o ausencia de tricomonas, que para el metronidazol es: 16 mg/Kg de ratón. Y finalmente, Meingassner (1977) que infecta ratones subcutáneamente, que reciben tratamiento sistémico a las 2, 18 y 24 horas p.i. Al 6º día se procede al examen microscópico de las lesiones, observándose la ausencia o presencia de formas móviles. La  $DE_{50}$  para el metronidazol, en estas condiciones experimentales, es de 10,95 mg/Kg de ratón.

Otros autores utilizan, sin embargo, *T. foetus* para producir las lesiones intraperitoneales en el ratón (Howes *et al.*, Butler, 1972, Cuckler *et al.*, 1970). Y por si fuera poco, se han indicado otras vías atípicas, como es la inoculación escrotal de ratones, para el estudio de tricomonidas sistémicos (Tsay & Price, 1973).

#### 5.4.2. Sobre la actividad antiprotozoósica *in vivo* de productos de síntesis frente a *T. vaginalis*

Los compuestos, L-1d, D-1j y 1m (derivados de tiadiazinas) que fueron activos *in vitro* frente a *T. vaginalis*, se sometieron al ensayo farmacológico *in vivo* para determinar su actividad en el modelo murino de infección experimental. Ninguno de ellos, desgraciadamente, elimina por completo los graves daños infligidos por el parásito en los órganos abdominales. Sin embargo, los índices de patogenia de los lotes tratados son significativamente inferiores respecto a los testigos (infectados no tratados) en los tres casos. Siendo la comparación de estos valores estadísticamente significativa respecto al lote testigo con  $p < 0,01$  (compuestos 1m y D-1j) y  $p < 0,05$  (compuesto L-1d).

A continuación, se han realizado pruebas con dos derivados de tiadiazinas disustituidos que sólo presentan actividad tricomonocida (100%) a la mayor concentración ensayada (0,1 mg/ml). En esta ocasión, el lote tratado con DL-1d manifiesta un descenso en el índice de patogenia respecto al testigo, aunque la diferencia no es significativa para un nivel de confianza del 5%. Igualmente sucede con el producto L-1i, ya que el lote tratado presenta un índice de patogenia idéntico al que presenta el testigo, por lo que no existen diferencias significativas

para el mismo nivel de confianza preestablecido.

Nuevamente, igual que sucediera en la prueba de cribado farmacológico *in vitro*, el compuesto 1m es el más activo entre los compuestos que se han ensayado en el modelo experimental de cribado farmacológico *in vivo* frente a *T.vaginalis*.



## 5.5. MODELO EXPERIMENTAL DE INMUNOMODULACIÓN

### 5.5.1. Sobre la modulación de la respuesta inmune en el modelo murino de tricomonosis

La integración del modelo experimental de *T. vaginalis* en el estudio del efecto inmunomodulador de extractos de plantas iberoamericanas nos ha permitido profundizar, de una parte, en el conocimiento de su actividad biológica, y de otra parte, en los fundamentos de la respuesta inmunitaria inducida en la interacción parásito-hospedador.

Inicialmente, se ha evaluado la respuesta inmunitaria en el modelo de patogenia, señalándose cierta analogía entre las infecciones experimentales de *T. vaginalis* y *Entamoeba histolytica*. De tal manera que el tipo de lesión hepática en el modelo experimental de *T. vaginalis* se asemeja, en gran medida, al absceso hepático amebiano (A.H.A.). Esto es debido a la coincidencia de mecanismos celulares implicados en las respuestas inflamatorias concomitantes frente a ambos parásitos. En este sentido, la respuesta inmunológica contra *E. histolytica* se produce como resultado de la invasión tisular por el parásito. La formación del AHA, posterior a la inoculación intraportal de amebas virulentas, comprende una reacción inflamatoria aguda, con la subsiguiente constitución del granuloma y necrosis progresiva. Los trofozoitos de *E. histolytica* no producen AHA en los cricetos dorados mediante lisis directa de los hepatocitos, sino por medio de la acumulación y posterior lisis de los leucocitos y macrófagos que rodean las amebas, lo que produce, en consecuencia, la necrosis hepática (Kretschmer, 1994). Las amebas no virulentas resultan fagocitadas por los leucocitos y neutrófilos a través de mecanismos independientes de los intermediarios metabólicos del oxígeno. En cambio, las amebas virulentas producen la pérdida de motilidad, degranulación y eliminación de los neutrófilos por fagocitosis en un proceso dependiente de microfilamentos. Sin embargo, la destrucción de los macrófagos parece ser el resultado de un efecto deletéreo indirecto de las amebas que ya han sufrido la lisis, más que de un mecanismo efector directo dependiente del contacto con *E. histolytica*.

*T. vaginalis* inyectado en la cavidad peritoneal de ratones desarrolla una infección que, esencialmente, se focaliza en el hígado, el peritoneo, así como en el páncreas y el intestino. En el hígado, los parásitos progresan por los sinusoides, donde se asocian a neutrófilos, linfocitos y macrófagos. Se adhieren a la membrana de las células hepáticas, que sufren depleción de glucógeno mientras el número de glóbulos lipídicos aumenta en el citoplasma. Los orgánulos citoplásmicos son fagocitados, lo que conlleva la vacuolización y posterior muerte celular. La destrucción de los hepatocitos y de los leucocitos resulta del efecto de la citoadherencia y citotoxicidad desplegada por *T. vaginalis*. Se han observado tricomonas, en posición intracelular, fagocitados por leucocitos o macrófagos (Brugerolle *et al.*, 1974). En la mayoría de los casos, los macrófagos se ven destruidos por el parásito, que se comporta como un parásito intracelular. Las hidrolasas de los macrófagos parecen poco eficaces frente al flagelado, mientras que éste provoca la destrucción de los macrófagos tras la fagocitosis. La infección intraperitoneal de *T. vaginalis* genera una fuerte reacción del hospedador que se manifiesta por una infiltración leucocitaria importante (con concentración de polimorfonucleares, linfocitos y macrófagos) y por una envoltura fibroblástica en los abscesos generados en los distintos órganos abdominales. Todos estos elementos tienden a destruir, rechazar o limitar la extensión del parásito.

El escenario inmunológico descrito en la lesión hepática, que se genera tras la infección experimental con *T. vaginalis*, es compatible con un fenómeno de hipersensibilidad retardada regulado por una respuesta celular coordinada por linfocitos Th1, sin menoscabo de otras intervenciones subsidiarias del sistema inmunitario reguladas por los linfocitos Th2.

En estudios sobre ratón, Michel (1971) ha demostrado que la inmunidad protectora frente a *T. vaginalis* está mediada por células, y la hipersensibilidad al antígeno parasitario en los humanos es de tipo retardado (Adler & Sadowsky, 1947). Es posible que la activación de linfocitos sensibilizados por antígeno de *T. vaginalis* pueda modular la infiltración de PMN a través de la acción de las citocinas (Revillard, 1978). Las experiencias de Landolfo *et al.* (1980) muestran que células macrofágicas procedentes de ratones no sensibilizados eliminan a los tricomonádidos más eficientemente que los neutrófilos del mismo ratón.

Previamente, Farris & Honigberg (1970) habían comprobado como *T. vaginalis* ataca a los macrófagos en cultivos de células de hígado de pollito. Más recientemente, se ha estudiado la citotoxicidad de los neutrófilos sobre el parásito y se ha postulado que son respuestas quimiotácticas a las secreciones de los protozoos las implicadas en la fagocitosis (Rein *et al.*, 1980).

Una variedad de respuestas inmunes a la infección por *T. vaginalis* ha sido descrita, incluyendo anticuerpos secretores específicos en secreciones vaginales (Ackers *et al.*, 1975), anticuerpos séricos IgG e IgM (Mason, 1979; Street *et al.*, 1982), quimiotaxis de PMN (Mason & Forman, 1980, 1982) y fagocitosis (Rein *et al.*, 1980). Sin embargo, la ausencia de una respuesta inmune protectora puede ser debida a la heterogeneidad antigénica y los fenómenos de presentación antigénica.

En general, la respuesta humoral a *T. vaginalis* es baja debido a cierto efecto inmunosupresor que posee el parásito *per se*; la invasión del epitelio genital también inhibe la inducción mitogénica, y en menor grado la blastogénesis mediada por antígeno. La respuesta proliferativa normal del ratón sugiere que la inmunodepresión por tricomonosis resulta de los productos que liberan los organismos vivos y de antígenos estructurales, ya que la inyección en ratones de sobrenadantes de cultivo del parásito no provoca el efecto de la depresión linfoproliferativa. En general, las cepas más patógenas son las que provocan mayor grado de inmunosupresión.

En la misma línea, nuestros resultados de la respuesta humoral inducida por la infección experimental con *T. vaginalis* presentan unos niveles de inmunoglobulinas muy bajos en el periodo experimental (15 días) pero similares a los que muestran los autores en la bibliografía (Mutwiri & Corbeil, 1998; Abraham *et al.*, 1996). Los bajos niveles de inmunoglobulinas aconsejan tomar con cautela cualquier interpretación inmunológica derivada de los mismos.

### 5.5.2. Sobre los fármacos de referencia: Inmunosupresores, inmunoestimulantes y AINEs.

Los inmunosupresores como la ciclofosfamida, azatioprina y FK-506 favorecen la disminución de las lesiones en el modelo experimental de *T. vaginalis*. Independientemente de que los mecanismos de inmunosupresión de los agentes actúen a diferentes niveles.

La ciclofosfamida causa una reducción proporcionalmente mayor del número de linfocitos B, que de las células T (Cupps *et al.*, 1982). No obstante, se ha demostrado su capacidad para activar los mecanismos supresores de la respuesta inmunitaria en los pacientes que sufren melanomas y otros tipos de cáncer (Berd & Mastrangelo, 1987a; 1987b; 1988; Livingston *et al.*, 1987; Wiseman *et al.*, 1989). En particular, Wiseman y otros señalan un significativo descenso de las células CD8<sup>+</sup> (linfocitos Tc) y un incremento en la proporción CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> (Lersch *et al.*, 1992). Para explicar esta aparente contradicción, Paul (1994) indica que dependiendo de que la ciclofosfamida se administre antes o al mismo tiempo que el insulto inmunológico, se produce la supresión humoral (Santos & Owen, 1966) o celular (Poulter & Turk, 1972).

Sin embargo, cuando la administración del inmunosupresor es posterior a la infección, el fármaco incrementa la respuesta mediada por células (Lagrange *et al.*, 1974).

Por otra parte, la azatioprina, un nitroimidazol derivado de la 6-mercaptopurina, parece ser un potente inhibidor de las respuestas mediadas por células T y también parece reducir eficazmente el número de células NK circulantes, aunque puede suprimir tanto la respuesta inmune celular como la humoral (Clements & Davis, 1986). Su mecanismo de acción es complejo, si bien se supone que actúa como un antimetabolito con importante citotoxicidad y propiedades inmunosupresoras sobre los linfocitos T (Bach, 1985; Miescher & Beris, 1984; Huskinsson, 1984). También se ha referido que inhibe la producción de prostaglandinas en diferentes tipos celulares (Homo-Delarche *et al.*, 1988; 1990; Dottan *et al.*, 1987).

Finalmente, el FK-506 (tacrólimo), que es un inmunosupresor con estructura tipo

macrólido, actúa suprimiendo las respuestas inmunes, tanto las mediadas por anticuerpos como por células. El tacrólimo es unas 100 veces más potente que la ciclosporina en inhibir selectivamente la secreción de diversos tipos de citocinas (IL-2, IL-3, IFN- $\gamma$ ). Asimismo, FK-506 también inhibe la actividad de los linfocitos B inducida por anticuerpos. A nivel molecular, la ciclosporina y FK-506 ejercen su acción inmunosupresora a través de un mecanismo de interacción con receptores citoplásmicos, denominados inmunofilinas, que producen la inhibición de la transcripción de ciertos genes de citocinas presentes en los linfocitos T. Entre las citocinas inhibidas se ha señalado la IL-2, IL-3, IL-4, GM-CSF, así como TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Herold *et al.*, 1986; Granelli-Piperno, 1988; Sigal *et al.*, 1992; Tokuda *et al.*, 1994).

El bloqueo de las citocinas claves se contrapone a la activación de los linfocitos T y ulterior potenciación de la respuesta inmunitaria. No obstante, FK-506 no inhibe otros productos génicos de vital importancia para la supervivencia celular.

Los inmunoestimulantes ensayados en el modelo experimental de *T. vaginalis* tienen efectos desiguales; mientras que el tratamiento con Inmunoferón (glicofosfopeptical) favorece un incremento en el índice de patogenia estadísticamente significativo respecto al lote testigo, por su parte, la timoestimulina, si bien también favorece la exacerbación de las lesiones, éstas son de menor importancia y el índice de patogenia de dicho lote no sufre una variación significativa respecto al control establecido.

Inmunoferón, un glucomanano (polisacárido) extraído de la pared celular de *Candida utilis*, está indicado en inmunodeficiencias secundarias a enfermedades o fármacos por su acción como estimulante de las defensas del organismo, y en general, como tratamiento coadyuvante de terapias específicas en aquellos procesos neoplásicos o infecciosos en los que existe déficit de la inmunidad celular. Moya y otros (1987) señalan que el glicofosfopeptical en presencia de un mitógeno como el lipopolisacárido bacteriano (LPS) es capaz de incrementar los niveles séricos de IFN- $\gamma$ .

Además, se produce un significativo efecto estimulante sobre la actividad de las células NK en los ratones tratados con Inmunoferón (AM3), lo que puede explicarse por la marcada

inducción de INF- $\gamma$  y/o por una modificación en la síntesis de prostaglandinas.

Por su parte, Rojo y su equipo (1986) en otros ensayos realizados con el glicofosfopéptido en ratones normales destacan la síntesis de interleucina 2 (IL-2) y la activación de células NK de bazo, al cabo de 2 semanas de tratamiento (30 mg/Kg/día). Aún más, en ratones inmunosuprimidos se observa cierta respuesta mitogénica de los linfocitos T, pero no se incrementa la producción de IL-2. Finalmente, según Villarrubia *et al.* (1997), el glicofosfopéptido aumenta la reactividad de los macrófagos y las células NK tanto en ratones como en humanos; estas observaciones ayudan a explicar como AM3 restablece la inmunidad celular natural y plantea la hipótesis de su aplicación como adyuvante en vacunas víricas y bacterianas.

Los antecedentes presentados parecen corroborar los resultados en el modelo murino de *T. vaginalis*, donde la administración del inmunoestimulante glicofosfopeptical parece favorecer la presencia de un fluido ascítico de carácter fibrinopurulento con presencia de tricomonádidos vivos en la cavidad peritoneal, y la generación de lesiones abdominales de carácter necrótico, que evolucionan hacia la formación de abscesos tricomonádidos muy aparentes e incompatibles con la supervivencia.

Por contra, la timoestimulina está constituida por un complejo hormonal de polipéptidos de timo bovino, cuya actividad biológica determina una estimulación y regulación de la respuesta inmunitaria celular. Supliendo parcialmente o potenciando las funciones tímicas induce la inmunocompetencia de los linfocitos T.

La timoestimulina incrementa significativamente la IL-2, los niveles de IFN- $\gamma$  séricos, la linfoproliferación y expresión de los receptores frente a IL-2; así como la citotoxicidad (Lin *et al.*, 1988). También se ha señalado que favorece la reconstitución funcional de las células B en casos de inmunodeficiencia (Lin *et al.*, 1987).

García-Lechuz y colaboradores (1993) demuestran, en un modelo experimental en ratas, que la timoestimulina es capaz de impedir el descenso del índice CD4<sup>+</sup>/CD8<sup>+</sup> en tejido esplénico

después de la inmunodepresión quirúrgica por resección del intestino delgado. Este mismo efecto, sin embargo, no fue observado con el inmunoestimulante Inmunoférón.

La administración de un factor como TP-1 a ratones produce un incremento de la actividad de las células NK (Bistoni *et al.*, 1984).

Los antiinflamatorios no esteroideos (AINEs) introducidos en el modelo murino de *T. vaginalis* han favorecido la disminución de las lesiones. En particular, los ensayos realizados tanto con piroxicam como con metamizol permiten la disminución de los índices de patogenia de los lotes tratados con los fármacos respecto a los testigos. La intervención en los procesos inflamatorios derivados de la infección experimental se produce a diferentes niveles según la naturaleza de los compuestos.

Los AINEs son moléculas planas de carácter lipófilo, capaces de insertarse entre la bicapa lipídica de las membranas de leucocitos, produciendo alteraciones en su viscosidad y afectando, por tanto, a los procesos de transducción de señales que tienen lugar a este nivel. Como consecuencia, alteran la actividad de enzimas asociadas a estas membranas, como la fosfolipasa C en macrófagos o la NADPH oxidasa en neutrófilos.

Estos fenómenos físico-químicos producen inhibición de la síntesis de prostanoides, incluidas prostaglandinas, por inhibición reversible de la ciclooxigenasa, inhibición de la agregación neutrofílica, inhibición de la migración de polimorfonucleares y monocitos a la zona inflamada e inhibición en la generación de radicales superóxido por los neutrófilos y en los procesos de degranulación de las enzimas lisosomales de leucocitos activados (Abramson & Weismann, 1989).

Probablemente, a nivel de las proteínas G, el piroxicam produce una alteración en las moléculas de adhesión en la superficie del leucocito. Este AINE previene los cambios conformacionales de las integrinas inducidos en neutrófilos y linfocitos, entre otros agentes, por las citocinas, de tal manera que impide los procesos de adhesión de leucocitos a las células endoteliales, evitando los fenómenos de infiltración (García-Vicuña, 1997).

La función inhibidora de la ciclooxigenasa (COX-2) de los AINEs parece ser de particular interés en nuestro modelo experimental, por cuanto el extracto DIFUR de *Polypodium decumanum*, que carece de la misma, aunque presente propiedades antiinflamatorias, es incapaz de producir una disminución de la mortalidad y las lesiones producidas por *T. vaginalis*.

De otra parte, el efecto inhibitorio de metamizol sobre la síntesis de prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) en los macrófagos podría repercutir en la inhibición de las células que producen las citocinas proinflamatorias (IL-4 e IL-6), en la regulación negativa del incremento de IL-1 y en la estimulación de la síntesis de IL-2 e IL-10 (citocina antiinflamatoria), según se ha demostrado en un modelo de sepsis quirúrgica en ratas (García-Álvarez *et al.*, 1997). El incremento en la síntesis de IL-10 que provoca metamizol, inhibiendo la producción de las citocinas IL-4 e IL-6, parece constituirse en el mecanismo fundamental para elucidar los efectos antiinflamatorios del fármaco.

La síntesis de IL-10 (linfocitos Th2) producida por la estimulación de metamizol podría intervenir, al mismo tiempo, en la inhibición del IFN- $\gamma$  (linfocitos Th1). Esta circunstancia unida a la inhibición de la ciclooxigenasa (disminución de las prostaglandinas) y la disminución de los fenómenos de infiltración leucocitaria, neutrofilia e hipersensibilidad retradada parecen conducir a una reducción de la patogenia evaluada tras el tratamiento con el AINE en el modelo murino de *T. vaginalis*.

Según Paul (1993) los dos productos fundamentales de la modulación de la inflamación por los linfocitos T son IFN- $\gamma$  e IL-4, además del factor estimulante de colonias (CSF). En respuesta a un antígeno específico, los linfocitos T producen glicoproteínas solubles cuya función es activar macrófagos y otras células fagocíticas con importantes papeles en la inflamación. La producción de IFN- $\gamma$  incrementa la función fagocítica de manera inespecífica (Nathan, 1992), promueve la fusión celular en policariones *in vitro* y por similares mecanismos puede jugar un papel central en la formación del granuloma *in vivo* (Weinberg *et al.*, 1985), asimismo activa la secreción de macrófagos de numerosos productos tales como IL-1 y TNF- $\alpha$ . Por último, IFN- $\gamma$  también induce marcados cambios en la estructura y función de los



macrófagos. En neutrófilos, IFN- $\gamma$  parece incrementar la actividad del metabolismo respiratorio (Berton *et al.*, 1986).

La IL-4 también es un importante regulador de la inflamación (Defranco *et al.*, 1987), que es capaz de activar la proliferación de las células T, siendo un componente importante de su ontogenia (Zlotnik *et al.*, 1987), y estimula el crecimiento de los basófilos en la médula ósea (Saito *et al.*, 1988). Finalmente, la IL-4 induce la formación de células gigantes multinucleadas, lo que sugiere un destacado papel en los procesos granulomatosos (McInnes & Rennick, 1988). Asimismo, la IL-4 es capaz de inhibir la explosión oxidativa de los neutrófilos (Abrahamson & Gallin, 1990).

Los efectos biológicos que coordinan ambas citocinas parecen ser interferidos por los AINEs, impidiendo la evolución de la respuesta inflamatoria de tipo retardado que se produce tras la infección experimental de *T. vaginalis*.

### 5.5.3. Otros fármacos de interés: SAME

El ensayo de S-adenosilmetionina como agente inmunomodulador en el modelo murino de *T. vaginalis* no parece rendir el efecto deseado, produciendo una disminución aparente pero no significativa de la patogenia del lote tratado para un nivel de confianza del 5%. La dosis farmacológica administrada, 16,80 mg/Kg/día durante 10 días, se ha seleccionado de experiencias análogas (García-Álvarez *et al.*, 1997), aunque, quizás, sería interesante plantearse el efecto de un aumento de dicha dosis.

El compuesto sulfoadenosilmetionina (SAME) es una molécula fisiológica presente en todos los tejidos y fluidos del organismo. Actúa como donador de grupos metilo y precursor de tioles (cisteína, taurina y glutatión). En el hígado es capaz de regular la fluidez de las membranas hepáticas a través de la metilación de fosfolípidos.

Aunque de forma aún no bien esclarecida, la síntesis de compuestos tiólicos parece incrementar la respuesta inespecífica del sistema inmunológico.

En este sentido, Kinscherf y otros (1994) señalan que el descenso de glutatión intracelular y de las concentraciones de cisteína plasmática se correlacionan con bajos porcentajes de células CD4+. Mas aún, la inhibición de la actividad lítica de las células T citotóxicas se ha asociado con un sustancial descenso de los niveles de glutatión intracelular (Multhoff *et al.*, 1996).

Por otro lado, la taurina restablece la actividad proliferativa de linfocitos que disminuye en ratones de edad avanzada (Negoro & Hara, 1992). De hecho, Bedrosian y colaboradores (1991) informan que la taurodolina, un derivado de la taurina, parece mostrar protección frente al shock endotóxico y la muerte, considerando el incremento de AMPc intracelular como responsable de la supresión del transporte de las citocinas. Asimismo, Marcinkiewicz y otros (1995) señalan que la taurina inhibe la generación de óxido nítrico, prostaglandinas (PGE<sub>2</sub>) y TNF- $\alpha$ .

En la misma línea, Gmunder y su equipo (1991) observan que la síntesis de ADN depende de los niveles de cisteína en los linfocitos T estimulados con drogas mitogénicas y se ha señalado que la ausencia de aminoácidos sulfurados detiene la mitosis de los linfocitos en la fase G1 (Iwata *et al.*, 1994).

En un modelo quirúrgico de sepsis experimental, el tratamiento con SAME inhibe el descenso de las células activas circulantes del sistema inmune, muy en especial de los linfocitos T con marcador CD8+ que se incrementan de manera significativa, asimismo también se inhibe el incremento de los niveles de IL-1 (García-Álvarez *et al.*, 1997). La enzima responsable de la síntesis de SAME es la SAME sintetasa, que se encuentra inhibida durante el proceso de sepsis.

Si parecen bien fundamentados los argumentos que atribuyen a SAME propiedades inmunomoduladoras, no se explica fácilmente el mínimo efecto observado en el modelo experimental de *T. vaginalis*. No obstante, como posible justificación se puede esgrimir la potencial participación de SAME en la activación del metabolismo de *T. vaginalis*

En el parásito se ha revelado la presencia de un metabolismo activo de poliaminas, con la secreción de enormes cantidades de putrescina (White *et al.*, 1983); así como reacciones de transmetilación (Cooper, 1983; Tabor & Tabor, 1984) y de actividades SAME sintetasa, SAME descarboxilasa y ornitina descarboxilasa (North *et al.*, 1986), que implican a SAME en importantes procesos biológicos.

Entre estos procesos se destaca la síntesis de poliaminas, en la cual SAME se descarboxila primero para reaccionar después con la putrescina formando espermidina. Asimismo, Thong y colegas (1987) destacan que *T. vaginalis* es capaz de sintetizar SAME a partir de L-metionina exógena y posteriormente emplearlo como donador de grupos metilo en la metilación de lípidos (fosfolípidos), ácidos nucleicos, y posiblemente proteínas. Finalmente, los autores destacan el catabolismo de L-metionina a tioles volátiles (metanotiol) e introducen la posibilidad de que estos compuestos intervengan en las interacciones del parásito con el hospedador y los otros microorganismos presentes en la vagina humana y su expresión patogénica (Thong *et al.*, 1987).

Habiendo sido establecida la relación entre SAME y diferentes rutas del metabolismo intermediario de *T. vaginalis*, es posible concluir que el potencial efecto inmunomodulador del fármaco en el modelo murino se ha visto parcialmente enmascarado por el efecto que el mismo tiene sobre el parásito y su expresión patogénica.

5.5.4. Sobre los extractos vegetales ensayados en el modelo de inmunomodulación de *T. vaginalis*: DIFUR (*Polypodium decumanum*), saponinas (*Quillaja saponaria*), PAL (*Polypodium leucotomos*) y CTP

El fármaco DIFUR de laboratorios Cantabria se ha introducido en el modelo experimental de *T. vaginalis* por su homología con el extracto PAL de ASAC *Pharmaceutical Interantional* A.I.E. con un resultado extraordinario e inesperado; aunque ambos parecen ser extractos vegetales de *Polypodium*, mientras que el tratamiento con PAL disminuye las lesiones provocadas por la infección parasitaria, el fármaco DIFUR exagera las mismas, y por ende dicho tratamiento incrementa de manera significativa el índice de patogenia respecto a un lote control no tratado.

Según se ha podido saber a través de un informe científico de ASAC, la diferencia entre ambos extractos vegetales parece radicar en su origen natural; por cuanto según Cantabria, el extracto Calaguala, originario de Honduras, está constituido por diversas especies del género *Polypodium* (*P. decumanum*, *P. leucotomos*,...), mientras que el extracto vegetal de ASAC está constituido únicamente por *P. leucotomos* (o *P. aureum*).

Por otra parte, los procedimientos de extracción tampoco son idénticos por lo que es muy poco probable que coincidan los principios activos seleccionados. De DIFUR se conoce su eficacia frente a psoriasis, dermatitis atópicas y artritis mediante un mecanismo de acción que se supone vulnera alguno de los intermediarios de la respuesta inflamatoria, en particular, se ha indicado un sulfolípidido que antagoniza el factor activador de plaquetas (PAF), que interviene en la agregación y degranulación de leucocitos, inhibición de la proliferación de linfocitos e incremento de la permeabilidad vascular y quimiotaxis de neutrófilos. Asimismo, se ha demostrado que el extracto DIFUR exhibe cierta inhibición dosis-dependiente de la síntesis de leucotrienos B4 en leucocitos humanos. Esta actividad inhibitoria parece ser causada por los ácidos grasos poliinsaturados linoleico, linolénico y ácido araquidónico. Dicho leucotrieno B4 es un mediador antiinflamatorio aislado en cantidades anormalmente elevadas en la piel psoriásica.

Finalmente, el extracto DIFUR ha fracasado en mostrar actividad inhibitoria sobre la

enzima ciclooxigenasa (COX-2), por lo que se comprende la escasa eficacia del producto natural en el control de determinados procesos inflamatorios.

Si DIFUR parece destinado al tratamiento de procesos inflamatorios agudos es comprensible la escasa eficacia manifestada en el modelo experimental de *T. vaginalis*, donde la infección intraperitoneal progresa bajo un patrón de hipersensibilidad retardada. Por otra parte, si los AINEs ensayados, inhibidores de la ciclooxigenasa, favorecen la disminución de las lesiones y el tratamiento con DIFUR, incapaz de inhibir la enzima, produce un incremento de las mismas, entonces merece la pena cuestionarse si la actividad ciclooxigenasa pudiera ser crítica en la evolución patológica de las lesiones abdominales y la mortalidad murina en el modelo de *T. vaginalis*.

La incorporación de un extracto bruto de *Quillaja saponaria* en el modelo de inmunomodulación de *T. vaginalis* ha permitido verificar la capacidad adyuvante del extracto sobre las defensas inmunológicas del organismo que recibe la infección parasitaria.

La composición básica del extracto de *Q. saponaria* consta de triterpenoides glicósidos de esteroides y taninos (Oakenfull, 1981) y el conocimiento de sus propiedades como adyuvante inmunológico se remontan a principios de la centuria (Mosmann & Coffman, 1989). Más recientemente, se ha ensayado la actividad inmunomoduladora de las saponinas *in vitro*, señalándose que a muy bajas concentraciones tienen capacidad para inducir la proliferación celular en cultivos de linfocitos (Chavali *et al.*, 1987).

Los mecanismos de acción que inducen la división celular se deben a la naturaleza surfactante de estos compuestos y su potencial capacidad para inducir cambios en la superficie celular.

Las saponinas pueden incrementar la permeabilidad de las células a nivel de las membranas (Álvarez & Torres Pinedo, 1982). Tales cambios en los microambientes de las membranas celulares permite incrementar el transporte de micromoléculas, lo que incluye señales transmembrana y la subsecuente división celular (Coopèr, 1973). Uno de los factores que afectan el microentorno celular pudiera favorecer la unión de ligandos mitogénicos a la

superficie celular (Singer & Nicolson, 1972). En este sentido, el agente mitogénico fitohemaglutinina (PHA) ejerce su efecto a través de la alteración de los microentornos de la superficie celular y la consecuente modificación de los eventos del transporte transmembrana (Cooper, 1973). Por su parte, la concanavalina (ConA) es un mitógeno cuyo mecanismo de acción implica el incremento de la síntesis de colesterol (Edelman, 1976; Yahare & Edelman, 1972).

Según Chavali *et al.* (1987), las saponinas administradas oralmente incrementan la proliferación celular *in vivo*, inducida por la activación de las células Th. Como por vía oral las saponinas no pasan a la circulación (Sidhu & Oakenfull, 1986), no está claro como dichos adyuvantes producen la estimulación del sistema inmunitario. Se cree que estos compuestos tiene un efecto inicial sobre el sistema inmunológico de las mucosas, el cual causa la activación de las células Th (cooperadoras) e induce la secreción de factores solubles. La entrada de estos mediadores dentro de la circulación inicia una multitud de procesos celulares. Los factores solubles actúan como una señal secundaria no específica para las células en división y diferenciación como células inmunocompetentes.

Las propiedades biológicas de las saponinas de *Q. saponaria* les convierten en buenos candidatos para la acción adyuvante en vacunas, siendo consideradas por producir una lenta liberación del antígeno en la circulación y su subsecuente localización en el hígado y el bazo (Scott *et al.*, 1984). Desafortunadamente, algunas saponinas son altamente hemolíticas (Price *et al.*, 1987), y causan un daño tisular local en el sitio de la inyección (Allison *et al.*, 1986). Comparada con la administración parenteral, sin embargo, la administración oral de saponinas es bien tolerada a mayores concentraciones (Drake *et al.*, 1982; Phillips *et al.*, 1979).

La inmunomodulación producida por formulaciones de *Q. saponaria* genera la estimulación *in vivo* de la interleucina 12 (IL-12) y su efecto sobre la respuesta humoral.

La capacidad de los adyuvantes para activar la presentación antigénica de las células durante la inducción de la respuesta inmune primaria es de importancia crítica para el desarrollo de la inmunidad protectora a numerosos patógenos. La IL-12, producida por macrófagos y

otras células presentadoras de antígenos (D'Andrea *et al.*, 1992; Macatonia *et al.*, 1995), es un potente inductor de la expresión de  $\gamma$ -IFN a través de las células T y NK (Chan *et al.*, 1991). De otra parte, es un importante factor en el control de la diferenciación de las células Th (Hsieh *et al.*, 1993), favoreciendo la expansión de los linfocitos Th1 (Seder *et al.*, 1993) y suprimiendo la diferenciación de los Th2 (Seder *et al.*, 1993; Manetti *et al.*, 1993), un efecto probablemente mediado por  $\gamma$ -IFN (Wynn *et al.*, 1994; Gately *et al.*, 1994).

En el modelo experimental de inmunomodulación de *T. vaginalis*, los animales infectados, que reciben por vía oral el extracto bruto de *Q. saponaria*, presentan el mismo nivel de lesiones que los testigos (no tratados). Esta circunstancia parece concordar con lo expuesto respecto a la actividad estimulante de la respuesta inmunitaria de tipo Th1 que se le atribuye a las saponinas. Si la expresión patológica de las lesiones presentes en la infección experimental de *T. vaginalis* viene regulada fundamentalmente por un fenómeno de inmunidad mediada por células, cualquier adyuvante inmunológico que actúe en la misma línea favorecerá la presencia de las lesiones.

En cualquier caso, la dosis ensayada de 400 mg/Kg/día, los días -10,-5 y 0 postinfección, ha producido la muerte de un significativo número de ratones, por lo que se recomienda la segunda empleada de 200 mg/Kg/día (-10,-5 y 0 días p.i.) que, si bien cuando se administra de forma aislada no disminuye las lesiones, cuando se coadministra con PAL o CTP produce un efecto sinérgico que incrementa exponencialmente la capacidad inmunomoduladora de los extractos, disminuyendo de manera espectacular las lesiones debidas a la infección con *T. vaginalis*. En cuanto a la toxicidad, Phillips *et al.* (1979) señalaron que una concentración de saponinas purificadas de 14 mg/ratón/día parece inocua.

El primer extracto vegetal con actividad inmunomoduladora ensayado ha sido PAL, de *P. leucotomos* que presenta una reconocida capacidad para modificar la respuesta inmunitaria frente a diferentes patologías como la dermatitis atópica (Jiménez y col., 1986), la psoriasis (Piñeiro, 1982; Vargas y col., 1983), el vitiligo (Mohammad, 1989) o la esclerosis múltiple (Carreño y de Castro, 1994).

Para la evaluación de la actividad inmunomoduladora del extracto PAL en el modelo experimental de *T. vaginalis* se han establecido la dosis y pauta de tratamiento más adecuadas. La dosis inicial valorada de 4 mg/Kg/día resulta ser ineficaz para promover una actividad inmunomoduladora significativa. Por su parte, las dosis de 20 y 40 mg/Kg/día manifiestan niveles similares de inmunomodulación de la respuesta del sistema inmunitario, por lo que se establece la dosis intermedia para el desarrollo de las experiencias sucesivas.

A continuación, se han ensayado dos pautas de tratamiento postinfección (p.i.), la primera del 3° al 7° día p.i. y la segunda del 8° al 12° día p.i.; ambas parecen incapaces de inducir un efecto inmunológico aparente. Finalmente, una pauta preinfección de 10 días ha resultado idónea para la expresión inmunomoduladora de los extractos vegetales en el modelo experimental.

Aún cuando la cepa de ratones BALB/c se ha mostrado la más susceptible a la infección intraperitoneal de *T. vaginalis*, se ha recurrido a la cepa NMRI para realizar la mayor parte de los ensayos de inmunomodulación por un criterio de economía y disponibilidad de animales de experimentación en nuestro laboratorio. De hecho, sólo se han utilizado ratones BALB/c para las experiencias que introducen técnicas de ELISA indirecto, por el carácter consanguíneo de la cepa.

En un principio, la elucidación de la respuesta inmunomoduladora del extracto PAL se ha restringido a la evaluación diferencial de las lesiones patognomónicas en el modelo experimental de *T. vaginalis*. En todas las experiencias realizadas con PAL, a la dosis y pauta de tratamiento prefijadas, se verifica una disminución del índice de patogenia (lesiones abdominales y mortalidad) de un 10% a un 20% respecto a los ratones testigos no tratados.

La infección experimental con *T. vaginalis* parece generar una respuesta inflamatoria de hipersensibilidad retardada coordinada por células Th1 predominantemente; el tratamiento con el extracto PAL debe afectar al balance inmunitario Th1/Th2, regulando negativamente la respuesta preponderante, lo que se traduce en la disminución de las lesiones en el marco de dicho modelo experimental.



En sentido opuesto, Cuéllar y su equipo (1997) habían demostrado que PAL inhibe la respuesta Th2 en ratones inmunizados con larvas del tercer estadio (L3) de *Anisakis simplex* y adyuvante completo de Freund por vía intramuscular. Y asimismo, Dea Ayuela *et al.* (1999) han indicado que el extracto PAL suprime la respuesta Th2 generada frente a un extracto crudo soluble de larvas L1 de *Trichinella spiralis*. Teniendo bien presente que en ambos modelos parasitarios la respuesta humoral (Th2) es prioritaria, la inhibición de la respuesta Th1, que se produce en nuestro caso, parece evidenciar que PAL presenta una actividad inmunomoduladora *sensu stricto*, ya que es capaz de regular cualquier respuesta inmunitaria alterada o aberrante inducida por el insulto inmunológico mediante el control del balance Th1/Th2.

La determinación sérica por ELISA indirecto de las citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4 parece confirmar la hipótesis sobre el tipo de respuesta inmunitaria dominante en el modelo experimental de *T. vaginalis*. De una parte, IFN- $\gamma$  es un marcador específico de la respuesta mediada por linfocitos Th1 (respuesta celular), y de otra, la IL-4 es un marcador alternativo de las respuestas mediadas por linfocitos Th2 (respuesta humoral).

De tal manera que, en la infección experimental con *T. vaginalis* (lote control), se observa un incremento muy significativo de IFN- $\gamma$  sérico que alcanza su máximo el día +10 postinfección (6825 pg/ml) y que después disminuye hasta recuperar los niveles basales (870 pg/ml). El tratamiento con PAL modula negativamente los niveles séricos de IFN- $\gamma$  que desde el nivel basal descienden a 358 pg/ml el 10º día p.i., con un máximo relativo de 378 pg/ml (día +15 p.i.).

Por su parte, en el ensayo de determinación sérica de IL-4 se presenta un incremento en el lote control, que tras la infección alcanza su máximo el día +10 postinfección (43 pg/ml) y que, posteriormente, disminuye hasta los niveles basales (19 pg/ml). En este caso, el tratamiento con PAL anticipa el máximo nivel de IL-4 (46 pg/ml) al día +5 p.i., aunque, independientemente del desfase, la dinámica de las concentraciones sea idéntica que la mostrada por el lote control.

El extracto PAL parece, pues, capaz de adelantar el nivel máximo de IL-4 en el suero de los ratones BALB/c infectados con *T. vaginalis*, aunque no pueda incrementar su concentración.

Si bien, la evolución de las citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$  en el modelo experimental de *T. vaginalis* discurre en paralelo, parece que la segunda muestra una mayor expresión, que se ve drásticamente modulada al introducir el tratamiento con PAL, en cuyo caso, la anticipación en los máximos niveles séricos de IL-4 coincide con la depresión de los niveles de IFN- $\gamma$ .

En cuanto a la composición fitoquímica del extracto PAL, solamente ha trascendido la existencia de sesquiterpenos, triterpenos, taninos y saponinas. De hecho, la calagualina, aislada de *P. leucotomos*, es una sustancia activa frente a células tumorales perteneciente a este último grupo. Los sesquiterpenos no volátiles tienen varias propiedades farmacológicas entre las que destacan la citotóxica/antitumoral y la antiinflamatoria. Las lactonas sesquiterpénicas son un subgrupo de estos compuestos, con mayor potencia en estas actividades pues se unen a grupos nucleófilos, formando bases de Schiff, que producen el bloqueo de numerosas enzimas. Los terpenos presentan complejos mecanismos de acción que afectan tanto a nivel celular como a mediadores inflamatorios (Navarro, 1998). En este sentido, se ha comprobado que mediante mecanismos que afectan a los procesos de expresión de proteínas, algunos terpenos disminuyen la biosíntesis de citocinas. Así el ácido acantoico utilizado en la medicina tradicional para el tratamiento de enfermedades reumáticas, suprime la liberación de IL-1 y TNF- $\alpha$  en monocitos humanos estimulados por sílice, sin afectar a los niveles de otras citocinas como la IL-6 (Kang et al., 1996). Por otra parte, los triterpenos son la estructura base de las saponinas -de propiedades antimicrobianas, antifúngicas y expectorantes- y de glicósidos cardiotónicos (Banthorpe, 1991; Bruneton, 1991). En cualquier caso, carecemos de la información suficiente para caracterizar el principio activo que otorga las propiedades inmunomoduladoras al extracto PAL.

La introducción de extractos con naturaleza inmunomoduladora ha permitido un mayor conocimiento de la regulación de la patogenia y la respuesta inmune a *T. vaginalis* a través de la evaluación de las lesiones y la mortalidad según el modelo de infección experimental.

En el análisis del extracto vegetal CTP, ensayado en el modelo experimental de inmunomodulación de *T. vaginalis*, se han mantenido la dosis y pauta de tratamiento de PAL para poder establecer una evaluación comparativa entre ambos.

Las experiencias realizadas con CTP muestran una vigorosa acción inmunomoduladora del extracto, que se traduce en una disminución de la patogenicidad en torno a un 15% respecto al lote testigo no tratado (control).

Nuevamente, el estudio de las citocinas IL-4 e IFN- $\gamma$  presentes en los sueros de los lotes experimentales mediante la técnica de ELISA indirecto facilita la interpretación de nuestros resultados. Si el lote control presenta la máxima concentración de IFN- $\gamma$  el día +10 p.i. (6825 pg/ml), el extracto CTP modula negativamente dichos niveles, alcanzando en el mismo periodo una concentración de 648 pg/ml.

No obstante, los perfiles de IFN- $\gamma$  de los extractos vegetales ensayados presentan dinámicas muy diferentes; si bien el lote tratado con PAL desde el nivel basal (870 pg/ml en el día -5 p.i.) desciende hasta 179 pg/ml el día de la inoculación, para finalmente mantenerse en 358 pg/ml el día +10 p.i.; por contra, el lote tratado con CTP desde el nivel basal (880 pg/ml en el día -5 p.i.) asciende ligeramente hasta 1771 pg/ml el día 0 para descender progresivamente hasta 127 pg/ml el día +15 p.i.

Asimismo, el lote tratado con CTP muestra un abrupto incremento de IL-4 que alcanza su máxima expresión el día de la inoculación del parásito (45 pg/ml) y que disminuye paulatinamente a medida que progresa el tiempo de observación experimental (32 pg/ml). Teniendo en cuenta que los niveles de IL-4 en el lote control son de 43 pg/ml (+10 p.i). Por otra parte, destacamos que el extracto CTP potencia la producción de IL-4, alcanzando el máximo incluso antes de recibir el insulto inmunológico, 10 días antes e independientemente de la infección experimental, lo que produce la inhibición de la expresión serológica del IFN- $\gamma$ .

En cuanto a la composición fitoquímica de CTP se ha señalado la presencia de ácido fumárico,  $\beta$ -sitosterol y taninos. El  $\beta$ -sitosterol presenta actividad antiinflamatoria cuando se

administra por vía oral/intraperitoneal, aunque es incapaz de inhibir la actividad enzimática de las ciclooxigenasa y lipooxigenasa (Breu *et al.*, 1992). Se ha demostrado que afectan al comportamiento de las membranas plasmáticas produciendo modificaciones en su estructura y composición (Aarad *et al.*, 1996), cambios en su fluidez y permeabilidad y alteraciones en la actividad de numerosas enzimas unidas a estas membranas (Hennessey, 1992). Por otro lado, Lozoya *et al.* (1995) demuestran la actividad inhibitoria del crecimiento que presentan los taninos en otro extracto MMT (*Mimosa tenuiflora*). No obstante, se desconoce el principio activo responsable de la actividad inmunomoduladora.

Según Rodero (1998), el extracto CTP parece deprimir la respuesta humoral T-dependiente potenciando el cambio de clase inducido por antígenos timoindpendientes de tipo II en un modelo experimental de inmunización de antígenos de LIII de *Anisakis simplex* y adyuvante completo de Freund.

Por otra parte, nos planteamos si la actividad hepatoprotectora que citan (ASAC XVII, 1998) ha podido intervenir en la disminución de las lesiones hepáticas que se producen en el modelo experimental de *T. vaginalis*. En apoyo de esta hipótesis, (ASAC XVIII, 1998) revelan por estudios histopatológicos en rata el incremento de los procesos de regeneración tras el tratamiento con el extracto.

Para concluir, se ha evaluado el potencial sinergismo entre PAL+metamizol, PAL+saponinas, CTP+metamizol, CTP+saponinas y, finalmente, PAL+CTP.

El sinergismo implica que dos agentes terapéuticos trabajen para producir un efecto mayor que el esperado; existiendo una amplia variedad de mecanismos por los cuales se puede producir un efecto sinérgico (Hlatky & Whittemore, 1991).

El extracto PAL que se administra con la dosis triple de saponinas orales produce un extraordinario efecto sinérgico en la disminución de la patogenia, aproximadamente de un 15% respecto a los testigos no tratados. Esta circunstancia, es aún más sorprendente por cuanto las saponinas individualmente no produjeron ningún efecto significativo. Si como se señaló

anteriormente, las saponinas de *Q. saponaria* potencian la respuesta Th1 a través de la activación de la IL-12 parece paradójico el comportamiento sinérgico con PAL que inhibe la respuesta Th1 en el modelo experimental de *T. vaginalis*. A no ser que el mecanismo de acción de PAL como inmunomodulador responda de manera más eficaz cuanto mayor es el estímulo (infección experimental+adyuvante). Esta hipótesis requerirá de experiencias adicionales para su confirmación.

El sinergismo entre CTP+saponinas es, quizás, más discutible, por cuanto la disminución de la patogenia del 15% es similar a la producida en el ensayo con CTP. El extracto, probablemente, anticipa los niveles de IL-4 regulando negativamente la inducción de la expresión de IFN- $\gamma$  procedente de la infección de *T. vaginalis* y del adyuvante. De todos modos, el efecto inmunomodulador de CTP parece imponerse frente a las saponinas.

El resultado de la coadministración de PAL+metamizol y CTP+metamizol resulta muy sorprendente por inesperado, ya que se produce el antagonismo de los componentes, que por separado favorecen la disminución de la patogenia en el modelo experimental de *T. vaginalis*.

En el terreno de las hipótesis se ha planteado la posibilidad de que entre los AINEs y los extractos se estableciese algún tipo de competencia, p.e. en el transporte sanguíneo a través de proteínas plasmáticas que indujese la pérdida de la eficacia antiinflamatoria e inmunomoduladora, respectivamente.

De otra parte, Tsuboi y colaboradores (1995) han descrito que los fármacos antiinflamatorios no esteroideos regulan diferencialmente la producción de citocinas en los linfocitos humanos, estimulando la producción de IFN- $\gamma$ , IL-2 y TNF- $\alpha$  e inhibiendo, en contraste, la producción de IL-4 e IL-6. En el mismo sentido, García-Álvarez y otros (1997) en un modelo de sepsis quirúrgica confirman que metamizol favorece la disminución de la IL-4 e IL-6. Estos resultados podrían explicar la contraposición entre los extractos vegetales y metamizol, pero complican la justificación del comportamiento de metamizol en un tratamiento único.

Finalmente, la sinergia que se produce en el tratamiento de PAL+CTP es la más extraordinaria de las ensayadas, la disminución de la patogenia se sitúa en torno al 20%, y parece aunar ambos efectos inmunomoduladores que tienden a inhibir la respuesta inmunitaria Th1 predominante en el modelo experimental de *T. vaginalis*. Los diferentes mecanismos de acción en los que intervienen PAL y CTP parecen explicar la resultante sinérgica del tratamiento con ambos extractos.

En conclusión, se debe señalar que al prometedor futuro de los extractos vegetales PAL y CTP como inmunomoduladores, es preciso añadir, un no menos halagüeño horizonte a la administración sinérgica de ambos, o bien, a la intervención de agentes adyuvantes de origen vegetal, como las saponinas, que dispongan la respuesta inmune del hospedador y faciliten su modulación.

## **CONCLUSIONES**

---





## 6.- CONCLUSIONES

- 1ª.- La eficacia de las tiadiazinas disustituidas sobre *Trichomonas vaginalis* no está relacionada con la introducción de radicales lipófilos en posición 3. Así, a la serie de los furfuril derivados pertenecen los compuestos más activos de la serie, tanto *in vitro* como *in vivo*.
- 2ª.- La analogía estructural de la serie de aminas acomplejadas con  $\text{Cu}^{2+}$  con derivados de las tiadiazinas disustituidas debe ser la causa de la interesante actividad tricomonocida de alguno de los compuestos de la serie. No es el caso de las tiazepinas y benzotiazepinas, cuya analogía con las fenotiazinas, productos de reconocida actividad antiprotozoósica, hizo pensar *a priori* en la posibilidad de encontrar algún compuesto activo.
- 3ª.- Considerando la complejidad de la interacción parásito-hospedador que se establece tras la infección sistémica con *T. vaginalis*, la validación del modelo murino para la determinación de la patogenia experimental del parásito debe realizarse con una cepa de referencia, en nuestro caso la C1-NIH (ATCC), de contrastada virulencia, a fin de no introducir factores de variabilidad en el sistema.
- 4ª.- Los ratones consanguíneos de la estirpe BALB/c han mostrado la máxima susceptibilidad a la infección intraperitoneal con *T. vaginalis*, si bien los NMRI responden de forma adecuada y desarrollan lesiones reproducibles, por lo que son una alternativa válida siempre que la relación coste/previsión de resultados no justifique la utilización de animales consanguíneos.
- 5ª.- La evaluación de la patogenia experimental a los 30 días de la infección no aporta mayor información que la obtenida en 15 días, siempre que se inocule un número suficiente de parásitos ( $10^7$  tricomonas/ratón).

- 6<sup>a</sup>.- El modelo murino de infección intraperitoneal detecta diferencias significativas en la patogenia experimental de los aislamientos clínicos estudiados, por lo que se propone su aplicación en ensayos de caracterización biológica de cepas de *T. vaginalis*.
- 7<sup>a</sup>.- El análisis estadístico aplicado a la valoración de la patogenia clasifica correctamente el 100% de los aislamientos clínicos estudiados, lo que confirma la validez del baremo utilizado. De otra parte, subraya la importancia del factor *lesiones* frente a la *mortalidad*, siendo la lesión hepática la más representativa de la patogenia experimental de *T. vaginalis*
- 8<sup>a</sup>.- Los ratones BALB/c infectados intraperitonealmente con *T. vaginalis* sufren un drástico incremento en los niveles séricos de IFN- $\gamma$ , que alcanza la concentración más alta en el período de máxima mortalidad, registrándose simultáneamente niveles significativos de IL-4. En consecuencia, el escenario inmunológico generado tras la infección es compatible con un proceso inflamatorio regulado por una respuesta Th1 y en menor medida Th2. El tratamiento con inmunoestimulantes, que exacerba la patogenia experimental, e inmunosupresores y AINEs, que la disminuye, confirma dicha interpretación.
- 10<sup>a</sup>.- El tratamiento con el extracto de *Polypodium leucotomos* (PAL), previo a la infección, suprime la respuesta dominante disminuyendo la concentración de IFN- $\gamma$ , a la vez que anticipa el nivel máximo de IL-4; por lo que presenta una actividad inmunomoduladora *sensu stricto*, regulando la respuesta inmunitaria mediante el control del balance Th1/Th2.
- 11<sup>a</sup>.- El tratamiento con el extracto CTP provoca una disminución de los niveles séricos de IFN- $\gamma$ , siendo el aumento de IL-4 previo e independiente de la infección experimental. Tras su administración conjunta con PAL, se produce un incremento significativo en los niveles de IL-4 con posterioridad a la infección. Ello unido al menor desarrollo de lesiones en los animales infectados tras el tratamiento demuestra el efecto sinérgico de ambos extractos.

12<sup>a</sup>.- La utilización de un extracto de *Quillaja saponaria* como adyuvante, mejora considerablemente la eficacia tanto de PAL como de CTP, lo que confirma el efecto inmunopotenciador de las saponinas.



## **BIBLIOGRÁFIA**

---



## 7.- BIBLIOGRAFÍA

### A

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H. y POBER, J. (1995). *Immunología celular y molecular*. Ed. Interamericana McGraw-Hill, Madrid.
- ABRAHAM, M. C.; DESJARDINS, M., FILION, L. G. y GARBER, G. E. (1996). Inducible immunity to *Trichomonas vaginalis* in a mouse model of vaginal infection. *Infect. Immun.*, 64 (9): 3571-3575.
- ABRAHAMSON, S. L. y GALLIN, J. L. (1990). Interleukin-4 inhibits superoxide production by human mononuclear phagocytes. *J. Immunol.*, 144: 625-630.
- ABRAMSON, S.B. y WEISSMANN, G. (1989). The mechanisms of action of nonsteroidal antiinflammatory drugs. *Arthritis Rheum.*, 32: 1-3.
- ACKERS, J. P. (1983). The immunology of *Trichomonas vaginalis* infections. *Wiad. Parazytol.*, 29: 41-44.
- ACKERS, J. P. (1990). Immunologic aspects of human Trichomoniasis. In *Trichomonads parasitic in human*, Honigberg, B. M. (ed), pp 36-52. Spinger-Verlag, New York.
- ACKERS, J. P. y LUMSDEN, W. H. R. (1978). Immunology of genito-urinary trichomoniasis. *Bull. Mem Soc. Med. Hop. Paris*, 181: 109-113.
- ACKERS, J. P.; CATTERALL, R. D.; LUMSDEN, W. H. R. y McMILLAN, A. (1978). Absence of detectable local antibody in genitourinary tract secretions of male contacts of women infected with *Trichomonas vaginalis*. *Br. J. Vener. Dis.*, 54: 168-171.
- ACKERS, J. P.; LUMSDEN, W. H. R., CATTERALL, R. D. y COYLE, R. (1975). Antitrichomonal antibodies in the vaginal secretions of women infected with *Trichomonas vaginalis*. *Br. J. Vener. Dis.*, 51: 319-323.
- ADLER, S. y SADOWSKY, A. (1947). Intra-dermal reaction in *Trichomonas* infection. *Lancet*, 252: 867-868.
- ADUNGO, N. I.; ONDIJO, S. O. y OTIENO, L. S. (1991). Intestinal parasitoses and other infections in a college community. *East African Med. J.*, 68 (1): 52-56.
- ALCALDE, E.; DINARÉS, I. y PÉREZ-GARCÍA, L. (1995). Heterocyclic betaines. XXII. Azinium(Azolium) 4-nitrobenzimidazololate inner salts and their derivatives with several interannular spacers. Synthesis, characterization and antitrichomonal activity. *Chem. Pharm. Bull.*, 43 (3): 493-498.
- ALDERETE, J. F. (1983a). Antigen analysis of several pathogenic strains of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.*, 39: 1041-1047.
- ALDERETE, J. F. (1983b). Identification of immunogenic and antibody-binding membrane proteins pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.*, 40: 284-291.
- ALDERETE, J. F. (1984). Enzyme-linked immunoabsorbent assay for detecting antibody to *Trichomonas vaginalis*: Use of whole cells and aqueous extract as antigen. *Br. J. Vener. Dis.*, 60: 164-170.
- ALDERETE, J. F. (1987a). Biology and virulence of *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis. In *Trichomonads and Trichomoniasis*, Part.I (Kulda, J. and Cerkasov, J., eds.). pp. 357-372.
- ALDERETE, J. F. (1987b). *Trichomonas vaginalis* NYH286 phenotypic variation may be coordinated for a

- ALDERETE, J. F. (1987b). *Trichomonas vaginalis* NYH286 phenotypic variation may be coordinated for a repertoire of trichomonad surface immunogens. *Infect. Immun.*, 55: 1957-1962.
- ALDERETE, J. F. (1988). Alternating phenotypic expression of two classes of *Trichomonas vaginalis* surface markers. *Rev. Infect. Dis.*, 10 (Supl. 2): S408-S412.
- ALDERETE, J. F. y GARZA, G. E. (1984). Soluble *Trichomonas vaginalis* antigens in cell free culture supernatants. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 13: 147-158.
- ALDERETE, J. F. y PEARLMAN, E. (1984). Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *Br. J. Vener. Dis.*, 60: 99-105.
- ALDERETE, J. F. y GARZA, G. E. (1988). Identification and properties of *Trichomonas vaginalis* proteins involved in cytoadherence. *Infect. Immun.*, 56: 28-33.
- ALDERETE, J. F.; ARROYO, R.; DAILEY, D.C.; ENGBRING, J.; KHOSHANAN, M.A. y LEHKER, M.W. (1992). Molecular analysis of *Trichomonas vaginalis* surface protein repertoires. *Mol. Cell Biol. Hum. Dis. Ser.*, 1: 173-202.
- ALDERETE, J. F.; ARROYO, R. y LEHKER, M. W. (1994). Identification of fibronectin as a receptor for bacterial cytoadherence. *Methods Enzymol.*, 236: 318-333.
- ALDERETE, J.F.; DEMES, P.; GOMBOSOVA, A.; VALENT, A.; YANOSKA, A.; FABUSOVA, H.; GARZA, G.E. y METCALFE, E.C. (1987). Phenotypes and protein-epitope phenotypic variation among fresh isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.*, 55: 1037-1041.
- ALDERETE, J.F.; ENGBRING, J.; LAURIANO, C. M. y O'BRIEN, J. L. (1998). Only two of the *Trichomonas vaginalis* triplet AP51 adhesins are regulated by iron. *Microb. Pathog.*, 24 (1): 1-16.
- ALDERETE, J. F.; GARZA, G. E.; SMITH, J. y SPENCE, M. (1986). *Trichomonas vaginalis*: Electrophoretic analysis and heterogeneity among isolates due to high-molecular-weight trichomonad proteins. *Exp. Parasitol.*, 61, 244-251.
- ALDERETE, J. F.; LEHKER, M. W. y ARROYO, R. (1995). The mechanisms and molecules involved in cytoadherence and pathogenesis of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Today*, 11(2): 70-74.
- ALDERETE, J. F. ; NEWTON, E.; DENNIS, C.; ENGBRING, J.A. y NEALE, K.A. (1991a). Vaginal antibody of patients with trichomoniasis is to prominent surface immunogen of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourinar. Med.*, 67: 220-225.
- ALDERETE, J.F.; NEWTON, E.; DENNIS, C. y NEALE, K.A. (1991b). The vagina of women infected with *Trichomonas vaginalis* has numerous proteinases and antibody to trichomonal proteinases. *Genitourinar. Med.*, 67: 469-474.
- ALDERETE, J. F. ; O'BRIEN, J.L.; ARROYO, R.; NEWTON, E.; ENGBRING, J.A.; MUSATOVOVA, O.; LÓPEZ, O.; LAURIANO, C. y NGUYEN, J. (1995). Cloning and molecular characterization of two genes encoding adhesion proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol. Microbiol.*, 17: 69-83.
- ALDERETE, J. F.; PROVENZANO, D. y LEHKER, W. (1995). Iron mediates *Trichomonas vaginalis* resistance to complement lysis. *Microb. Pathog.*, 19: 93-103.
- ALONSO-SANZ, M.; CHAVES, F.; SÁNCHEZ, S.; ROMERO, N. y DRONDA, F. (1996). Microbiological study of some microorganisms implicated in sexually transmitted disease among the female prison



- population. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 14 (8): 474-478.
- ÁLVAREZ, X.; FRANCO, A.; FERNÁNDEZ, L. y CACABELOS, R. (1992). Effects of Anapsos on behaviour and brain cytokines in rats. *Ann. Psych.*, 3: 329-341.
- ÁLVAREZ, X.; ZAS, R.; LAGARES, R.; FRANCO, A.; MANEIRO, E.; MIGUEL-HIDALGO, J. J.; FERNÁNDEZ-NOVOA, L.; DÍAZ, J y CACABELOS, R. (1995). Neuroimmunomodulatory and neurotrophic activity of Anapsos: Studies with laboratory animals. *Ann. Psych.*, 5: 267-280.
- ÁLVAREZ, X.; FRANCO MASIDE, A.; ZAS, R.; SEMPERE, J. M.; DÍAZ, J.; CACABELOS, R. (1997). Anapsos reverses interleukin-1 beta overexpression and behavioral deficits in nbM-lesioned rats. *Meths. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 19 (5): 299-309.
- ÁLVAREZ, J. R. y TORRES PINEDO, R. (1982). Interactions of soybean lectin, soysaponins and glycinin with rabbit jejunal mucosa *in vitro*. *Pediatr. Res.*, 16: 728-731.
- ANDREA, A. D'; RENGARAJU, M.; VALIANTE, N. M.; CHEHIMI, J.; KUBIN, M.; ASTE, M.; CHAN, S. H.; KOBAYASI, M.; YOUNG, D.; NICKBARG, E.; CHIZZONITE, R; WOLF, S. F. y TRINCHIERI, G. (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.*, 176: 1378-1398.
- ARAUJO, D. M.; LAPCHAK, P. A.; COLLIER, B. y QUIRIÓN, R. (1989). Localization of the interleukin-2 immunoreactivity and interleukin-2 receptors in the rat brain: Interaction with the cholinergic system. *Brain Res.*, 498: 257-266.
- ARROYO, R. y ALDERETE, J.F. (1989). *Trichomonas vaginalis* surface proteinase activity is necessary for parasite adherence to epithelial cells. *Infect. Immun.*, 57: 2991-2997.
- ARROYO, R. y ALDERETE, J. F. (1995). Two *Trichomonas vaginalis* surface proteinases bind to host epithelial cells and are related to levels of cytoadherence and cytotoxicity. *Arch. Med. Res.*, 26 (3): 279-285.
- ARROYO, R.; ENGBRING, J. y ALDERETE, J.F. (1992). Molecular basis of host epithelial cell recognition by *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Microbiol.*, 6: 853-862.
- A.S.A.C. *Pharmaceutical International*, A. I. E. (1999). Informe confidencial sobre la actividad biológica del extracto CTP (I-XVIII). Alicante, España.
- ASAMI, K. (1963). Effects on metronidazole on *Trichomonas vaginalis* in culture and in an experimental host. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 12: 535-538.
- ASAMI, K. y NAKAMURA, M. (1955). Experimental inoculation of bacteria-free *Trichomonas vaginalis* into human vaginae and its effect on the glycogen content of vaginal epithelia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 4: 254-258.
- ASANO, K.; MATSUO, S. y OKAMOTO, K. (1993). Lymphokine production by mesenteric lymph node cells from BALB/c mice during *Hymenolepis nana* infection. *Int. J. Parasitol.*, 23 (1): 51-56.
- ASANO, K.; MATSUO, S. y OKAMOTO, K. (1995). Generation of effector T cells in *Hymenolepis nana*-infected, FK-506-treated BALB/c mice. *Immunol. Letters*, 46: 195-198.
- ASANO, K.; MATSUO, S. y OKAMOTO, K. (1996). Mode of action of FK-506 on protective immunity to *Hymenolepis nana* in mice. *In vivo*, 10 (6): 537-545.

ATANU, R.; GULATI, A.K.; PANDEY, L.K.; PANDEY, S. (1989). Prevalence of common infective agents of vaginitis. *J. Comm. Dis.*, 21 (3): 241-244.

ATIENZA, J.; MARTÍNEZ DÍAZ, R. A.; GÓMEZ BARRIO, A.; ESCARIO, J. A.; HERRERO, A.; OCHOA, C.; RODRÍGUEZ, J. (1992). Activity assays of thiaziazine derivatives on *Trichomonas vaginalis* and amastigotes forms of *Trypanosoma cruzi*. *Chemotherapy*, 38 (6): 441-446.

AVENDAÑO, C. (1994). *Introducción a la Química Farmacéutica*. Ed. Interamericana McGraw Hill, Madrid.

AWAD, A.B.; CHEN, Y.C.; FINK, C.S.; HENNESSEY, T. (1996).  $\beta$ -sitosterol inhibits HT-29 human colon cancer cell growth and alters membrane lipids. *Anticancer Res.*, 16: 2797-2804.

## B

BACH, J.F. (1985). Azathioprine. In: *The mode of action of immunosuppressive agents* (A. Neuberger & T.B. Strom Eds.) Elsevier Amsterdam p. 105.

BALIS, F. M. (1986). Pharmacokinetic drug interactions of commonly used anticancer drugs. *Clin. Pharmacokin.*, 11: 223-235.

BALLEARI, E.; MASSA, G.; MUSSELLI, C.; TIMITILLI, S.; BATTAGLIA, A. y GHIO, R. (1993). In vivo effects of thymustimulin on hematopoiesis of mice treated with cyclophosphamide. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, 68 (3): 363-367.

BARBERIS, I. L.; PÁJARO, M. C.; GODINO, S.; PASCUAL, L.; RODRÍGUEZ, I.; AGUERO, M. y ORDÓÑEZ, C. (1998). Survey of sexually transmitted diseases in the region of Rio Cuarto. *Medicina (B. Aires)*, 58 (5 Pt 1): 469-473.

BARRIOS-RODILES, M.; KELLER, K.; BELLEY, A. y CHADEE, K. (1996). Non-esteroidal antiinflammatory drugs inhibit cyclooxygenase-2 enzyme activity but not mRNA expression in human macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 225: 896-900.

BEDROSIAN, I.; SOFIA, R. D.; WOLFF, S. M. y DINARELLO, C. A. (1991). Taurolidone, an analogue of the amino acid taurine, suppresses interleukin 1 and tumor necrosis factor synthesis in human peripheral blood mononuclear cells. *Cytokine*, 3 (6): 586-575.

BEHRENS, T. W. y GOODWIND, J. S. (1989). Glucocorticoids. In *Arthritis and allied conditions*. (McCarthy, D. J. ed.). Leda and Fabiger. pp. 604-621.

BELL, T.A.; FARROW, J.A.; STAMM, W.E.; CRITCHLOW, C. W. y HOLMES, K.K. (1985). Sexually transmitted diseases in females in a detention center. *Sex. Transm. Dis.*, 12: 144.

BELTRÁN BUITRAGO, R.; MARTÍNEZ, B. P. y RUIZ JIMÉNEZ, F. J. (1983). Nuevo tratamiento efectuado con 130 niños afectados de dermatitis atópica. *XIII Congreso Nacional de la Sociedad Española de Alergia e Inmunología Clínica*. Sevilla.

BEN-YEHUDA, O.; TOMER, Y. y SHOENFELD, Y. (1988). Advances in therapy of autoimmune diseases. *Semin. Arthritis Rheum.*, 17: 206-208.

BENNETT, W. M. y NORMAN, D. J. (1986). Action and toxicity of cyclosporine. *Annu. Rev. Med.*, 37: 215-224.

BERD, D. y MASTRANGELO, M.J. (1987a). Effect of low dose cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: reduction of T suppressor function without depletion of the CD8<sup>+</sup> subset. *Cancer Res.*

47: 3317-3321.

- BERD, D. y MASTRANGELO, M.J. (1987b). Elimination of immune suppressor mechanisms in humans by oxazaphosphorines. *Meth. Find. Exptl. Clin. Pharmacol.* 9: 569-577.
- BERD, D. y MASTRANGELO, M.J. (1988). Effect of low dose cyclophosphamide on the immune system of cancer patients: Depletion of CD4<sup>+</sup>, 2H4<sup>+</sup> suppressor inducer T cells. *Cancer Res.*, 48: 1671-1675.
- BERGER, I.; BARRIENTOS, A. C.; CÁCERES, A. C.; HERNÁNDEZ, M.; RASTRELLI, L.; PASSREITER, C. M.; KUBELKA, W. (1998). Plants used Guatemala for the treatment of protozoal infections: II. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. *J. Etnopharmacol.*, 62 (2): 107-115.
- BERTHÉLOT, P.; VACCHER, C.; FLOUQUET, N.; VIANA, M. N.; SABEL, J. y DEBAERT, M. (1991). Préparation de dérivés d'oximes, d'hydrazones et de dichloroacétamides. Recherches d'activité antiparasitaire. *Ann. Pharmaceutiques Françaises*, 49 (1): 31-39.
- BERTON, G.; ZENT, L.; CASSATELLA, M. A.; ROSSI, F. (1986). Gamma interferon is able to enhance the oxidative metabolism of human neutrophils. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 138: 1276-1282.
- BHATT, R.; PANDIT, D.; DEODHAR, L.; BHISE, R. y CHATTERJEE, D. K. (1993). Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* isolated from symptomatic and asymptomatic cases. *J. Post. Med.*, 39 (4): 187-189.
- BIAGI, F. (1980). *Enfermedades parasitarias*. 2ª Ed. La prensa médica mexicana 60:125-129.
- BIRNHAUM, H. von; KRAUSSOLD, E. (1975). *Blastomyces* and *Trichomonas vaginalis* infections during the use of hormonal and intruterine contraception. *Zentralbl. Gynäkol.*, 97: 1636-1640.
- BISTONI, F.; BACCARINI, M.; PUC CETTI, P.; MARCONI, P. y GARACI, E. (1984). Enhancement of natural killer cell activity in mice by treatment with a thymic factor. *Cancer Immunol. Immunother.*, 17 (1): 51-55.
- BJORKMAN, P. J.; SAPER, M. A.; SAMRAOUI, B.; BENNETT, W. S.; STROMINGER, J. L. y WILLEY, D. C. (1987). The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature*, 329: 512-518.
- BLACK, D. J. y LIVINGSTON, R. B. (1990). Antineoplastic drugs in 1990: a review. *Drugs*, 39: 489-501, 652-673.
- BLANC, D. S. (1992). Determination of taxonomic status of pathogenic and nonpathogenic *Entamoeba histolytica* zymodemes using isoenzyme analysis. *J. Protozool.*, 39: 471-479.
- BOGOVSKY, P. A. y TERAS, J. (1958). Pathologico-anatomical changes in the white mice in intraperitoneal infection with *Trichomonas vaginalis*. *Med. Parazit. Bolezni*, 27: 194-199.
- BOMALASKI, J. S.; HIRATA, F. y CLARK, M. A. (1986). Aspirin inhibits phospholipase C. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 139: 115-121.
- BORCHARDT, K.A.; AL-HARACI, S.; MAIDA, N. (1995). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in a male sexually transmitted disease clinic population by interview, wet mount microscopy, and the InPouch TV test. *Genitourin. Med.*, 71 (6): 405-406.
- BORCHARDT, K.A.; HERNÁNDEZ, V.; MILLER, S.; LOAICIGA, K.; CRUZ, L.; NARANJO, S.; MAIDA,

- N. (1992). A clinical evaluation of trichomoniasis in San José, Costa Rica, using the InPouch TV test. *Genitour. Med.*, 68 (5): 328-330.
- BOUIC, P.J.D.; ETSEBETH, S.; LIEBENBERG, R.W.; ALBRECHT, C.F.; PEGEL, K.; VAN JAARSVELD, P.P. (1996).  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol glucoside stimulate human peripheral blood lymphocyte proliferation: implications for their use as an immunomodulatory vitamin combination. *Int. J. Immunopharmacol.*, 18: 693-700.
- BOURÉE, P. y ISSOIRE, C. (1992). Évaluation *in vitro* de l'activité du butoconazole sur *Trichomonas vaginalis*. *Path. Biol.*, 40 (5): 492-494.
- BOUVET, J.P.; LAURENT, B.; RENE, P. y JACQUES, P. (1994). Immunoglobulin G antibodies in human vaginal secretions after prenatal vaccination. *Infect. Immun.*, 62: 3957-3961.
- BRAMLEY, M.; KINGHORN, G. (1979). Do oral contraceptives inhibit *Trichomonas vaginalis*? *Sex. Transm. Dis.*, 6: 261-263.
- BRASSEUR, P.; BALLEST, J. J. y SABEL, J. (1985). *Trichomonas vaginalis* derived chemotactic activity for human polymorphonuclear leucocytes. *Abstracts Int. Symp. Trichomonads & Trichomiasis*, p. 51.
- BREDER, C. D.; DINARILLO, C. A. y SAPER, C. B. (1988). Interleukin-1 immunoreactive innervation of the human hypothalamus. *Science*, 240: 321-324.
- BRETSCHER, P. A.; WEI, G.; MENON, J. N. y BIELEFELDT-OHMANN, H. (1992). Establishment of stable, cell-mediated immunity that makes "susceptible" mice resistant to *Leishmania major*. *Science*, 257: 539-542.
- BREU, W.; HAGENLOCHER, M.; REDL, K.; TITTEL, G.; STADLER, F.; WAGNER, H. (1992). Antiphlogistische Wirkung eines mit hyperkritischem Kohlendioxid gewonnenen Sabalfrucht-extraktes. *Arzneim-Forsch./Drug. Res.*, 42: 547-551.
- BRITO, E. B.; MENEZES, R. C.; MARTINS, S. J.; BASTOS, M. G. y SOUSA, A. (1996). Preliminary study on low-trait genital infection and cervical epithelial dysplasia in women from the Parakana tribe of South America. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, 42 (1):11-15.
- BROWN, J. H.; JARDETSKY, T.; SAPER, M.A.; SAMRAOUI, B.; BJORKMAN, P. J. y WILEY, D.C. (1988). A hypothetical model of the foreign antigen binding site of class II histocompatibility molecules. *Nature*, 332: 845-850.
- BRUGEROLLE, G.; GOBERT, J. G.; SABEL, J. (1974). Étude ultrastructurale des lésions viscérales provoquées par l'injection intrapéritoneale de *Trichomonas vaginalis* chez le souris. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 49: 301-318.
- BRUGEROLLE, G. y TAYLOR, F. J. R. (1977). Taxonomy, cytology, and evolution of the Mastigophora. *Fifth International Congress of Protozoology*, p. 24.
- BUCHNER, Y. y EDWARDS, D. J. (1975). The effect of metronidazole and nitrofurans on the morphology of *Trichomonas vaginalis*. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1: 229-234.
- BURCH, T. A.; REES, C. W. y KAYHOE, D. E. (1959). Laboratory and clinical studies on vaginal trichomoniasis. *Am. J. Obst. and Gyn.*, 76: 658-665.
- BURCH, T. A.; REES, C. W. y REARDON, L.V. (1958). Epidemiological studies on human trichomoniasis. *Am. J. Trop. Med.*, 8: 312-318.

## BIBLIOGRAFÍA

---

BUTLER, K. HOWES, H. L.; LYNCH, J. E. y PIRIE, D. K. (1972). Nitroimidazole derivatives. Relationship between structure and antitrichomonal activity. *J. Med. Chem.*, 10: 891-897.

## C

CACABELOS, R.; BARQUERO, M.; GARCÍA, P.; ÁLVAREZ, X. A. y VARELA DE SEIJAS, E. (1991). Cerebrospinal fluid interleukin-1 beta in Alzheimer's disease and neurological disorders. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 13: 455-458.

CACABELOS, R y TAKEDA, M. (1995). Neuroimmunomodulatory and neurotrophic activity of Anapsos: studies with laboratory animals. *Ann. Psych.*, 5: 510-514.

CÁCERES, A.; LÓPEZ, B.; GONZÁLEZ, S.; BERGER, I.; TADA, I. y MAKI, J. (1998). Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. *J. Ethnopharmacol.*, 62 (3): 195-202.

CAMPBELL, W. C. (1983). Progress and prospects in the chemotherapy of nematode infections of man and other animals. *J. Nematol.*, 15: 608-615.

CAMERON, D. W. y PADIAN, N.S. (1990). Sexual transmission of HIV and the epidemiology of other sexually transmitted diseases. *AIDS*, 4 (Sup. 1): S99-S103.

CAPPUCCINELLI, P; LATTES, C; CAGLIANI, I; PONZI, A. N. (1974). Features of intravaginal *Trichomonas vaginalis* infection in the mouse and the effect of estrogen treatment and immunodepression. *G. Bacteriol. Virol. Immunol. Ann. Osp. Maria Vittoria Torino. (Parte I: Ser. Microbiol.)* 67: 31-40.

CARDOSO, J. E.; QUEIROZ, R. O.; GRANDI, T. S. M.; OLIVEIRA, A. B. de; ZANI, C. L. (1990). *In vitro* activity of extracts from compositae plant species against blood forms of *Trypanosoma cruzi*, strain Y. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 85 (supl. 1): 102.

CARNERI, I. Di; CANTONE, A.; EMANUELI, A.; GIRALDI, P.N.; LOGEMANN, W.; MEINARDI, C.; MONTI, G.; NANNINI, G.; TOSOLINI, G. y VITA, G. (1969). Nitrimidazine: a new systemic trichomonacide. In Proc. Sixth Int. Cong. Chemother., Tokyo, Japan, 1969. In *Progress in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* 1, 1970, (H. Umezawa ed.) Baltimore. University Park Press. pp. 149-154.

CARNERI, I. Di; GIORGI, A.; MATTEO, L. di; GRASSI, L. Jr; TRANE, F.; GUASCHINO, S. (1989). Vaginal trichomoniasis in sharp decline in Lombardy. On account of fear of AIDS?. *G. Malatt. Infet. e Parassitar.*, 41 (4): 399-402.

CARNERI, I. Di y RE, F. Di (1970). Tricomoniasis vaginal y estados precancerosos del cuello uterino: informe preliminar. *J. Obst. Gynaec. B. Comm.*, 77 (11): 1016-1018.

CARNEY, W.; RUBIN, R. H.; HOFFMAN, R. A.; HASEN, W. P.; HEALEY, K. y HIRSCH, M. S. (1981). Analysis of the lymphocyte subsets in cytomegalovirus mononucleosis. *J. Immunol.*, 126: 2114.

CARREÑO, M. M. y CASTRO, P. DE (1994). Fenotipo inmunológico y tratamiento con *Polypodium leucotomos* en pacientes con esclerosis múltiple. *Neurología*, 10: 509.

CASAS TINEO, M.; ALONSO GARCÍA, G. y CASAS MARTÍN, M. (1988). Observaciones al tratamiento del Herpes zóster con Anapsos como única medicación. *Antol. Dermatol.*, 10: 24-27.

CAVALIER-SMITH, T. (1987). Eukaryotes without mitochondria. *Nature (London)* 326: 332-333.

- CAVALIER-SMITH, T. (1990). The symbiotic origin of peroxisomes, p. 515-521. In P. Nardon, V. Gianinazzi-Pearson, A. M. Grenier, L. Margulis y D.C. Smith (eds.), *Endocytobiology IV*. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris.
- CAVALIER-SMITH, T. (1993). Kingdom Protozoa and its 18 Phyla. *Microbiol. Rev.*, 57 (4): 953-994.
- CAVIER, R. (1969). Sur l'essai pharmacologique des trichomonacides. *Ann. Pharm. Françaises*, 27 (3): 207-216.
- CAVIER, R.; MOSSION, X. (1956a). Essais d'infestation expérimentale de la ratte par *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1837). *C. R. Acad. Sci. Paris* 242: 2412-2414.
- CAVIER, R.; MOSSION, X. (1956b). Nouveaux essais d'infestation expérimentale de la ratte par *Trichomonas vaginalis* (Donné, 1837). *C. R. Acad. Sci. Paris* 243: 1807-1809.
- CAVIER, R.; QUEMERAIS, M. J. y SAVEL, J. (1960). L'essai pharmacologique des médicaments trichomonocides sur la ratte expérimentalement infestée par *Trichomonas vaginalis* Donné, 1837. *Thérapie* 15: 361-367.
- CAVIER, R.; GOBERT, J. G.; SAVEL, J. (1972). Application d'une méthode d'infestation intrapéritoneale de la souris par *Trichomonas vaginalis* à l'étude pharmacologique des trichomonacides. *Ann. Pharm. Fr.*, 30: 637-642.
- CERKASOVOVÁ, A.; CERKASOV, J. y KULDA, J. (1988). Resistance of *Trichomonads* to metronidazole. *Acta Univ. Carolinae-Biol.*, 30 (1986): 485-503.
- CLAMAN, H. N. (1983). Glucocorticosteroids. I. Anti-inflammatory mechanism. II. The clinical response. *Hosp. Pract.* 18: 123-143.
- CLEMENTS, P.J. y DAVIS, J. (1986). Citotoxic drugs: Their clinical application to the rheumatic diseases. *Semin. Arthritis Rheum.*, 15: 231-234.
- CLEVELAND, L.R. (1928). *Tritrichomonas fecalis* nov. sp. of man; its ability to grow and multiply indefinitely in faeces diluted with tap water and frogs and tadpoles. *Am. J. Hyg.*, 8: 232-255.
- COGNE, M., BRASSEUR, P. y BALLEET, J. J. (1985). Detection and characterization of serum antitrichomonal antibodies in urogenital trichomoniasis. *J. Clin. Microbiol.*, 21: 588-592.
- COHN, M.; STEWART, P. (1992). Prevalence of potential pathogens in cervical canal before termination of pregnancy. *Br. Med. J. (Clinical Research Edition)*, 304 (6840): 1479.
- COMBESCOT, C. H.; PESTRE, M.; DOMENECH, A. (1957b). Action de la testostérone sur l'infestation expérimentale de la ratte albinos par *Trichomonas vaginalis*. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 151: 953-954.
- COMBESCOT, C. H.; PESTRE, M.; DOMENECH, A. (1957c). pH vaginal et infestation expérimentale à *Trichomonas vaginalis* chez la ratte albinos. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 151: 549-551.
- CONTRERAS, M. (1984). *Trichomonas vaginalis*: Cribado farmacológico de nuevos productos de síntesis. *Tesis de Licenciatura*. Departamento de Parasitología. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- COOMBS, G. H.; BREMMER A. F.; MARKAM, D. J.; LATTER, V. S.; WALTERS, M. A. Y NORTH, M. J. (1987). Intravaginal growth of *Trichomonas vaginalis* in mice. In Kulda, J.; Cerkasov, J. (eds.): Proc. Int. Symp. Trichomonads & Trichomoniasis, Prague, July 1985 (Post-Symp. Publ. Pt. 1). *Acta*

- Univ. Carolinae (Prague) Biol.* 30 (3-4):387-392, (1986).
- COOPER, H. L. (1973). Effects of mitogens on the mitotic cycle: a biochemical evaluation of lymphocyte activation. In *Drugs and the Cell Cycle*. (Zimmerman, A. M.; Padilla, G. M. y Cameron, J. L. eds.). Academic Press, New York. pp.137-194.
- COOPER, A. J. L. (1983). Biochemistry of sulphur-containing aminoacids. *Ann. Rev. Biochem.*, 52: 187-222.
- COOPER, P. D. (1994). The selective induction of different immune responses by vaccine adjuvants, In *Strategies in vaccine design*, Ada, G. L. (ed), R. G. Landes Company Austin (Texas), pp. 125-158.
- CORRALES, H. y PADILLA, P. (1974). A new agent (hydrophilic fraction of *Polypodium leucotomos*) for the management of psoriasis (opening discussion). *Proceedings of the XIV International Congress. Padua-Venice*.
- CORBEIL, L. B. (1995). Use of an animal model of trichomoniasis as a basis for understanding this disease in women. *Clin. Infect. Dis.*, 21(Sup. 2):S158-S161.
- COSAR, C. y JOLOU, L. (1959). Activité de 1(2-hydroxyethyl)-2-methyl-5-nitroimidazole (8823 R.P.) vis-à-vis des infections expérimentales à *Trichomonas vaginalis*. *Ann. Inst. Pasteur (Paris)*, 96: 238-241.
- COSIMI, A. B. (1987). Clinical development of Orthoclone OKT3. *Trans. Proc.*, 19 (2 Suppl. 1): 7-16.
- COSTA e SILVA FILHO, F.; de SOUSA, W. y LOPES, J. D. (1988). Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 8042-8046.
- COTEC (1997). 9. *Química verde. Documentos COTEC sobre oportunidades tecnológicas*. Editorial FUNDACIÓN COTEC para la innovación tecnológica, Madrid.
- COULIBALY, S. O.; M'BRAS, F.; SOURGOU, F.; PARE, J.; OUEDRAOGO, J. B.; KONE, B.; LANKOUANDE, J.; LANKOUANDE, S.; GUIGUEMDE, T. R. (1994). The role of yeast in the aetiologies of leucorrhoea in patients presenting to the Obstetrics and Gynecology Department of the Central Hospital in Ouagadougou, Burkina Faso. *J. Mycol. Med.*, 4 (4): 237-238.
- CUADRAS, C. M. (1984). *Fundamentos de Estadística*. (Promociones Publicaciones Universitarias ed.). Barcelona.
- CUCKLER, A. C.; MALANGA, C. M., CONROY, J. (1970). Therapeutic efficacy of new nitroimidazoles for experimental trichomoniasis, amebiasis and trypanosomiasis. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 19 (6): 916-925.
- CUÉLLAR DEL HOYO, C; RODERO MARTÍNEZ, M.; BOLÁS FERNÁNDEZ, F. y MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R. (1997). The effects of *Polypodium leucotomos* extract on the specific antibody production patterns in BALB/c mice immunized with third stage larvae antigens of *Anisakis simplex*. *Int. J. Pharmacognosy*, 35 (3): 153-160.
- CUPPS, T.R.; EDGAR, L.C. y FAUCI, A.S. (1982). Suppression of human B lymphocytes function by cyclophosphamide. *J. Immunol.*, 128: 2453-2456.
- COMBESCOT, C. H.; PESTRE, M.; DOMENECH, A. (1957a). Action de la progestérone sur l'infestation expérimentale de la ratte albinos par *Trichomonas vaginalis*. *C. R. Soc. Biol. (Paris)* 151: 332-334.
- COVER, B. y GUTTERIDGE, M. A. (1982). A primary screening for drugs to prevent transmission of Chagas

disease during blood transfusion. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76: 633-635.

## CH

- CHAN, S. H.; PERUSSIA, B.; GUPTA, J. W.; KOBAYASHI, M.; POSPISIL, M.; YOUNG, H. A.; WOLF, S. H.; YOUNG, D.; CLARK, S. C.; TRINCHIERI, G. (1991). Induction of interferon gamma production by natural killer cells stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.*, 173: 869-879.
- CHAN, C.; YIN, H.; GARFORTH, J.; McKIE, J. H.; JAOUHARI, R.; SPEERS, P.; DOUGLAS, K. T.; ROCK, P. J.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L. y FAIRLAMB, A. H. (1998). Phenothiazine inhibitors of trypanothione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. *J. Med. Chem.*, 41 (2): 148-156.
- CHAPPAZ, G. y BERTRAND, P. (1965). Évolution du problème de la trichomonase depuis cinq ans. *Gynaecolog.*, 160: 17-33.
- CHARLES, S.X. (1991). Epidemiology of *Trichomonas vaginalis* in rural adolescent and juvenile children. *J. Trop. Pediatrics*, 37 (2): 90.
- CHAVALI, S. R.; FRANCIS, T. y CAMPBELL, J. B. (1987). An *in vitro* study of immunomodulatory effects of some saponins. *Int. J. Immunopharmacol.*, 9 (6): 675-683.
- CHER, D. J. y MOSSMAN, T. R. (1987). Two types of murine helper T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. *J. Immunol.*, 138: 3688-3694.
- CHIKUNGUWO, S.; MASON, P. R. y READ, J. S. (1985). Investigation of *Trichomonas vaginalis* secretions and chemotactic factor. *Abstracts Int. Symp. Trichomonads & Trichomoniasis*, Prague, p. 57.
- CHIPPERFIELD, E. J. y EVANS, B.A. (1972). The influence of local infection on immunoglobulin formation in the human endocervix. *Clin. Exp. Immunol.*, 11: 219-223.
- CHOUBISA, S. L. y CHOUBISA, L. (1991). Prevalence of vaginal trichomoniasis in Dungarpur district of Rajasthan. *Indian J. Parasitol.*, 15 (2): 90.
- CHOROMANSKI, L.; BEAT, D. A.; NORDIN, J. H.; PAN, A. A. y HONIGBERG, B. M. (1985). Further studies on the surface saccharides in *Trichomonas vaginalis* strains by fluorescein-conjugated lectins. *Z. Parasitenkd.*, 71: 443-458.

## D

- DAILEY, D.C. y ALDERETE, J.F. (1991). The phenotypically variable surface protein of *Trichomonas vaginalis* has a single, tandemly repeated immunodominant epitope. *Infect. Immun.*, 59: 2083-2089.
- DAILEY, D.C.; CHANG, T.H. y ALDERETE, J.F. (1990). Characterization of *Trichomonas vaginalis* haemolysis. *Parasitology*, 101: 171-175.
- DAMIBA, A.E.; VERMUND, S.H. y KELLEY, K.F. (1990). Prevalence of gonorrhoea, syphilis and trichomoniasis in prostitutes in Burkina Faso. *East African Medical J.*, 67 (7): 473-477.
- DANAN, A.; CHARON, D.; KIRCHIAKARIAN, S.; BORIES, C. y LOISEAU, P. M. (1997). Synthesis and antiparasitic activities of amidinic azolated derivatives. *Il farmaco*, 52 (4): 227-229.



## BIBLIOGRAFÍA

---

- DAS, A.; JANA, S.; CHAKRABORTY, A. K.; KHODAKEVICH, L.; CHAKRABORTY, M. S.; PAL, N. K. (1994). Community based survey of STD/HIV infection among commercial sex-workers in Calcutta (India): Part III. Clinical findings of sexually transmitted diseases (STD). *J. Comm. Dis.*, 26 (4): 192-196.
- DAS GUPTA, B. M. y DIKSHIT, B. B. (1929). Berberine in the treatment of oriental sore. *Indian Med. Gaz.*, 64: 67-70.
- DAVIES, A. G.; CLAY, J. C. (1992). Prevalence of sexually transmitted disease infection in women alleging rape. *Sex. Transm. Dis.*, 19 (5): 298-300.
- DEA AYUELA, M. A.; RODERO, M.; RODRÍGUEZ BUENO, R.; BOLÁS FERNÁNDEZ, F. y MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R. (1999). Modulation by Anapsos (*Polypodium leucotomos* extract) of the antibody responses against the nematode parasite *Trichinella spiralis*. *Phytother. Res.*, 13: 1-5.
- DEBBIA, E. A.; CAMPOPRA, U.; MASSARO, S.; BOLDRINI, E. y SCHITO, G. C. (1996). In vitro activity of metronidazole alone and in combination with clotrimazol against clinical isolates of *Trichomonas vaginalis*. *J. Chemother.*, 8 (2): 96-101.
- DEFRANCO, T.; AUBRY, J.; ROUSSET, F. (1987). Human recombinant interleukin 4 induces Fc receptors (CD23) on normal B lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 165: 1459-1467.
- DELACHAMBRE, D. (1981). Difficultés d'obtention d'un test fiable pour déterminer la virulence d'un flagellé parasite (*Trichomonas vaginalis*). *C. R. Acad. Sci. (Paris)* 292: 613-618.
- DEMES, P.; GOMBOSOVÁ, A.; VALENT, M.; FABUSOVA, H. y JANOSKA, A. (1988a). Fewer *Trichomonas vaginalis* organisms in vaginas of infected women during menstruation. *Genitourin. Med.*, 64: 22-24.
- DEMES, P.; GOMBOSOVÁ, A.; VALENT, M.; JANOSKA, A., FABUSOVA, H. y PETRENKO, M. (1988b). Differential susceptibility of fresh *Trichomonas vaginalis* isolates to complement in menstrual blood and cervical mucus. *Genitourin. Med.*, 64: 176-179.
- DEMES, P.; GOMBOSOVÁ, A.; SURMIKOVÁ, E.; RUZICKOVÁ, M. (1988c). Differential lectin-mediated agglutinability of *Trichomonas vaginalis*. *Biológia (Bratislava)* 43 (11), 989-992.
- DESPOMMIER, D. D. y KARAPELOU, J. W. (1987). *Parasite life cycles*. Springer Verlag, New York.
- DEVI, A. C. (1929). Berberine sulfate in oriental sore. *Indian Med. Gaz.*, 64: 139-140.
- DIAMOND, L. S.; BARTGIS, I. L.; REARDON, L. V. (1965). Virulence of *Trichomonas vaginalis* after freeze-preservation for two years in liquid nitrogen vapor. *Cryobiology*, 1: 295-297.
- DÍAZ-GONZÁLEZ, F.; GONZÁLEZ-ÁLVARO, I.; CAMPANERO, M. R.; MOLLINEDO, F.; POZO, M. A. DEL; MUÑOZ, C.; PIVEL, J. P. y SÁNCHEZ-MADRID, F. (1995). Prevention of *in vitro* neutrophil-endothelial attachment through shedding of L-selectine by nonsteroidal antiinflammatory drugs. *J. Clin. Invest.*, 95: 1756-1765.
- DOMBROWSKI, M. P.; SOKOL, R. L.; BROWN, A. J. y BRONSTEEN, R. A. (1987). Intravenous therapy of metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Obstet. Gynecol.*, 69: 524.
- DONNÉ, A. (1836). Animacules observés dans les matières purulentes et le produit des sécrétions des organes génitaux de l'homme et de la femme. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.*, 3: 385-386.

DOTTAN, S.; GLERSTEIN, S. y NAVE, N. (1987). Azathioprine-induced *in vitro* inhibition of prostaglandin E2 production by rabbit retina. *Prostaglandins*, 34: 271.

DOWE, G.; KING, S. D.; BRATHWAITE, A. R.; WYNTER, Z. y CHOUT, R. (1997). Genital *Chlamydia trachomatis* (serotypes D-K) infection in Jamaican commercial street sex workers. *Genitourin. Med.*, 73 (5): 362-364.

## E

ECK, H. P.; MERTENS, T. y ROSOKAT, H. (1992). T4+ cell numbers are correlated with plasma glutamate and cystine levels: association of hyperglutamataemia with immunodeficiency in diseases with different aetiologies. *Int. Immunol.*, 4 (1): 7-13.

ECKERT, J.; THOMPSON, R. C. A.; LYMBERY, A. J.; PAWLOWSKI, Z. S.; GOTTSTEIN, B. y MORGAN, U. M. (1993). Further evidence for the occurrence of a distinct strain of *Echinococcus granulosus* in European pigs. *Parasitol. Res.*, 75: 536-544.

EDELMAN, G. M. (1976). Surface modulation in cell recognition and cell growth. *Science*, 192: 218-226.

ELITSUR, Y.; LIU, X.; DOSESCU, J. y MOSHIER, J. (1995). FK-506 and cyclosporine A (CsA). Immunomodulation of the human gut mucosal immune system. *Digest. Dis. and Sci.*, 40 (9): 1934-1940.

ENGBRING, J.A.; O'BRIEN, J.L. y ALDERETE, J.F. (1996). *Trichomonas vaginalis* adhesins display molecular mimicry to metabolic enzymes. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 408: 207-223.

ENGBRING, J.A. y ALDERETE, J.F. (1998). Three genes encode distinct AP33 proteins involved in *Trichomonas vaginalis* cytoadherence. *Mol. Microbiol.*, 28 (2): 305-313.

ERTAN, M.; BILGIN, A. A.; PALASKA, E. y YULUG, N. (1992). Synthesis and antifungal activities of some 3-(2-phenylethyl)-5-substituted-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazine-2-thione. *Arzn. Forsch./Drugs Res.*, 42 (2): 160-163.

ESCARIO, J. A. (1985). Actividad antiprotozoaria de moléculas de nueva síntesis. *Tesis doctoral*. Dept.Parasitología. Facultad de Farmacia, Universidad Complutense de Madrid, Madrid.

ESCARIO, J. A.; GÓMEZ BARRIO, A. y MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R. (1995). The relationship of experimental pathogenicity *in vivo* with *in vitro* cytoadherence and cytotoxicity of 6 different isolates of *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.*, 25 (8): 999-1000.

ESCARIO, J. A.; GÓMEZ BARRIO, A.; OSUNA, A. y MARTÍNEZ FERNÁNDEZ, A. R. (1990). Cytopathologic effects of virulent and non virulent strains of *Trichomonas vaginalis*. *Proc. VII Cong. Int. Parasitol. Paris*. 1990. Abs. S4. A 22.

EUGERE, E.; LYNCH, V.; THOMAS, R. K. (1956). Observations on vaginal trichomoniasis in monkeys. *J. Parasitol.*, 42 (suppl):22.

## F

FARRIS, V. K. y HONIGBERG, B. M. (1970). Behavior and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* Donné in chick liver cell cultures. *J. Parasitol.*, 56, 849-882.

FENGER, C. K.; GRANSTROM, D. E.; LANGEMEIER, J. L.; GAJADHAR, A.; COTHRAN, G.;

- TRAMONTIN, R. R.; STAMPER, S. y DUBEY, J. P. (1994). Phylogenetic relationship of *Sarcocystis neurona* to other members of the family Sarcocystidae based on small subunit ribosomal RNA gene sequence. *J. Parasitol.*, 80: 966-975.
- FERNÁNDEZ NOVOA, L.; ÁLVAREZ, X. A., SEMPERE, J. M.; MIGUEL HIDALGO, J. J.; DÍAZ, J.; FRANCO MASIDE, A. y CACABELOS, R. (1997). Effects of Anapsos on the activity of enzyme Cu-Zn-Superoxide Dismutase in an animal model of neuronal degeneration. *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.*, 19 (2): 99-106.
- FERNÁNDEZ VOZMEDIANO; J. M.; ROMERO CABRERA; M. A.; ALONSO BLASI, N.; CORZO RODRÍGUEZ, I. y CALAP CALATAYUD, J. (1984). Dermatitis atópica: Tratamiento con Anapsos. Congreso Nacional de Dermatología.
- FIORI, P.L.; RAPELLI, P.; ROCCHIGIANI, A. M. y CAPPUCINELLI, C. (1993). *Trichomonas vaginalis* haemolysis: evidence of functional pores formation on red cell membranes. *FEMS Microbiol. Letters*, 109: 13-18.
- FLEGR, J.; CÉRKASOV, J.; KULDA, J.; CÉRKASOVA, A. (1987). Double stranded RNA in *Trichomonas vaginalis*. *Acta Univer. Carolinae-Biol.*, 30 (3-4): 281-287.
- FLEISHER, J. M.; SENIE, R. T.; MINKOFF, H. y JACCARD, J. (1994). Condom use relative to knowledge of sexually transmitted disease prevention, method of birth control, and past or present infection. *J. Community Health.*, 19 (6): 395-407.
- FLOREZ, J., ARMIJO, J.A. y MEDIAVILA, A. (1992). *Farmacología humana*, Ed. Científicas y Técnicas S.A., Salvat, Barcelona. pp. 809-823, 921-971.
- FONT QUER, P. (1996). Plantas medicinales: Dioscórides renovado, 15ª ed. (Font Quer, P. ed.). Editorial Labor D. L., Barcelona. pp. 70-73.
- FORSQREN, A. y FORSSMAN, L. (1979). Metronidazole-resistant *Trichomonas vaginalis*. *Br. J. Vener. Dis.*, 55: 351-353.
- FORTENBERRY, J. D.; BRIZENDINE, E. J.; KATZ, B. P.; WOOLS, K. K.; BLYTHE, M. J. y ORR, D. P. (1999). Subsequent sexually transmitted infections among adolescent women with genital infection due to *Chlamydia trachomatis* *Neisseria gonorrhoeae* or *Trichomonas vaginalis*. *Sex. Transm. Dis.*, 26 (1): 26-32.
- FOUTS, A. C. y KRAUSS, S. J. (1980). *Trichomonas vaginalis*: Reevaluation of its clinical presentation and laboratory diagnosis. *J. Infec. Dis.*, 141: 137-143.
- FRAISER, L. H.; KANEKAL, S. y KEHRER, J. P. (1991). Cyclophosphamide toxicity: Characterising and avoiding the problem. *Drugs.*, 42:781-795.
- FRIEDMAN G.D. y SELBY J.V. (1989). Metronidazole and cancer. *JAMA*, 261: 866.
- FROST, J. K.; HONIGBERG, B. M. (1962). Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* for mice. II. Histopathology of subcutaneous lesions. *J. Parasitol.*, 48: 898-918.

## G

- GALLAI, Z. y SYLVESTRE, L. (1966). The present status of urogenital trichomoniasis: A general review of literature. *Appl. Ther.*, 8: 773-778.

- GANGULI, G.; TEWARI, N.; SINGH, A.; PANDE, R.C.; SHARMA, D. (1989). Elaborative study of oral contraceptive users with special reference to bacterial, fungal and trichomonal infection. *J. Microbial. Biotechnol.*, 4 (1): 58-62.
- GARBER, E.; LEMCHUCK-FAVEL, L. T. (1990). Association of production of cell-detaching factor with the clinical presentation of *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.*, 28: 2415-2417.
- GARBER, E.; LEMCHUCK-FAVEL, L. T. (1994). Analysis of the extracellular proteases of *Trichomonas vaginalis*. *Parasitol. Res.*, 80: 361-365.
- GARBER, E.; LEMCHUCK-FAVEL, L. T. y BOWIE, W. R. (1989). Isolation of a cell-detaching factor of *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.*, 27 (7): 1548-1553.
- GARCÍA-ÁLVAREZ, F.; NAVARRO-ZORRAQUINO, M.; LARRAD, L.; SALINAS, J. L.; SOUSA, R.; LOZANO, R. (1997). Methamizol and S-adenosylmethionine immunomodulator treatments in sepsis. *XXXII Congress of the European Society for Surgical Research* (paper oral), Corfú, Greece.
- GARCÍA-LECHUZ, J. M.; NAVARRO, M.; MORANDEIRA, M. J.; SORIA, J.; ROMAN, A.; GÜEMES, A.; SALINAS, J. C.; LOZANO, R. (1993). Immunorestorative effect of thymostimulin on surgery immunodepression: experimental model. *Eur. Surg. Res.*, 25 (2): 74-82.
- GARCÍA PALACIOS, LUIS (1997). Estudio preliminar de seroprevalencia de anticuerpos anti-*Anisakis* en población española. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- GARCÍA-VICUÑA, R.; DÍAZ-GONZÁLEZ, F.; GONZÁLEZ-ÁLVARO, J.; POZO, M.A. DEL; MOLLINEDO, F.; CABAÑAS, C.; GONZÁLEZ-AMARO, R. y SÁNCHEZ-MADRID, F. (1997). Prevention of cytokine induced changes in leukocyte adhesion receptors by nonsteroidal antiinflammatory drugs from the oxicam family. *Arthritis Rheum.*, 40: 143-153.
- GARDNER, J.J. (1992). Comparison of the vaginal flora in sexually abused and nonabused girls. *J. Pediat.*, 120 (6): 872-877.
- GARDNER, W.A.; CULBERSON, D.E.; SCIMECA, J. M.; BRADY, A. G.; PINDAK, F. F.; ABEE, C. R. (1987). Experimental genital trichomoniasis in the squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) model. *Genitourin. Med.*, 63: 188-191.
- GARDNER, W.A. y CULBERSON, D.E. (1988). Histopathological correlates of male Trichomoniasis. In: *Trichomonads and Trichomoniasis*, Part II. (Kulda, J. and Cerkasov, J., eds.). *Acta Univ. Carolinae-Biol.* 30, (1986), 427-432.
- GARDNER, W.A.; CULBERSON, D.E. y BENNET, B.D. (1986). *Trichomonas vaginalis* in the prostate gland. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, 110: 430-432.
- GAVINI, E.; JULIANO, C.; MULÉ, A.; PIRISINO, G. y PINNA, G. A. (1997). Pyridazine n-oxides. II. Synthesis and *in vitro* antimicrobial evaluation of 3-chloro-4-carbamoyl-5-aryl-6-methyl-pyridazine n-oxides. *Il farmaco*, 52 (1): 67-69.
- GAVRILESCU, M. (1962). Results of experimental intramuscular inoculation of *Trichomonas vaginalis*. *Microbiol. Parasitol. Epidemiol.*, 7: 349-356 (In Romanian, English summary).
- GELBART, S. M.; THOMASON, J. L.; OSYPOWSKI, JAMES, J. A. y HAMILTON, P. R. (1989). Comparison of Diamond's medium modified and Küpferberg medium for detection of *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.*, 27 (5): 1095-1096.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- GHOSH, A. K.; BHATTACHARYYA, F. K. y GHOSH, D. K. (1985). *Leishmania donovani*: amastigote inhibition and mode of action of berberine. *Exp. Parasitol.*, 60: 404-413.
- GHOSH, A. K.; RAKSHIT, M. M. y GHOSH, D. K. (1983). Effect of berberine chloride on *Leishmania donovani*. *Indian J. Med. Res.*, 78: 407-416.
- GILLIN, F. D. y SHER, A. (1981). Activation of the alternative complement pathway by *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.*, 34: 268-271.
- GLEBSKI, J. (1969). The influence of some hormones on the morphological and biological features of *Trichomonas vaginalis* in culture conditions. *Wiad. Parazytol.*, 15: 261-262.
- GMUNDER, H.; ECK, H. P. y DROGE, W. (1991). Low membrane transport activity for cysteine in resting and mitogenically stimulated human lymphocyte preparations and human T cell clones. *Eur. J. Biochem.*, 201 (1): 113-117.
- GOBERT, J. G.; TRUCHET, M.; SABEL, J.; GENET, P.; PIETTE, M. (1969). Étude de l'endoparasitisme expérimentale de *Trichomonas vaginalis* chez la souris. II. Étude cytologique et histologique. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 44: 687-696.
- GOBERT, J. G.; TRUCHET, M. y SABEL, J. (1971). Étude de l'endoparasitisme expérimentale de *Trichomonas vaginalis* chez la souris. IV. Étude histochimique des lésions chez les animaux parasites. *Ann. Parasitol. Hum. Comp.*, 46: 511-52.
- GOKSOYR, J. (1964). Synthesis and antiprotozoan properties of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazin-2-thione derivatives. *Acta Chem. Scand.*, 18: 1341.
- GOLD, D. (1993). *Trichomonas vaginalis*: strain differences in adhesion to plastic and virulence *in vitro* and *in vivo*. *Parasitol. Res.*, 79: 309-315.
- GOLD, D. y OFEK, I. (1992). Adhesion of *Trichomonas vaginalis* to plastic surfaces: requirement for energy and serum constituents. *Parasitology*, 106: 55-62.
- GOLDSTEIN, G. (1987). Overview of the development of Orthoclone OKT3: Monoclonal antibody for therapeutic use in transplantation. *Trans. Proc.*, 19 (2 Suppl. 1): 28-31.
- GOLDSTEIN, S. N.; TSAI, A. y KEMP, C. J. (1983). Role of IgA antibody in phagocytosis by human polymorphonuclear leukocytes. In McGhee, J. R.; Mestecky, J. (eds): *The secretory Immune System*. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 409: 824.
- GONZÁLEZ, S.; PATHAK, M. A. (1996). Inhibition of ultraviolet-induced formation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, erythema and skin photosensitization by *Polypodium leucotomos*. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 12 (2): 45-46.
- GONZÁLEZ, S.; PATHAK, M. A.; CUEVAS, J.; VILLARRUBIA, V. G. y FITZPATRICK, T. B. (1997). Topical or oral administration with an extract of *Polypodium leucotomos* prevents acute sunburn and psoralen-induced phototoxic reactions as well as depletion of Langerhans cells in human skin. *Photodermatol. Photoimmunol. Photomed.*, 13 (1-2):50-60.
- GONZÁLEZ, J.; SAGUA, H.; ARAYA, J.; LOYOLA, A.; MORALES, G.; PEREIRA, J.; ESTRADA, M. (1990). *In vitro* activity of natural products against the trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi*. *Phytother. Res.*, 4 (1): 1-4.
- GRANELLI-PIPERNO, A. (1988). In situ hybridization for interleukin 2 and interleukin 2 receptor mRNA

in T cells activated in the presence or absence of cyclosporin A. *J. Exp. Med.*, 168: 1649-1658.

GREEBAUM, L.A.; HOROWITZ, J. B.; WOODS, A.; PASQUALINI, T.; REICH, E. P. y BOTTOMOLY, K. (1988). Autocrine growth of CD4<sup>+</sup> T cells: Differential effects of IL-1 on helper and inflammatory T cells. *J. Immunol.*, 140: 1555-1559.

GREEN, E. L. (1981). Breeding systems. In *The mouse in Biomedical Research*. (Foster, H. L.; Small, J. D.; Fox J. G. eds.). Academic Press. New York, pp. 91-104.

GRYGIERCZYK, D. y LASTÓWKA, M. (1989). Epidemiological picture of trichomoniasis and candidiasis in women from the Bytom district. *Wiad. Parazytol.*, 35 (6): 547-553.

GRODSTEIN, F.; GOLDMAN, M. B. y CRAMER, D. W. (1993). Relation of tubal infertility to a history of sexually transmitted diseases. *Am. J. Epidemiol.*, 137: 577-584.

GUPTA, P. y FROST, J.K. (1988). Human urogenital trichomoniasis: epidemiology, clinical and pathological manifestations. In: *Trichomonads and Trichomoniasis*, Part II. (Kulda, J. and Cerkasov, J., eds.). *Acta Univ. Carolinae-Biol.* 30, (1986), 399-410.

GUPTA, M.B.; NATH, R.; SRIVASTAVA, N.; SHANDER, J.; KISHOR, K.; BHARGABA, K.P. (1980). Anti-inflammatory and antipyretic activities of  $\beta$ -sitosterol. *Planta Med.*, 39: 157-163.

GUPTA, S. (1975). Use of berberine in treatment of giardiasis. *American J. Dis. of Children*, 129: 866.

## H

HARDY, P.H.; HARDY, J.B.; NELL, E.E.; GRAHAM, D.A.; SPENCE, M.R. y ROSEMBAUM, R.C. (1984). Prevalence of six sexually transmitted disease agents among pregnant inner-city adolescents and pregnancy outcome. *Lancet*, 2: 333-337.

HASEGAWA, M.; HASHIMOTO, T.; ADACHI, J.; IWABE, N. y MIYATA, T. (1993). Early branchings in the evolution of eukaryotes: ancient divergence of *Entamoeba* that lacks mitochondria revealed by protein sequence data. *J. Mol. Evol.*, 36: 380-388.

HEATH, J. P. (1981). Behaviour and pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in epithelial cell cultures. *Br. J. Vener. Dis.*, 57: 106-117.

HEERES, J.; MOSTMANS, J. H.; MAES, B.; BACKX, L. J. J. (1976). Synthesis and antiprotozoal activity of nitroimidazoles: carbamates and thiocarbamates. *Eur. J. Med. Chem.*, 11 (3):237-239.

HEINE, P. y MCGREGOR, J. A. (1993). *Trichomonas vaginalis*: A reemerging pathogen. *Clin. Obstet. Gyn.*, 36: 137-144.

HEINZEL, F. P.; SADICK, M. D.; HOLADAY, B. J.; COFFMAN, R. L. y LOCKSLEY, R. M. (1989). Reciprocal expression of interferon gamma or IL-4 during the resolution or progression of murine leishmaniasis. Evidence for expansion of distinct helper T cell subsets. *J. Exp. Med.*, 169: 59-72.

HENNESSEY, T.M. (1992). Effects of membrane plant esters on excitable cell function. *Comp. Biochem. Physiol.*, 101C: 1-8.

HERAS, B. DELAS; SLOWING, K.; BENEDÍ, J.; CARRETERO, E.; ORTEGA, T.; TOLEDO, C.; BERMEJO, P.; IGLESIAS, I.; ABAD, M. J.; GÓMEZ-SERRANILLOS, P.; LISO, P. A.; VILLAR, A.; CHIRIBOGA, X. (1998). Antiinflammatory and antioxidant activity of plants used in traditional medicine in Ecuador. *J. Ethnopharmacol.*, 61: 161-166.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- HEROLD, K.C.; LANCKI, D.W.; MOLDWIN R.L. (1986). Immunosuppressive effects of cyclosporin A on cloned T cells. *J. Immunol.* 136: 1315-1321.
- HERRERO, A.; OCHOA, C.; ATIENZA, J.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A.; MARTÍNEZ-FERNÁNDEZ, A. R. (1992). Synthesis and antiprotozoal properties of 1, 2, 6-thiadiazine 1, 1-dioxide derivatives. *Arch. Pharm. (Weinheim)*, 325: 509-514.
- HEYWORTH, M. F. (1982). Clinical experience with antilymphocyte serum. *Immunol. Rev.*, 65: 79-97.
- HEYWORTH, R.; SIMPSON, D.; McNEILLAGE, G. J.; ROBERTSON, D. H. y YOUNG, H. (1980). Isolation of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole. *Lancet*, 2 (8192): 476-478.
- HIRANO, T.; YUSUKAWA, K.; HARADA, H.; TAGA, T.; WATANABE, Y.; MATSUDA, T.; KASHIWAMURA, S.; NAKAJIMA, K.; KOYAMA, K.; IWAMATU, Y.; TSUNASAWA, S. y SAKIJAMA, F. (1986). Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin. *Nature*, 324: 73-76.
- HLATKY, M. A. y WHITTEMORE, A. S. (1991). The importance of models in the assessment of synergy. *J. Clin. Epidemiol.*, 44 (12): 1287-1288.
- HOBBS, R. P.; LYMBERY, A. J. y THOMPSON, R. C. A. (1990). Rostellar hook characters of *Echinococcus granulosus* (Batsch, 1786) from natural and experimental australian host, and its implications for strain recognition. *Parasitology*, 101: 273-281.
- HOBERG, E. P. y LICHTENFELS, J. R. (1994). Phylogenetic systematic analysis of the Trichostrongylidae (Nematoda), with an initial assessment of coevolution and biogeography. *J. Parasitol.*, 80: 976-986.
- HOGUE, M.J. (1943). The effect of *Trichomonas vaginalis* on tissue culture cells. *Am. J. Hyg.*, 37: 142-152.
- HÖHNE, O. (1916). *Trichomonas vaginalis* als häufiger Erreger einer typischen colpitis purulenta. *Zentralblatt Gynaekol.*, 40: 4-15.
- HOLADAY, B. J.; SADICK, M. D. y WANG, Z. E. (1991). Reconstitution of *Leishmania* immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1- and Th2-like cell lines. *J. Immunol.*, 147: 1653-1658.
- HOLBROOK, T. W.; BOACKLE, R. J.; VESELY, J. y PARKER, B. W. (1981). *Trichomonas vaginalis*: Alternative pathway activation of complement. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 76: 473-475.
- HOLLANDER, D. H. (1976). Colonial morphology of *Trichomonas vaginalis* in agar. *J. Parasitol.*, 62 (5): 826-828.
- HOLLANDER, D. H. y TYSOR, J. S. (1987). Isolation of a stable clone of the ameboid-adherent (AA) variant of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.*, 73 (5): 1074-1075.
- HOMO-DELARCHE, F.; GAGNERAULT, M.C; BACH, J.F. y DARDENNE, M. (1990). Thymic hormones and prostaglandins ii. Synergistic effect on mouse spontaneous rosette forming cells. *Prostaglandins*, 39 (3): 299-318.
- HOMO-DELARCHE, F.; BACH, J.F. AND DARDENNE, M. (1988). *In vitro* inhibition of prostaglandin production by azathioprine and 6-mercaptopurine. *Prostaglandins*, 35: 479.
- HONIGBERG, B. M. (1961). Comparative pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas gallinae* to mice. I. Gross pathology, quantitative evaluation of virulence, and some factors affecting pathogenicity. *J. Parasitol.*, 47: 545-571.

- HONIGBERG, B. M. (1970). Trichomonads. In *Immunity to parasitic animals*, vol. 2, Jackson, G. J., Herman, R., Singer, L (eds). New York, Appleton-Century-Crofts. pp. 469-550.
- HONIGBERG, B. M. (1978). Trichomonads of importance in human medicine. In: *Parasitic Protozoa*, vol. 2, (Kreier, J. P. ed.). Academic Press Inc., New York. pp. 275-454.
- HONIGBERG, B.M. (1987). Immunology of trichomonads, with emphasis on *Trichomonas vaginalis*. *Acta Univ. Carolinae Biol.* 30, 10: 321-336.
- HONIGBERG, B. M. y BRUGEROLLE, G. (1990). Structure. In *Trichomonads Parasitics in Humans*, (Honigberg, B.M. ed.). Springer-Verlag, New York. 1990. pp. 5-35.
- HONIGBERG, B. M.; GUPTA, P. K.; SPENCE, M. R.; KUCZYNSKA, K.; FROST, J. K.; CHOROMANSKI, L; WARTON, A. (1984). Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*: Cytopathologic and histopathologic changes of the cervical epithelium. *Obstet. Gynaecol.*, 64: 179-184.
- HONIGBERG, B. M.; LIVINGSTON, M.C.; y FROST, J. K. (1966). Pathogenicity of fresh isolates of *Trichomonas vaginalis*. "The mouse assay" versus clinical and pathologic findings. *Acta Cytol.*, 10: 353-361.
- HONIGBERG, B. M.; LIVINGSTON; M. C. y STABLER, R. M. (1971). Pathogenicity transformation of *Trichomonas gallinae*. I. Effects of homogenates and mixtures of DNA and RNA from a virulent strain on pathogenicity of an avirulent strain. *J. Parasitol.*, 57:929-938.
- HORVATH, A.; ALVARADO, E.; SZOCS, J.; ALVARADO, Z. N. DE; y PADILLA, G. (1967). Metabolics effects of Calagualine, an antitumoral saponine of *Polypodium leucotomos*. *Nature*, 277: 67-68.
- HOWARD, J. G. (1986). Immunological regulation and control of experimental leishmaniasis. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 28: 79-116.
- HOWES, H. L.; LYNCH, J. E. y KIVLIN, J. L. (1969). Tinidazole, a new antiprotozoal agent: Effect on trichomonads and other protozoa. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 9: 929-938.
- HSIEH, C. S.; MACATONIA, S. E.; TRIPP, C. S.; WOLF, S. F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K. M. (1993). Development of Th1 CD4+ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*, 260: 547-549.
- HUSKISSON, E.C. (1984). Azathioprine. *Clin. in Rheumatic Dis.*, 10: 325.

## I

- INGS, R. M. H.; McFADZEAN, J. A. y ORMEROD, W. E. (1974). The mode of action of metronidazole in *Trichomonas vaginalis* and other microorganisms. *Biochem. Pharmacol.*, 23: 1421-1429.
- INOKI, S.; NAKANISHI, K. y NAKABAYASHI, T. (1960). Electron microscopic observations of *Trichomonas vaginalis* employing the thin-section technique. *Gynaecology*, 149: 48-54.
- ISA, A. R. y SIVAKUMARAN, S. (1993). Prevalence of sexually transmitted diseases among female drug abusers in Malaysia. *Med. J. Malaysia*, 43 (2): 124-128.
- IVEY, M. H. (1975). Virulence preservation of recent isolates of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.*, 61: 550-552.
- IVEY, M. H. y HALL, D. G. (1964). Virulence of different strains of *Trichomonas vaginalis* in the mouse. *Am.*



*J. Trop. Med. Hyg.* 13: 16-19.

IWATA, S.; HORI, T. y SATO, N. (1994). Thiol-mediated redox regulation of lymphocyte proliferation. Possible involvement of adult T cell leukemia-derived factor and glutathione in transferrin receptor expression. *J. Immunol.*, 152 (12): 5633-5642.

## J

JACKSON, D. J.; RAKWAR, J. P.; CHOHAN, B.; MANDALIYA, K.; BWAYO, J. J.; NDINYA-ACHOLA, J. O.; NAGELKERKE, N. J.; KREISS, J. K. y MOSES, S. (1997). Urethral infection in workplace population of East African men: Evaluation of strategies for screening and management. *J. Infect. Dis.*, 175 (4): 833-838.

JAMISON, J. H.; KAPLAN, D. W.; HAMMAN, R.; EAGAR, R.; BEACH, R.; DOUGLAS, J. M. (1995). Spectrum of genital human papillomavirus infection in a female adolescent population. *Sex. Trans. Dis.*, 22 (4): 236-243.

JEFFRIES, L.; HARRIS, M. (1967). Observations on the maintenance of *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus*: The effects of cortisone and agar on enhancement of severity of subcutaneous lesions in mice. *Parasitology*, 57: 321-334.

JHAN, F. (1982). The mutagenic activity of some antiprotozoal drugs in the *Salmonella* test of Ames. *Wiener. Tierarzt. Monatssch.*, 69 (1): 19-21.

JIMÉNEZ, D.; DOBLARE, E.; NARANJO, R.; MUÑOZ, C. y VARGAS, J. F. (1986). Anapsos modifies immunological parameters and improves the clinical course in atopic dermatitis. *Dermatologica*, 173: 154-156.

JIMÉNEZ, D.; NARANJO, R.; DOBLARE, E.; MUÑOZ, C. y VARGAS, J. F. (1987). Anapsos, an antipsoriatic drug, in atopic dermatitis. *Allerg. Immunopath.*, 15: 185-189.

JÍROVEC, O.; PETRU, M. (1968). *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis. in *Advances in Parasitology*, vol 6, (Dawes B. ed.). Academic Press, London. pp 117-188.

JITRIPHAI, P. (1971). Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in genital tract of experimental male animals. *J. Med. Assoc. Thailand* 54: 714.

JOHN, J. (1988). Clinical manifestations of trichomoniasis. In: *Trichomonads and Trichomoniasis*, Part II (Kulda, J. and Cerkasov, J., eds.). *Acta Univ. Carolinae-Biol.* 30: 411-416.

JOHNSON, G.; KUPFERBER, A. B.; HARTMAN, C. G. (1950). Cyclic changes in vaginal populations of experimentally induced *Trichomonas vaginalis* infections in rhesus monkeys. *Am. J. Obstet. Gynaecol.*, 59: 689-692.

JOLIVET, J.; COWAN, K. H.; CURT, G. A.; CLENDENIN, N. J. y CHABNER, B. A. (1983). The pharmacology and clinical use of methotrexate. *N. Eng. J. Med.*, 309: 1094-1104.

JUDEZ ASENSIO, L. (1989). Técnicas de Análisis de Datos Multidimensionales. Bases teóricas y aplicaciones en Agricultura. Ed. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid. pp. 23-68, 115-137.

JULIANO, C. P. y BANDEIRA, P. (1985). Role of cell cytoskeleton on *in vitro* citopathic effect of *Trichomonas vaginalis*. *Int. Symp. on Trichomonads & Trichomoniasis*, Prague, Abst. 62.

## K

- KADIR, M. A. A.; AZIZ, L. J. (1989) A study of *Trichomonas vaginalis* infection in Kirkuk, Iraq. *Bull. Endemic Dis.*, 30: 1-8.
- KADIR, M.A.A.; SALEHY, A.M.S.; HAMMAD, E.F. (1988) Studies on *Trichomonas vaginalis* in Erbil Teaching Hospital. *J. Fac. Med., Baghdad*, 30 (1): 83-88.
- KALASOVÁ; H; NEDVEDOVÁ, H. (1977). Experimental infections with *Trichomonas vaginalis* in the Laboratory Rat and Mouse (in Czech), M. Sc. thesis. Faculty of Science, Charles University, Prague.
- KANE, P. O.; McFADZEAN, J. A. y SQUIRES, S. (1961). Absorption and excretion of metronidazole. Part. II. Studies on primary failures. *Br. J. Vener. Dis.*, 37: 276-277.
- KANEDA, Y.; TORII, M.; TANAKA, T.; AIKAWA, M. (1991). *In vitro* effects of berberine sulphate on the growth and structure of *Entamoeba histolytica*, *Giardia lamblia* and *Trichomonas vaginalis*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 85 (4): 417-425.
- KANG, H. S.; KIM, Y. H.; LEE, J. J.; CHOI, Y. y PYUN, K. H. (1996). Suppression of interleukin-1 and tumor necrosis factor- $\alpha$  production by acanthoic acid, (-)-pimara-9(11),15-dien-19-oic acid, and its antifibrotic effects *in vivo*. *Cell. Immunol.*, 170: 212-221.
- KARP-DAMDIN, M.; WISNIEWSKI, R. (1987). Prevalence of infection with *Trichomonas vaginalis*, yeast-like fungi and *Neisseria gonorrhoeae* in women in Rzeszów and its vicinity. *Wiad. Parazytol.*, 33 (1): 47-51.
- KAY, J. E.; KROMWEL, L.; DOE, S. E. A. (1991). Inhibition of T and B lymphocyte proliferation by rapamycin. *Immunology*, 72: 544-549.
- KAZANOWSKA, W.A. (1966). Morphological and histochemical phenomena in the mucous membrane of genital organs in the course of trichomoniasis. *Wiad. Parazytol.*, 12: 139-150.
- KAZANOWSKA, W.A.; DUBIEL, C.; KNAPP, P.; RACZ, R. (1973). Histochemical studies of the urinary tract in guinea pig infected by *Trichomonas vaginalis*. *Wiad. Parazytol.*, 19: 453-460.
- KAZANOWSKA, W.A. y KUCZYNSKA, K. (1988). Identification of vaginal trichomoniasis in women treated for genital organ neoplasms. In: *Trichomonads and Trichomoniasis*, Part II. (Kulda, J. and Cerkasov, J., eds.). *Acta Univ. Carolinae-Biol.* 30, (1986), 421-426.
- KAZANOWSKA, W.; KUCZYNSKA, K.; SKRZYPIEC, R. (1983). Pathology of *Trichomonas vaginalis* infection in experimental animals. *Wiad. Parazytol.*, 29: 63-66.
- KEAN, B. H. y WELDT, J. T. (1955). Transmission of *Trichomonas vaginalis* in eye of animals. *Proc. Soc. Exper. Biol. Med.*, 89: 218-219.
- KEELER, C. E. (1978). In *Origin of inbred mice*. (Morse, H. C., III, ed.), Academic Press, New York. p 181.
- KEITH, L.G.; FRIBERG, J.; FULLAN, N. y BERGER, G. S. (1986). The possible role of *Trichomonas vaginalis* as a vector for the spread of other pathogens. *Int. J. Fertil*, 31: 215-277.
- KEITH, L.G. (1988). Trichomoniasis: a review of new concerns. In: *Trichomonads and Trichomoniasis*, Part II. (Kulda, J. and Cerkasov, J. eds.) *Acta Univ. Carolinae-Biol.* 30, (1986), 417-420.
- KELLY, D.R.; SCHNITZER, R. J. (1952). Experimental studies on trichomoniasis. II. Immunity to reinfection

- in *Trichomonas vaginalis* infection in mice. *J. Immunol.*, 69: 337-342.
- KELLY, D.R.; SCHUMAKER, A.; SCHNITZER, R. J. (1954). Experimental studies in trichomoniasis.III. Influence of the site of the immunizing infection with *Trichomonas vaginalis* on the immunity of mice to homologous infection by different routes. *J. Immunol.*, 73: 40-43.
- KENGNE, P.; VEAS, F.; VIDAL, N.; REY, J. L. y CUNY, G. (1994). *Trichomonas vaginalis*: repeated DNA target for highly sensitive and specific polymerase chain reaction diagnosis. *Cell. Mol. Biol.*, 40 (6): 819-831.
- KERREBIJN, J. D.; SIMONS, P. J.; TAS, M.; KNEGT, P. P.; BREKEL, M. W. van de; DELAERE, P.; TAN, I. B.; DREXHAGE, H. A. y BALM, A. J. (1996). The effects of thymostimulin on immunological function in patients with head and neck cancer. *Clin. Otolaryngol.*, 21 (5): 455-462.
- KESSEL, J. F. y THOMSON, C. F. (1950). Survival of *Trichomonas vaginalis* in vaginal discharge. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 74: 755-758.
- KINO, T.; HATANAKA, H.; MIYATA, S.; INAMURA, N.; NISHIYAMA, M.; YAJIMA, T.; GOTO, T.; OKUHARA, M.; KOHSAKA, M.; AOKI, H y OCHIAI, T. (1987). FK-506, a novel immunosuppressant isolated from *Streptomyces*. II. Immunosuppressive effect of FK-506 *in vitro*. *J. Antibiot.*, 40 (9): 1256-1265.
- KINSCHERF, F.; FISCHBACH, T.; MIHM, S. (1994). Effect of glutathione depletion and oral N-acetylcysteine treatment on CD4+ and CD8+ cells. *FASEB J.*, 8 (6): 448-451.
- KISHIMOTO, T. (1985). Factors affecting B-cell growth and differentiation. *Annu. Rev. Immunol.*, 3: 133-138.
- KLUFIO, C. A.; AMOA, A. B.; DELAMARE, O.; HOMBHANJE, M.; KARIWIGA, G.; IGO, J. (1995). Prevalence of vaginal infections with bacterial vaginosis, *Trichomonas vaginalis* and *Candida albicans* among pregnant women at the Port Moresby General Hospital Antenatal Clinic. *P. N. G. Med. J.*, 38 (3): 163-171.
- KON, V.; PAPADIMITRIOU, J. M.; ROBERTSON, T. A.; WARTON, A (1988). Quantitation of concavalin A and wheat germ agglutinin binding by two strains of *Trichomonas vaginalis* of differing pathogenicity using gold particle-conjugated lectins. *Parasitol. Res.*, 75 (1): 7-13.
- KOSIAN, K. y JANISCH, H. (1991). Therapeutic aspects of trichomonal infection of female genitalia. *Zent. Gynäkol.*, 113 (18): 981-985.
- KRETSCHMER, R. (1994). *Amibiasis. Infección y enfermedad por Entamoeba histolytica*. Editorial Trillas (Kretschmer, R. ed.). México D. F., México. pp.103-118, 119-134.
- KRIEGER, J. N. (1981). Urologic aspects of trichomoniasis. *Invest. Urol.*, 18: 411-417.
- KRIEGER, J. N. (1995). Trichomoniasis in men: old issues and new data. *Sex. Trans. Dis.*, 22 (2): 83-96.
- KRIEGER, J. N.; POISSON, M. A. y REIN, M. F. (1983). Beta-hemolytic activity of *Trichomonas vaginalis* correlates with virulence. *Infect. Immun.*, 41 (3): 1391-1295.
- KRIEGER, J. N.; RAVDIN, J. I. y REIN, M. F. (1985). Contact-dependent cytopathogenic mechanisms of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.*, 50 (3): 778-786.
- KRIEGER, J. N.; WOLNER-HANSEN, P.; STEVENS, C. y HOLMES, K.K. (1990). Characteristics of *Trichomonas vaginalis* isolates from women with and without colpitis macularis. *J. Infect. Dis.*, 161:

307-311.

- KROES, B. H.; QUARLES VAN UFFORD, H.C.; VAN DER BERG, A.J.J.; BEUKELMAN, C.J.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R.P. (1997). Isolation of phosterols with anticomplementary activity from *Tripterygium wilfordii*. Resúmenes del 45th Annual Congress of the Society for Medicinal Plant Research (Fran, G.; Vieweger, V. eds.) Regensbur. pp: 21.
- KULDA, J. (1990). Employment of Experimental Animals in Studies of *Trichomonas vaginalis* Infection. In *Trichomonads Parasitic in Humans*. (Honigberg, B.M. ed.), Springer-Verlag, New York, pp. 112-154.
- KULDA, J.; HONIGBERG, B.M.; FROST, J. K.; HOLLANDER, D. L. (1970). Pathogenicity of *Trichomonas vaginalis*: A clinical and biologic study. *Am. J. Obstet. Gynaecol.*, 108: 908-918.
- KULDA, J.; NOHYNKOVA, E.; LUDVIK, J. (1987). Basic structure and function of the trichomonad cell. In Kulda, J.; Cerkasov, J. (eds.): Proc. Int. Symp. Trichomonads & Trichomoniasis, Prague, July 1985 (Post-Symp. Publ. Pt. 1). *Acta Univ. Carolinae (Prague) Biol.* 30 (3-4): 180-198.
- KULDA, J.; ZAVADIL, M.; VOJTECHOVSKÁ, M.; DOHNALOVÁ, M.; KARÁSKOVÁ, J.; KUNZOVÁ, E. (1977). Comparation of the pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* for natural and experimental host. *Abstracts Cong. Int. Particip. Trichomoniasis*, Bratislava, Sept. 1977, p. 58. Bratislava: *Org. Comm. Cong. Trichomoniasis*, Faculty Med., Comenius Univ.
- KURNATOWSKA, A. (1969). Metronidazole resistance of *Trichomonas vaginalis* Donné. *Wiad. Parasitol.*, 15: 399-401.
- KURNATOWSKA, A. y KOMOROWSKA, A. (1990). Urogenital trichomoniasis in children. In *Trichomonads Parasitics in Humans*, (Honigberg, B. M. ed.). Springer-Verlag, New York. pp. 246-273.
- KURNATOWSKA, A.; KOMOROWSKA, A. y LINECKA, J. (1990). *Trichomonas vaginalis* infection rates from the population of Łódź during the last 25 years. *Wiadomosci Prazytologiczne*, 36 (5-6): 193-200.
- KURUMBAIL, R. G.; STEVENS, A. M.; GIERSE, J. K.; McDONALD, J. J.; STEGEMAN, R. A.; PAK, J. Y.; GILDEHAUS, D.; MIYASHIRO, J. M.; PENNING, T. D.; SIEBERT, K.; ISAKSON, P. C. y STALLING, W. C. (1996). Structural basis for selective inhibition of cyclooxygenase-2 by anti-inflammatory agents. *Nature*, 384: 644-648.
- ## L
- LAAN, I. A. (1965). On changeability of pathogenicity, agglutinability and fermentative activity of *Trichomonas vaginalis* (in Russian), thesis. Academy of Science Estonian SRR, Tallinn.
- LAAN, I. A. (1966). On the effect of passages in vitro and in vivo on the pathogenicity, agglutinative ability and fermentative activity of *Trichomonas vaginalis*. *Wiad. Parazytol.*, 12: 173-182.
- LAGA, M.; ALARY, M.; NZILA, N.; MANOKA, A. T.; TULIZA, M.; BEHETS, F.; GOEMAN, J.S.; LOUIS, M. y PIOT, P. (1994). Condom promotion, sexually transmitted disease treatment, and declining incidence of HIV-1 infection in female Zairian sex workers. *Lancet*, 344: 246-248.
- LAGA, M.; MANOKA, A. T.; KIVUVU, M.; MALELE, B.; TULIZA, M.; NZILA, N.; GOEMAN, J.S.; BATTER, F.V.; ALARY, M. (1993). Non-ulcerative sexually transmitted diseases as risk factors for HIV-1 transmission in women: results from a cohort study. *AIDS*, 7: 95-102.
- LAGA, M.; NZILA, N. y GOEMAN, J.S. (1991). The interrelationship of sexually transmitted diseases and HIV infection: implications for the control of both epidemics in Africa. *AIDS* 5 (Sup. 1): S55-S63.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- LAGRANGE, P.H., MACKENESS, G.B. y MILLER, T.E. (1974). Potentiation of T-cell-mediated immunity by selective suppression of antibody formation with cyclophosphamide. *J. Exp. Med.*, 139: 1529-1539.
- LAMONT, A. G. y ADORINI, L. (1996). Interleukin 12: a key cytokine in immune regulation. *Immunol Today*, 17 (5): 214-217.
- LANDOLFO, S; MARTINOTTI, M. G.; MARTINETTO, P. y FORNI, G. (1979). Genetic control of *Trichomonas vaginalis* infection. I. Resistance or susceptibility among different mouse strains. *Boll. Ist. Sieroter. Milan* 58: 48-51.
- LANDOLFO, S; MARTINOTTI, M. G.; MARTINETTO, P. y FORNI, G. (1980). Natural cell mediated cytotoxicity against *Trichomonas vaginalis*. I. Tissue, strain, age distribution, and some characteristic of the effector cells. *J. Immunol.*, 124: 508-514.
- LATTER, V. S.; LINSTAD, D. J.; BEESLEY, J. E.; WALTERS, M. A.; BRADLEY, S.; STEWARD, T. W. y ACKERS, J. P. (1985). Intravaginal infection of golden hamster by *Trichomonas vaginalis*. Abstracts Int. Symp. *Trichomonads and Trichomoniasis*, Prague, July 1985, p. 56. Prague: Local Organizing Committee, Dept. Parasitol. Faculty Sci., Charles Univ.
- LE, J. y VILCEK, J. (1987). Cytokines with multiple overlapping biological activities. *Lab. Invest.*, 56: 234-239.
- LEACHAN, R. M.; TONI, R.; CLARK, B. D.; CANNON, J. G.; SHAW, A. R.; DINARELLO, C. A. y REICHLIN, S. (1990). Immunoreactive interleukin-1 beta localization in the rat forebrain. *Res.*, 514: 135-140.
- LEDRU, S.; MEDA, N.; FOFANA, M.; SOULA, G.; BAZIE, A. J. y CHIRON, J. P. (1996). Etiologic study of genitourinary infections in women of childbearing age in Bobo-dioulasso, Burkina Faso, 1992. *Sex. Transm. Dis.*, 23 (2): 151-156.
- LEHNINGER, (1985). *Bioquímica*. 9ª Edición. Ed. OMEGA, S. A. Barcelona. pp. 705-738.
- LEOPOLDO, I. H. (1981). Treatment of corneal disease. *Immunol. Abst.*, 103-109.
- LERSCH, C.; ZEUNER, M.; BAUER, A.; SIEMENS, M.; HART, R.; DRESCHER, M.; FINK, U.; DANCYGIER, H. y CLASSEN, M. (1992). Nonspecific immunostimulation with low doses of cyclophosphamide, thymostimulin and *Echinacea purpurea* extracts (Echinacin) in patients with far advanced colorectal cancers: Preliminary results. *Cancer Inves.*, 10 (5): 343-348.
- LEVINE, N.D.; CORLISS, J.O.; COX, F.E.G.; DEROUX, G.; GRAIN, J.; HONIGBERG, B.M.; LEEDALE, G.F.; LOEBLISH, A.R.; LOM, J.; LYNN, D.; MERINFELD, E.G.; PAGE, F.C.; POLJANSKI, G.; SPRAGUE, V.; VAVRA, J. y WALLACE, F.G. (1980). A newly revised classification of the Protozoa. *J. Protozool.*, 27 (1): 37-58.
- LIBERATI, A. M.; BRUGIA, M.; EDWARDS, B. S.; BERTONI, P.; BALLATORI, E.; PUXEDDU, A. y GRIGNANI, F. (1985). Immunorestorative properties of thymostimulin (TS) in patients with Hodgkin's disease in clinical remission. *Cancer Immunol. Immunother.*, 19 (2): 136-141.
- LIEBERMAN, A. P.; PITHA, P.M.; SHIN, H.S. y SHIN, M. L. (1989). Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus. *Proc. Nat. Sci.*, 86: 6348-6358.
- LILES, W.C. y VAN VOORHIS, W. W. (1995). Review: Nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *J. Infect. Dis.*, 172: 1573-1580.

- LIN, C. Y.; HSU, H. C.; CHEN, C. L. y SHEN, E. Y. (1987). Treatment of combined immunodeficiency with thymic extract (Thymostimulin). *Ann. Allergy*, 58 (5): 379-384.
- LIN, C. Y.; KUO, Y. C.; LIN, C. C. y OU, B. R. (1988). Enhancement of interleukin-2 and gamma-interferon production *in vitro* on cord blood lymphocytes and *in vivo* on primary cellular immunodeficiency patients with thymic extract (thymostimulin). *J. Clin. Immunol.*, 8 (2): 103-107.
- LINDMARK, D. G. y MÜLLER, M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmatic organelle of the anaerobic flagellate *Trichomonas foetus*, and its role in piruvate metabolism. *J. Biol. Chem.*, 235: 7724-7728.
- LINDMARK, D. G. y MÜLLER, M. (1976). Antitrichomonad action, mutagenicity, and reduction of metronidazole and other nitroimidazoles. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 10 (3): 476-482.
- LIROSI, G. y GUARASCIO, A. (1972). Effects of hormonal changes in the vaginal environment in the treatment of vaginitis especially due to *Trichomonas*. *Minerva Ginecol.*, 24: 23-27.
- LIVINGSTON P.O.; CUNNINGHAM-RUNLES, S.; MARFLEET, G. (1987). Inhibition of suppressor cell activity by cyclophosphamide in patients with malignant melanoma. *J. Biol. Resp. Modif.*, 6: 392-403.
- LOCKWOOD, B.C.; NORTH, M.J. y COOMBS, G. H. (1987). Proteolysis in *Trichomonads*. In *Trichomonas and Trichomoniasis*, Part. I. (Kulda, J. y Cerkasov, J. eds.). *Acta Univ. Carolinae-Biol.* 30, (1986): 313-318.
- LOCKSLEY, R. y SCOTT, P. (1991). Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. *Immunol. Today*, 12: A58-A61.
- LOISEAU, P. M.; REKIK, L.; MADAULE, Y.; GAYRAL, P. y WOLF, J. G. (1993). Design, synthesis and biological study of new antiparasitic spiroarsoranes. *Arzneim. Forsch./Drug. Res.*, 43 (9): 1004-1009.
- LORENZO-VELÁZQUEZ, B. (1987). Farmacología y su proyección a la Clínica. 15ª Edición. Ed. OTEO, Madrid. pp. 417-435, 903-916.
- LOSSICK, J.G. (1990). Therapy of urogenital trichomoniasis. In *Trichomonads Parasitics in Humans* (Honigberg, B. M. ed.). Springer-Verlag, New York. pp. 324-341.
- LOZOYA, X.; MADRAZO, I.; GUIZAR, G.; VILLARREAL, M.L.; GRIJALVA, I.; SALGADO, H.; BOIJSEAUNEAU, E.; IBARRA, A.; ARIAS-CASTRO, C.; RODRÍGUEZ-MENDIOLA, M.A. (1995). Survival of cultured plants cells grafted in the subcutaneous tissue of rats (preliminary report). *Arch. Med. Res.*, 26: 85-89.
- LUSHBAUGH, W. B.; TURNER, A. C.; GENTRY, G. A. y KLYKKEN, P. C. (1989). Characterization of a secreted cytoactive factor from *Trichomonas vaginalis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 41 (1): 18-28.
- LYNCH, J. E.; HOLLEY, E. C.; MARGISON, J. E. (1955). Studies on the use of the mouse as a laboratory animal for the evaluation of antitrichomonal agents. *Antibiot. Chemother.*, 9: 508-514.

## M

- MACATONIA, S. E.; HOSKEN, N. A.; LITTON, M.; VIEIRA, P.; HSIEH, C. S.; CULPEPPER, J. A.; WYSOCKA, M.; TRINCHIERI, G.; MURPHY, K. M.; O'GARRA, A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J. Immunol.*, 154: 5071-5079.
- MALEK, T. R.; CHAN, C.; GLIMCHER, L. H.; GERMAIN, R. N. y SHEVACH, E. M. (1985). Influence of accessory cell and T cell surface antigens on mitogen-induced IL-2 receptor expression. *J. Immunol.*,

135: 1826-1833.

- MALLINSON, D.J., LOCKWOOD, B. C.; COOMBS, G. H. y NORTH, M. J. (1994). Identification and molecular cloning of four cysteine proteinase genes from the pathogenic protozoon *Trichomonas vaginalis*. *Microbiology*, 140: 2725-2735.
- MANNEL, D. N.; MIZEL, S. B.; DIAMANSTEIN, T. y FALK, W. (1985). Induction of interleukin 2 responsiveness in thymocytes by synergistic action of interleukin 1 and interleukin 2. *J. Immunol.* 134: 3108-3113.
- MANTOVANI, A., POLENTARUTTI, N., PERI, G., MARTINOTTI, G. y LANDOLFO, F. (1981). Cytotoxicity of human peripheral blood monocytes against *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Exp. Immunol.*, 46: 391-396.
- MARCZAK, R.; GORELL, T. E. y MÜLLER, M. (1983). Hydrogenosomal ferredoxin of the anaerobic protozoon *Tritrichomonas foetus*. *J. Biol. Chem.*, 258, 12427-12433.
- MARCINKIEWICZ, J.; GRABOWSKA, A.; BERETA, J.; STELMASZYNSKA, T. (1995). Taurine chloramine, a product of activated neutrophils, inhibits in vitro the generation of nitric oxide and other macrophage inflammatory mediators. *J. Leukocyte Biol.*, 58 (6): 667-674.
- MARGULIS, L.; CORLISS, J. O.; MELKONIAN, M.; CHAPMAN, D. J. (1990). *Handbook of Protoctista*. (Class Parabasalia Ch. 14. Betsey Dexter Dyer). (Jones and Bartlett Publishers, eds.), Boston, MA. pp. 252-258.
- MARTÍNEZ GRUEIRO, M<sup>a</sup>. M. (1987). Ensayos de actividad antihelmíntica. *Tesis Doctoral*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- MARTINOTTI, M. G.; JEMMA, C.; GIOVARELLI, M. y MUSSO, T. (1985). Induction of macrophage activation by immune T lymphocytes for *Trichomonas vaginalis* killing. Abstracts *Int. Symp. Trichomonads & Trichomoniasis*, Prague, p. 49.
- MASON, P. R. (1979). Serodiagnosis of *Trichomonas vaginalis* infection by the indirect fluorescent antibody test. *J. Clin. Pathol.*, 32: 1211-1215.
- MASON, P. R. y FORMAN, L. (1980). *In vitro* attraction of polymorphonuclear leucocytes by *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.*, 66: 888-892.
- MASON, P. R. y FORMAN, L. (1982). Polymorphonuclear cell chemotaxis to secretions of pathogenic and nonpathogenic *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.*, 68: 457-462.
- MASON, P. R. y FORMAN, L. (1985). Proliferative response of human lymphocytes to secretory and cellular antigens of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.*, 71: 265-268.
- MASON, P.R.; KATZENSTEIN, D.A.; CHIMBIRA, T.H.K. y MTIMAVALYE, L. (1989). Microbial flora of the lower genital tract of women in labour at Harare Maternity Hospital. *Central African J. Med.*, 35 (3): 337-344.
- MASON, P.R. y PATTERSON, B. A. (1985). Proliferative response of human lymphocytes to secretory and cellular antigens of *Trichomonas vaginalis*. *J. Parasitol.*, 71 (3): 265-268.
- MATHEWS, H. M. y HEALY, G. R. (1983). Evaluation of two serological tests for *Trichomonas vaginalis* infection. *J. Clin. Microbiol.*, 17: 840-843.

- MAYAUD, P.; ULEDI, E.; CORNELISSEN, J.; KA-GINA, G.; TODD, J.; RWAKATARE, M.; WEST, B.; KOPWE, L.; MANOKO, D.; GROSSKURTH, H.; HAYES, R. y MABEY, D. (1998). Risk scores to detect cervical infections in urban antenatal clinic attenders in Mwanza, Tanzania. *Sex. Trans. Infect.*, 74 (Suppl. 1): S139-146.
- McGRORY, T. y GARBER, G.E. (1992). Mouse intravaginal infection with *Trichomonas vaginalis* and role of *Lactobacillus acidophilus* in sustaining infection. *Infect. Immun.*, 60: 2375-2379.
- McGRORY, T., MEYSICK, L., LEMCHUK-FAVEL, L. T. y GARBER, G. E. (1994). The interaction of *Lactobacillus acidophilus* and *Trichomonas vaginalis* in vitro. *J. Parasitol.*, 80: 50-54.
- McINNES, A.; RENNICK, D. (1988). Interleukin 4 induces cultured monocytes/macrophages to form giant multinucleated cells. *J. Exp. Med.*, 167: 598-611.
- McLAREN, L.C.; DAVIS, L.E.; HEALY, G.R. y JAMES, C.G. (1983). Isolation of *Trichomonas vaginalis* from the respiratory tract of infants with respiratory disease. *Pediatrics*, 71 (6): 888-890.
- MEIJDEN, W. I. van der; DUIVENVOORDEN, H. J.; BOTH-PATOIR, H. C.; HAZEN-ENGELSMAN, M. E. y DROGENDIJK, A. C. (1988). Clinical and laboratory findings in women with bacterial vaginosis and trichomoniasis versus controls. *European J. Obs. Gynaecol. and Reproductive Biol.*, 28: 39-52.
- MEINGASSNER, J.G. (1977). Comparative studies on the trichomonocidal activity of 5-nitroimidazole derivatives in mice infected s.c. or intravaginally with *T. vaginalis*. *Experientia*, 33: 1160-1161.
- MEINGASSNER, J.G.; GEORGOPOLOUS, A.; PATOSCHKA, M. (1975). Intravaginale infektionen der Ratte mit *Trichomonas vaginalis* und *Candida albicans*. Ein Modell zur experimentellen Chemotherapie. *Tropenmed. Parasitol.*, 26: 395-398.
- MEINGASSNER, J.G. y HEYWORTH, P.G. (1981). Intestinal and urogenital flagellates. In *Antiparasitic Chemotherapy. Antibiotic Chemotherapy* vol. 30, (Schonfeld H. ed.). Basel: S. Karger. pp. 163-202.
- MEINGASSNER, J.G.; HAVELEC, L. y MIETH, H. (1978). Studies on strain sensitivity of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole. *Br. J. Vener. Dis.*, 54: 72-76.
- MEINGASSNER, J.G. y MIETH, H. (1977). Die Wirksamkeit bekannter systemisch wirksamer Trichomonazide im Infektionsmodell *Trichomonas vaginalis*/Ratte. *Arzneim-Forsch* 27: 638-639.
- MEINGASSNER, J.G. y TURNER, J. (1979). Strain of *Trichomonas vaginalis* resistant to metronidazole and other 5-nitroimidazoles. *Antimicrob. Agents and Chemother.*, 15 (2): 254-257.
- MELBY, E. C. Jr. y ALTMAN, N. H. eds. (1974). *Handbook of Laboratory Animal Science*. Cleveland, CRC Press.
- MELHORN, H. y PIEKARSKI, G. (1993). *Fundamentos de Parasitología. Parásitos del hombre y de los animales domésticos*. Editorial Acribia, S. A.
- MERELENDER, A. M.; WOODRUFF, D. S.; UPATHAM, E. S.; VIYANANT, V. y YUAN, H.C. (1987). Large genetic distance between chinese and philippine *Schistosoma japonicum*. *J. Parasitol.*, 73: 861-863.
- MEULEMAN, J. y KATZ, P. (1985). The immunologic effects, kinetics and use of glucocorticosteroids. *Med. Clin. N. Am.*, 69: 805-810.
- MICHAELS, R. M. (1968). Chemotherapy of trichomoniasis. In *Advances in Chemotherapy*, vol 1, (Goldin



- A., Hawkin F., Schnitzer R.J. eds.). Academic Press, New York. pp 289-331.
- MICHAELS, R. M.; PETERSON, L. J.; STAHL, G. L. (1962). The activity of substituted thiosemicarbazones against *Trichomonas vaginalis* and *Trichomonas foetus* *in vitro* and in experimental animals. *J. Parasitol.* 48: 891-897.
- MICHEL, R. (1971). Nachweiss des allergischen Spatreaktionstyps bei Mäusen nach Sensibilisierung mit *Trichomonas vaginalis* und ein weiterer Beitrag zur Spezifität der Peritonealzellreaktion. *Z. Tropenmed. Parasitol.*, 22: 91-97.
- MICHAELS, R. M. y STRUBE, R. E. (1961). Antitrichomonal agents 5-nitrothiazoles, 5-nitropyridines and 5-nitropyrimidines. *J. Pharm. Pharmacol.*, 13: 601-610.
- MILLER, M. S., HOWES, H. L. y ENGLISH, A. R. (1969). Tinidazole: a potent new antiprotozoal agent. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2: 257-260.
- MIESCHER, P. A. y BERIS, P. (1984). Immunosuppressive therapy in the treatment of autoimmune diseases. *Springer Sem. Immunopath.*, 7: 69.
- MILLER, J. M.; CHAMBERS, D. C.; MILLER, J. M. (1989) Infection with *Trichomonas vaginalis* in a black population. *J. National Med. Association*, 81 (6): 701-702.
- MIN, D. Y.; RYU, J. S.; PARK, S. Y.; SHIN, M. H. y CHO, W. Y. (1997). Degradation of human immunoglobulins and cytotoxicity on HELA cells by live *Trichomonas vaginalis*. *Korean J. Parasitol.*, 35 (1): 39-46.
- MINKOFF; H. L.; EISENBERG-MATIYAHU, D.; FELDMAN, J.; BURK, R. y CLARKE, L. (1999). Prevalence and incidence of gynecologic disorders among women infected with human immunodeficiency virus. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 180 (4): 824-836.
- MITELMAN, F.; HARTLEY, B. y URSING, B. (1976). Chromosome aberrations and metronidazole. *Lancet*, 9: 802.
- MIYATA, A. (1973). On the cryo-biological study of the parasitic protozoa. *Trop. Med.*, 15 (3): 141-153.
- MOHAMMAD, A. (1989). Vitiligo repigmentation with Anapsos (*Polypodium leucotomos*). *Int. J. Dermatology*, 28: 479.
- MONCLÚS, F. y VARGAS, J. (1985). Anapsos en queratitis herpéticas. *An. Ins. Bar.*, 18: 145-148.
- MORGAN, D.A.; RUSCETTI, F. W. y GALLO, R. (1976). Selective *in vitro* growth of T lymphocytes from normal human bone marrows. *Science*, 193: 1007-1008.
- MORRINSON, C. S.; SUNKUTU, M. R.; MUSABA, E. y GLOLVER, L. H. (1997). Sexually transmitted disease among married Zambian women: the role of male and female sexual behaviour in prevention and management. *Genitourin. Med.*, 73 (6): 555-557.
- MOSMANN, T. R. y COFFMAN, R. L. (1989). Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Ann. Rev. Immunol.*, 7: 145-173.
- MOYA, P.; BAIXERAS, E.; BARASOAIN, I.; ROJO, J. M.; RONDA, E.; ALONSO, M. L. y PORTOLÉS, A. (1987). Immunoferon (AM3) enhances the activities of early-type interferon inducers and natural killer cells. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 9 (2-3):243-256.

- MUELAS SERRANO, S. (1998). Aplicación de un método colorimétrico al cribado farmacológico in vitro sobre epimastigotes de *Trypanosoma cruzi*. Tesis de Licenciatura. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- MULCAHY, F.M. y LACEY, C.J.N. (1987). Sexually transmitted infections in adolescent girls. *Genitourinary Medicine*, 63 (2): 119-121.
- MULHOFF, G.; BOZTLER, C.; ALLENBACHER, A.; ISSELS, R. (1996). Effects of ifosfamide on immunocompetent effector cells. *Cancer Immunol. Immun.*, 42 (4): 251-254.
- MÜLLER, O.F. (1773). *Vermium terrestrium et fluviatilium, seu animalium infusorium, helminthicorum et testaceorum, non marinorum, succincta historia*. Vol. 1, pt 1 and 2. Havniae et Lipsiae. Heinck et Taber.
- MÜLLER, M., LOSSICK, J.G. y GORRELL, T. E. (1988). *In vitro* susceptibility of *Trichomonas vaginalis* to metronidazole and treatment outcome in vaginal trichomoniasis. *Sex. Trans. Dis.*, 15: 17-24.
- MÜLLER, M., MEINGASSNER, J. G.; MILLER, W. A. y LEDGER, W. J. (1980). Three metronidazole-resistant strains of *Trichomonas vaginalis* from the United States. *Am. J. Obstet. Gynaecol.*, 138 (7 Pt 1):808-812.
- MULTHOFF, G.; BOZTLER, C.; ALLENBACHER, A.; ISSELS, R. (1996). Effects of ifosfamide on immunocompetent effector cells. *Cancer Immunol. Immun.*, 42 (4): 251-254.
- MUNNO, I.; MARINARO, M.; GESARIO, A.; CANNUSCIO, B.; MICHEL, Y. y PAULLING, E. (1995). Immunomodulatory effects of alpha interferon and thymostimulin in patients neoplasias. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, 2 (4): 503-505.
- MURRAY, H. W. (1990a). Gamma interferon, cytokine-induced macrophage activation and antimicrobial host defense *in vitro*, in animal models and in humans. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.*, 13: 411-421.
- MURRAY, H. W. (1990b). Interferon- $\gamma$  therapy in AIDS for mononuclear phagocyte activation. *Biotherapy*, 40: 1433-1439.
- MUTWIRI, G. K. y CORBEIL, L. B. (1998). Genital and Systemic immune responses in a murine model of *Trichomonas foetus* infection. *J. Parasitol.*, 84 (2): 321-329.
- N**
- NAKAMURA, N. (1971). Studies on experimental vaginal trichomoniasis in rats, with special reference to factors influencing the establishment of infection. *Jpn J. Parasitol.*, 20: 7-23.
- NASHEL, D. J. (1985). Mechanisms of action and clinical applications of cytotoxic drugs in rheumatic disorders. *Med. Clin. North. Am.*, 69 (4): 8817-840.
- NATHAN, C. F. (1987). Secretory products of macrophages. *J. Clin. Invest.*, 79: 319-326.
- NATHAN, C. F. (1992). Interferon and inflammation. In *Inflammation: basic principles and clinical correlates 2nd ed.*, (Gallin, J. L.; Goldstein, I. M. y Synderman, R. eds.). Raven Press, New York. pp. 265-290.
- NAVARRO GARCÍA, A. (1998). Principios activos antiinflamatorios de *Sideritis foetens* Clem. ex Lag. Estudio de su mecanismo de acción. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- NEAL, R. A. (1964). Chemotherapy of cutaneous leishmaniasis: *Leishmania tropica* infections in mice. *Ann.*

- Trop. Med. Parasitol.*, 58: 420-430.
- NEDVEDOVÁ, H. y KULDA, J. (1978). Pathogenicity of a virulent *Trichomonas vaginalis* strain for the laboratory rat after intravaginal inoculation. *J. Protozool.*, 25: 39A.
- NEGORO, S. y HARA, H. (1992). The effect of taurine on the age-related decline of the immune response in mice: the restorative effect on the T cell proliferative response to costimulation with ionomycin and phorbol myristate acetate. *Adv. Exp. Med. Biol.*, 315: 229-239.
- NEWTON, W. L.; REARDON, L. V.; DE LEVA, A. M. (1960). A comparative study of the subcutaneous inoculation of germ-free and conventional guinea pigs with two strains of *Trichomonas vaginalis*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 9: 56-61.
- NICOL, C. S.; MCFADZEN, J.A. y SQUIRES, S. L. (1966). *Trichomonas vaginalis* resistance. *Lancet*, 1: 1100-1101.
- NIELSEN, M. H. (1976). *In vitro* effect of metronidazole on the ultrastructure of *Trichomonas vaginalis* Donné. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica*, 843: 93-100.
- NIELSEN, M. H.; LUDVIK, J. y NIELSEN, R. (1966). On the ultrastructural of *Trichomonas vaginalis* Donné. *J. Microscopic*, 5: 229-250.
- NIELSEN, M. H.; NIELSEN, R. (1975). Electron microscopy of *Trichomonas vaginalis* Donné: Interaction with vaginal epithelium in human trichomoniasis. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, (B) 83: 305-320.
- NIELSEN, M. H. y DIEMER, N. H. (1976). The size, density, and relative area of chromatic granules ("hydrogenosomes") in *Trichomonas vaginalis* Donné from cultures in logarithmic and stationary growth. *Cell. Tiss. Res.*, 167, 461-465.
- NIETO SAN PEDRO, M. y BERMAN, M. A. (1987). Interleukin-1-like activity in rat brain: Sources, targets and effect of injury. *J. Neurosci. Res.*, 17: 214-219.
- NIKOLSKY, I. S.; SELEZNYOVA, T. N.; ZAMOTAYEVA, G. A.; MARTYNENKO, S. V. y GRINEVICH, Y. A. (1990). Production of substances with thymosin-like activity by B- and T-lymphocytes. *J. Hyg. Epidemiol. Microbiol. Immunol.*, 34 (3): 309-314.
- NOGAL RUIZ, J. J.; ESCARIO G<sup>a</sup>-TREVIJANO, J. A.; MARTÍNEZ DÍAZ, R. A. y GÓMEZ BARRIO, A. (1996). Evaluation of a murine model of experimental trichomoniasis. *Parasite*, 2: 127-132.
- NORTH, M. J.; LOCKWOOD, B. C.; BREMNER, A. F. y COOMBS, G. H. (1986). Polyamine biosynthesis in trichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 19: 241-249.
- NORTH, M. J.; LOCKWOOD, B. C. y COOMBS, G. H. (1987). The role of polyamines and ornithine decarboxylase in Trichomonads. In *Trichomonads and Trichomoniasis*, Part. I. (Kulda, J. and Cerkasov, J. eds.). *Acta Univ. Carolinae.-Biol.*, 30, (1986): 287-292.
- NORTH, M. J.; MOTTRAM, J.C. y COOMBS, G. H. (1990). Cysteine proteinases of parasitic protozoa. *Parasitol. Today*, 6 (8): 270-274.

**O**

- O'BRIEN, J.L., LAURIANO, C. y ALDERETE, J.F. (1996). Molecular characterization of a third malic enzyme -like AP65 adhesin gene of *Trichomonas vaginalis*. *Microb. Pathog.*, 20: 335-349.

- OCHOA, C.; PÉREZ, R.; PÉREZ, E.; SUÁREZ, M.; OCHOA, E.; RODRÍGUEZ, H.; GÓMEZ BARRIO, A.; MUELAS, S.; NOGAL, J. J. y MARTÍNEZ, R. A. (1998). Synthesis and antiprotozoan properties of new 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazin-2-thione derivatives. (*Arzn. Forsch./Drug Res.*, aceptada para su publicación).
- O'FARRELL, N.; HOOSEN, A. A.; KHARSANY, A. B. M. y ENDE, J. VAN DEN (1989). Sexually transmitted pathogens in pregnant women in a rural South African community. *Genitour. Med.*, 65 (4): 276-280.
- OGBONNA, C. I. C.; OGBONNA, A. A. y ANOSIKE, J. C. (1991). Studies on the incidence of *Trichomonas vaginalis* amongst pregnant women in Jos area of Plateau state, Nigeria. *Angewandte Parasitol.*, 32 (4): 198-204.
- OMER, E. E.; NAEEM, H. A. E.; ALI, M. H.; CATTERALL, R. D. y ERWA, H. H. (1991). Vaginal and cervical abnormalities associated with trichomonal infection. *East African Med. J.*, 68 (6): 455-460.
- ORDUÑA DOMINGO, A.; CHU, J. J.; EIROS-BOUZA, J. M.; BRATOR-PÉREZ, M. A.; GUTIÉRREZ-RODRÍGUEZ, M. P.; ALMEZAR GÓMEZ, A.; USEROS FERNÁNDEZ, J. L.; RODRÍGUEZ TORRES, A. (1991). Distribución por edad y sexo de las enfermedades de transmisión sexual en Valladolid. Estudio de 5.076 casos. *Rev. Sanid. Hig. Pública. Madrid*, 65 (3), 247-358.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (1995). An overview of selected curable sexually transmitted diseases. In *Global program on AIDS*. World Health Organization, Geneva, Switzerland. p. 2-27.
- OSISANYA, J. O. S.; SEHGAL, S. C. e IYANDA, A. (1990). Pattern of genitourinary parasitic infections at the teaching hospital, Sokoto, Nigeria. *East African Med. J.*, 67 (1): 51-57.
- OVCINNIKOV, N. M.; DELECTORSKIJ, V. V.; TURANOVA, E. N.; YASHKOVA, G. N. (1975). Further studies of *Trichomonas vaginalis* with transmission and scanning electron microscopy. *Br. J. Vener. Dis.*, 51: 357-375.
- ÖZBILGIN, A.; ÖZBEL, Y.; ALKAN, M. Z.; GÜRÜZ, Y.; ATAMBAY, M.; TASCI, S.; ÖZCEL, M. A. (1994). Trichomoniasis in non-gonococcal urethritis among male patients. *J. Egyptian Society of Parasitol.*, 24 (3): 621-625.
- ## P
- PAL, N. K.; CHAKRABORTY, M. S.; DAS, A.; KHODAKEVICH, L.; JANA, S.; CHAKRABORTY, A. K. (1994). Community based survey of STV/HIV infection among commercial sex workers in Calcutta (India): Part IV. Sexually transmitted diseases and related factors. *J. Comm. Dis.*, 26 (4): 197-202.
- PARONIKJAN, G. M. (1958). Obtaining of experimental model of trichomonad infection. *Izv. Akad. Nauk. Arm. SSR. Biol. Nauki.*, 11: 51-57 (In Russian).
- PASSEY, M.; MGONE, C. S.; LUPIWA, S.; SUVE, N.; TIWARA, S.; LUPIWA, T.; CLEGG, A. y ALPERS, M. P. (1998). Community based study of sexually transmitted diseases in rural women in the highlands of Papua New Guinea: prevalence and risk factors. *Sex. Transm. Infect.*, 74 (2): 120-127.
- PATTEN, S. F. Jr.; HUGHES, C. P. y REAGAN, J. W. (1962). An experimental study of the relationship between *Trichomonas vaginalis* and dysplasia in the uterine cervix. *Acta Cytol.*, 7: 187-190.
- PAUL, W. E. (1993). The immune system. In *Fundamental Immunology* (second edition), (Paul W. E. ed.), Raven Press, New York, pp. 3-20.
- PAUL, W. E. y O'HARA, J. (1987). B-cell stimulatory-1/interleukin 4. *Annu. Rev. Immunol.*, 5: 429-434.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- PEER, A. K.; HOUSEN, A. A.; SEEDAT, M. A.; ENDE, J. van der y OMAR, M. A. K. (1993). Vaginal yeast infections in diabetic women. *South African Med. J.*, 83 (10): 727-729.
- PEREA, E.J.; ÁLVAREZ-DARDET, C.; BOROBIO, M.V.; BEDOYA, J.M.; ESCUDERO, J.; GALLARDO, R.M.; GONZÁLEZ-GABALDÓN, B.; MIGUEL, C. DE; MORENO, J.C.; PÉREZ-BERNAL, A.; RODRÍGUEZ-PICHARDO, A. (1981) Three years' experience of sexually transmitted diseases in Seville, Spain. *Br. J. Vener. Dis.*, 57: 174-177.
- PEREA ORTÍZ, J.A. y GARCÍA-ORCOYEN TORMO, J. (1971). Trichomoniasis urogenital. *Arch. Fac. Med.*, 4, vol. XX.
- PÉREZ, E.; RODRÍGUEZ, H.; SUÁREZ, M.; PICH, R. M.; PÉREZ, R.; LÓPEZ DE CERAÍN, A.; EZPELETA, A.; GÓMEZ, A.; NOGAL, J. J.; MUELAS, S. y OCHOA, C. (1997). Síntesis y actividad antiprotozoaria y anticancerosa de los derivados de tetrahydro-2H-1,3,5-tiadiazin-2-tiona-3,5-disustituidos. *X Congreso de la Sociedad Española de Química Terapéutica*. pp. 65 y 105.
- PÉREZ DE LAS CASAS, O.; RODRÍGUEZ, E.; GONZÁLEZ, P.; DÍAZ-FLORES, F.; GONZÁLEZ HERMOSO, F. y ALARCÓ, A. (1987). Aloinjertos cutáneos tras la administración de extractos de *Polypodium leucotomos*. *Revista Barcelona Quirúrgica*. 30: 303-311.
- PÉREZ DEL MOLINO BERNAL, M. L.; VILLACORTA MTNEZ. DE MATURANA, M. I.; AMOROTO DEL RÍO, E.; ARES-MAZAS, M. E. y FANDIÑO-SALORIO, M. L. (1987). Estudio de la virulencia de cepas de *Trichomonas vaginalis* aisladas en clínica. *Rev. Ibér. Parasitol., Vol. Extraordinario*, pp. 55-59.
- PERNIN, P.; CARIOU, M. L. y JACQUIER, A. (1985). Biochemical identification and phylogenetic relationship in free-living amoebas of the genus *Naegleria*. *J. Protozool.*, 32: 592-603.
- PETERSON, K.M. y ALDERETE, J.F. (1982). Host plasma proteins on the surface of pathogenic *Trichomonas vaginalis*. *Infect Immun.*, 37: 755-762.
- PETRIN, D.; DELGATY, K.; BHATT, R. y GARBER, G. (1998). Clinical and microbiological aspects of *Trichomonas vaginalis*. *Clin. Microbiol. Reviews*, 11 (2): 300-317.
- PINDAK, F. F.; GARDNER, W. A. y MORA de PINDAK, M. (1986). Growth and cytopathogenicity of *Trichomonas vaginalis* in tissue cultures. *J. Clin. Microol.*, 23: 672-678.
- PINDAK, F. F.; MORA de PINDAK, M. y GARDNER, W. A. (1993). Contact-independent cytotoxicity of *Trichomonas vaginalis*. *Genitourin. Med.*, 69: 35-40.
- PINDAK, F. F.; MORA de PINDAK, M.; HYDE, B. M. y GARDNER, W. A. (1989). Acquisition and retention of viruses of *Trichomonas vaginalis*. *Gen. Med.*, 65 (6): 366-371.
- PIÑEIRO ÁLVAREZ, B. (1982). Dos años de experiencia personal en el tratamiento con Anapsos de psoriasis en diferentes formas clínicas (495 casos). *Antol. Dermatol.*, 11: 45-51.
- PONCE GORDO, F. (1995). Caracterización biológica de las cepas de *Echinococcus granulosus* de origen español. *Tesis doctoral*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- PONCE GORDO, F. y CUESTA BANDERA, C. (1996). Differentiation of Spanish strains of *Echinococcus granulosus* using larval rostellar hook morphometry. *Int. J. Parasitol.*, 27: 41-49.
- POULTER, L.W. y TURK, J.L. (1972). Proportional increase in the theta-carrying lymphocytes in peripheral lymphoid tissue following treatment with cyclophosphamide. *Nature New Biol.*, 238: 17-18.

PROVENZANO, D. y ALDERETE, J.F. (1995). Analysis of human immunoglobulin-degrading cysteine proteinases of *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.*, 63: 3388-3395.

PUTZER, B. (1934). Berberine and its derivatives in the treatment of oriental sore. *Med. Chem. Aspects*, 2: 274-280.

## R

RADHA, P. y JAYKAR, P.A. (1988). Microbiological study of leucorrhoea cases in Visakhapatnam. *J. Indian Med. Association*, 86 (11): 289-291.

RAETHER, W. y SEIDENATH, H. (1983). The activity of fexinidazole (HOE 239) against experimental infections with *Trypanosoma cruzi*, trichomonads and *Entamoeba histolytica*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.*, 77: 13-26.

RAMJEE, G.; KARIM, S. S. y STURM, A W. (1998). Sexually transmitted infections among sex workers in KwaZulu-Natal, South Africa. *Sex Transm. Dis.*, 25 (7): 346-349.

RASMUSSEN, S. E. y RHODES, J. M. (1985). Chemotactic effect of *Trichomonas vaginalis* on polymorphonuclear leucocytes *in vitro*. *Abstracts Int. Symp. Trichomonads & Trichomoniasis*, Prague, p.50.

REAGAN, J. W. y WENTZ, W. B. (1959). Changes in the mouse cervix antedating induced cancer. *Cancer*, 12: 389-395.

REARDON, L.V.; ASHBURN, L. L.; JACOBS, L. (1961). Differences in strains of *Trichomonas vaginalis* as revealed by intraperitoneal injections into mice. *J. Parasitol.*, 47: 527-532.

REIN, M. F. (1977). *Trichomoniasis* in VD clinic women. Paper presented at the *Ann. Meet. Am. Public. Health Assoc.*, Washington DC. Nov. 1.

REIN, M. F. (1990). Clinical manifestations of urogenital trichomoniasis in women. In *Trichomonads Parasitics in Humans* (Honigberg, B.M. ed.). Springer-Verlag, New York, pp. 225-234.

REIN, M. F.; SULLIVAN, J. A. y MANDELL, G. L. (1980). Trichomonacidal activities of human polymorphonuclear neutrophils: Killing by disruption and fragmentation. *J. Infect. Dis.*, 142: 575-585.

REINHERZ, E.; O'BRIEN, C.; ROSENTHAL, P. y SCHLOSSMAN, S. F. (1980). The cellular basis for the viral- induced immunodeficiency: Analysis by monoclonal antibodies. *J. Immunol.*, 125: 1269-1274.

REISENHOFER, V. (1963). Über die Beeinflussung von *Trichomonas vaginalis* durch verschiedene Sera. *Arch. Hyg. Bakteriol.*, 146: 628-635.

RENAUD, F.; COUSTAU, C.; LE BRUN, N. y MOULLA, C. (1992). Parasitism in host hybrid zone. *Res. Rev. Parasitol.*, 52:13-20.

REVILLARD, J. P. (1978). Delayed hypersensitivity. In *Immunology* (Bach, J. F. ed.). Wiley Medical, New York, pp. 324-351.

RIECHE, A.; HILGETAG, G.; MARTINI, A.; PHILIPPIN, R. (1966). Synthesis and antiprotozoan properties of 3,5-disubstituted-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazin-2-thione derivatives. *Arch. Pharm.*, 293: 957.

RÍOS, J.L.; GINER, R.M.; VILLAR, A. (1989). Isolation and identification of anti-inflammatory principle from *Santolina chamaecyparissus*. *Phytother. Res.*, 3: 212-214.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- RIVERA, L. R.; TRENADO, M.Q.; VALDÉZ, A. C. y GÓNZALEZ, C. J. (1996). Prevalence of bacterial vaginitis and vaginosis: association with clinica and laboratory features, and treatment. *Ginecol. Obstet. Mex.*, 64: 26-35.
- RODRÍGUEZ GALLEGO, M. E. (1996). Primeros datos sobre la prevalencia de la tricomoniasis en Madrid. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Complutense de Madrid, Madrid.
- ROGER, A.J.; CLARK, C.G. y DOOLITTLE, W. F. (1996). A possible mitochondrial gene in the early-branching amitochondriate protist *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 93: 14618-14622.
- ROIGAS, E. (1961). On trichomonad etiology of inflammations of the genito-urinary tract of men (in Russian), thesis. Academy of Science Estonian SRR, Tallin.
- ROIGAS, E.; TERAS, J.; RIDALA, V. y TOMPEL, H. (1969). Pathomorphological reaction of testicles of white rats and guinea pigs infected with *Trichomonas vaginalis*. *Wiad. Parazytol.*, 15: 315-317.
- ROJO, J. M.; REJAS, M. T.; OJEDA, G. PORTOLÉS, P. y BARASOAIN, I. (1986). Enhancement of lymphocyte proliferation, interleukin-2 production and NK activity by inmuferon (AM-3), a fungal immunomodulator: variations in normal and immunosuppressed mice. *Int. J. Immunopharmacol.*, 8 (6): 593-597.
- ROMERO FERNÁNDEZ, E. (1999). Patogenia experimental de aislamientos naturales de *Trichomonas vaginalis*. *Tesis de Licenciatura*. Universidad Complutense de Madrid. Madrid.
- ROSSI, S. J.; SCHROEDER, T. J.; HARIHARAN, S. y FIRST, M. R. (1993). Prevention and management of the adverse effects associated with immunosuppressive therapy. *Drug Saf.*, 9 (2): 104-131.
- ROUSSEL, F., CARLI, G.A. DE y BRASSEUR, P. (1991). A cytopathic effect of *Trichomonas vaginalis* probably mediated by a mannose/N-acetyl-glucosamine binding lectin. *Int. J. Parasitol.*, 21: 941-944.
- RUBIN, R. y CORDRAY, D. R. (1958). A new approach in chemotherapeutic trials against *Trichomonas* infections. *Am. J. Vet. Res.*, 19: 249-251.
- RYLEY, J. F. y STACEY, G. T. (1963). Experimental approaches to the chemotherapy of trichomoniasis. *Parasitology*, 53: 303-320.

## S

- SAITO, H.; HATAKE, K.; DVORAK, A. M. (1988). Selective differentiation and proliferation of hematopoietic cells induced by recombinant human interleukins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2288-2292.
- SAMUELS, R. y CHUN-HOON, H. (1964). Serological investigation of trichomonads. I. Comparison of natural and immune antibodies. *J. Protozool.*, 11: 36-46.
- SAN MARTÍN, J. C. (1986). Apuntes para un nuevo tratamiento sobre herpes zóster. *Antol. Dermatol.*, XVI, 1: 24-26.
- SÁNCHEZ-VEGA, J.T.; TAY-ZAVALA, J.; RUIZ-SÁNCHEZ, D.; RUIZ-HERNÁNDEZ, A.; ROBERT-GUERRERO, L.; FERNÁNDEZ-PRESAS, A.M. y MARTÍNEZ, S. (1993). Frecuencia de la tricomoniasis y candidiasis vaginal y su relación con el cuadro clínico. *Rev. Lat. Amer. Microbiol.*, 35: 211-216.
- SANTOS, G. W. y OWEN, A. H. (1966). 19S and 7S antibody production in the cyclophosphamide

- metabolites. *Nature*, 209: 622-624.
- SARWAT, M. A. A.; AL-SHAIBY, A. L. Z. A. (1993). Parasitic infections among patients of Al Nour Specialized Hospital. *J. Egyptian Soc. of Parasitol.*, 23 (3): 821-827.
- SAXON, A.; MORROW, C. y STEVENS, R. H. (1980). Subpopulations of circulating B cells and regulatory T cells involved *in vitro* immunoglobulin E production in atopic patients with elevated serum immunoglobulin E. *J. Clin. Invest.*, 65: 1457.
- SCOTT, P. (1989). The role of Th1 and Th2 cells in the immunoregulation of experimental leishmaniasis. *Exp. Parasitol.*, 68: 369-372.
- SCOTT, P.; KAUFMANN, S. H. E. (1991). The role of T-cell subsets and cytokines in the regulation of infection. *Immunol. Today*, 12: 346-348.
- SCOTT, P. A.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R. L.; PEARCE, E. y SHER, A. (1988). Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. *J. Exp. Med.*, 168: 1675-1684.
- SCOTT, P. A. y SHER, A. (1993). Immunoparasitology. In *Fundamental Immunology. Third edition.* (W. E. Paul ed.). Raven Press, Ltd., New York, pp. 1179-1210.
- SCHARES, T.; MACHTINGER, S.; D'HARLINGUE, A. E. y MALONEY, J. R. (1982). *Trichomonas vaginalis* urinary tract infection in an infant. *Pediat. Infect. Dis.*, 1(5): 340-341.
- SCHIRIER, D.; PIZER, L. y MOORHEAD, J.W. (1983). Type-specific hypersensitivity and protective immunity induced by isolated herpes simplex virus glycoprotein. *J. Immunol.*, 1413: 130-133.
- SCHNEIDER, H.; COETZEE, D. J.; FEHLER, H. G.; BELLINGAN, A.; DANGOR, Y.; RADEBE, F.; BALLARD, R. C. (1998). Screening for sexually transmitted diseases in rural South African women. *Sex. Trans. Infect.*, 74 (Suppl. 1): S147-152.
- SCHNITZER, R. J.; KELLY, D. R.; LEIWANT, B. (1950). Experimental studies on trichomoniasis. 1. The pathogenicity of trichomonad species for mice. *J. Parasitol.*, 36: 343-349.
- SCHNITZER, R.J.; KELLY, D.R. (1953). Short persistence of *Trichomonas vaginalis* in reinfected immune mice. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 82: 404-406.
- SCHNITZER, R.J. (1963). Chemotherapy of trichomonad infection. In *Experimental Chemotherapy, vol. 1*, (Schnitzer, R. J.; Hawkin F. eds.) Academic Press, New York. pp 289-331.
- SEBEK, V. (1972). *Trichomonas pyosalpinx*. *Cesk. Gynecol.*, 37: 14-15.
- SEDER, R. A.; GAZZINELLI, R; SHER, A. y PAUL, W. E. (1993). Interleukin 12 acts directly on CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin 4 inhibition of such priming. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90: 10188-10192.
- SELLER, J. P.; JOHANNESSEN, G.; OLSEN, T.; MARUPING, S. (1990). *Neisseria gonorrhoeae*, *Trichomonas vaginalis*, and yeast reported from attenders at an antenatal clinic in a rural area in Botswana. *Genitourin. Med.*, 66 (6): 460.
- SEMPERE ORTELLS, J. M. (1996). Efectos *in vitro* de Anapsos (*Polypodium leucotomos*) sobre fenotipo celular y producción de citocinas en células mononucleares humanas. *Tesis Doctoral*. Universidad de Alicante, Alicante.



## BIBLIOGRAFÍA

---

- SHEVACH, E. M. (1985). The effects of cyclosporin A on the immune system. *Ann. Rev. Immunol.*, 3: 397-423.
- SHUTER, J.; BELL, D.; GRAHAM, D.; HOLBROOK, K. A. y BELLIN, E. Y. (1998). Rates of and risk factors for trichomoniasis among pregnant inmates in New York City. *Sex. Transm. Dis.*, 25 (6): 303-307.
- SIDHU, G. S. y OAKENFULL, D. G. (1986). A mechanism for the hypocholesterolaemic activity of saponins. *Br. J. Nutr.*, 55: 643-649.
- SIEGEL, R. M.; SCHUBERT, C. J.; MYERS, P. A. y SHAPIRO, R. A. (1995). The prevalence of sexually transmitted diseases in children and adolescents evaluated for sexual abuse in Cincinnati: Rationale for limited STD testing in prepubertal girls. *Pediatrics*, 96 (6): 1090-1094.
- SIGAL, N.H. y DUMONT, F.J. (1992). Cyclosporin A, FK-506 and rapamycin: Pharmacologic probes of lymphocyte signal transduction. *Ann. Rev. Immunol* 10: 519-560.
- SILVA FILHO, F. C. y SOUZA, W. de. (1988). The interaction of *Trichomonas vaginalis* and *Tritrichomonas foetus* with epithelial cells *in vitro*. *Cell. Struct. Funct.*, 13: 301-310.
- SILVA FILHO, M. C.; SOUZA, W. de. y LOPES, J.D. (1988). Presence of laminin-binding proteins in trichomonads and their role in adhesion. *Proc. Natl. Acad. Scid., U.S.A.*, 85: 8042-8046.
- SINGER, S. J. y NICOLSON, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*, 175: 720-731.
- SITHITHAWORN, P.; SITHITHAWORN, J.; KITJAROEN, K.; PAIROJKUL, C.; RATANANURAKPONG, S. y SRISWANGWONK, T. (1989). Comparative *in vitro* sensitivity to metronidazole of *Trichomonas vaginalis* with isolates and clones. *S. E. Asian J. Trop. Med. Public Health*, 20 (2): 279-284.
- SIVAKUMAR, K.; SILVA, A. H. DE; ROY, R.B. (1989). *Trichomonas vaginalis* infection in a lesbian. *Genitourin. Med.*, 65 (6): 399-400.
- STEINMEYER, J. y KALBHEN, D.A. (1996). The inhibitory effects of antirheumatics drugs on the activity of human leukocyte elastase and cathepsin G. *Inflamm. Res.*, 45: 324-329.
- SOGIN, M.L. (1989). Evolution of eukaryotic microorganisms and their small subunit ribosomal RNAs. *Am. Zool.*, 29: 487-489.
- SOGIN, M.L.; MORRISON, H. G.; HINKLE, G. y SIBERMAN, J.D. (1996). Ancestral relationships of the major eukaryotic lineages. *Microbiol. Sem.*, 12: 17-28.
- SOSZKA, S.; KAZANOWSKA, W. y KUCZYNSKA, K. (1962). On injury of the epithelium of the vagina caused by *Trichomonas vaginalis* in experimental animals. *Wiad. Parazitol.*, 8: 209-215.
- SOSZKA, S.; KAZANOWSKA, W. y KUCZYNSKA, K.; LOTOCKI, W. y KLIMOWICZ, L. (1973). Experimental infection of the urinary tract of guinea pigs infected *Trichomonas vaginalis*. *Wiad. Parazitol.*, 19: 447-452.
- SPECK, W. T.; STEIN, A.B. y ROSENKRANZ, H. S. (1976). Mutagenicity of metronidazole: Presence of several active metabolites in human urine. *J. Natl. Cancer Inst.*, 56: 283-284.
- SPINILLO, A.; BERNUZZI, A. M.; CEVINI, C.; GULMINETTI, R.; LUZI, S. y DE SANTOLO, A. (1997). The relationship of bacterial vaginosis, *Candida* and *Trichomonas* infection to symptomatic vaginitis in postmenopausal women attending a vaginitis clinic. *Maturitas*, 27 (3): 253-260.

- STAATS, J. (1981). Inbred and segregating inbred strains. In *The mouse in Biomedical Research*. (Foster, H. L.; Small, J. D.; Fox J. G. eds.). Academic Press. New York, pp. 177-210.
- STARZL, T. E.; FUNG, J.; JORDAN, M. (1990). Kidney transplantation under FK-506. *JAMA*, 264: 63-67.
- STITES, D. P. y TERR, A. I. (1993). *Inmunología básica y aplicada*. Ed. El manual moderno, S.A. México D.F.
- STREET, D. A.; TAYLOR-ROBINSON, D.; ACKERS, J. P.; HANNA, N. F. y McMILLAN, A. (1982). Evaluation of an enzyme-linked immunoabsorbent assay for the detection of antibody *Trichomonas vaginalis*. *Br. J. Vener. Dis.*, 58: 330-333.
- STREET, D. A.; TAYLOR-ROBINSON, D.; HETHERINGTON, C. M. (1983). Infection of female squirrel monkeys (*Saimiri sciureus*) with *Trichomonas vaginalis* as a model of trichomoniasis in women. *Br. J. Vener. Dis.*, 59: 249-253.
- SUBBAIAH, T. V. y AMIN, A. H. (1967). Effect of berberine sulfate on *Entamoeba histolytica*. *Nature*, 215: 527-528.
- SU-LIN, K. E. (1982). Antibody to *Trichomonas vaginalis* in human cervicovaginal secretion. *Infect. Immun.*, 37: 852-857.
- SUÁREZ, M.; PÉREZ, E.; PÉREZ, R.; OCHOA, E.; FRAGOSO, A.; GONZÁLEZ, L.; OCHOA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ, A.; MARTÍNEZ, R. y NOGAL, J. J. (1996). Synthesis and antiprotozoal properties of new 3,5-disubstitued-tetrahydro-2H-1,3,5-thiadiazin-2-thione derivatives. *First Int. Symp. on New Horizons of Organic Chem. Biomed.*, Santiago de Compostela, España.
- SUCHARIT, P., UTHAISCHANT, A.; CHINTANA, T.; SUPHADTANAPONGS, W.; EAMSOBHANA, P. y PRASOMSITTI, P. (1979). *In vitro* and *in vivo* studies of tinidazole in *Trichomonas vaginalis* infection. *S. E. Asian J. Trop. Med. Public Health*, 10: 556-561.
- SUERO GONZÁLEZ, J. (1987). Anapsos en Inmunología Oftalmológica. *Glosa*, 403: 36-38.
- SUSHRUTA, S. (1968). *Sushruta Sahmita*. Chikitasasthan, chap.2. 19 Stanzas 24. Chaukhamba Publications. Varanisi, India.
- T**
- TABOR, C. W. y TABOR, H. (1984). Methionine adenosyltransferase (S-adenosylmethionine synthetase) and S-adenosylmethionine decarboxylase. *Adv. Enzymol.*, 56: 251-282.
- TANAKA, T. y KANEDA, Y. (1989). Seroepidemiology of urogenital trichomoniasis in Japan. *Japanese J. Parasitol.*, 38 (5): 296-300.
- TANYUKSEL, M; GUN, H.; DOGANCI, L. (1996). Prevalence of *Trichomonas vaginalis* in prostitutes in Turkey. *Cent. Eur. J. Public. Health*, 4 (2): 96-97.
- TAYLOR-ROBINSON, D. y STREET, D.A. (1981). Metronidazole-resistant strain of *Trichomonas vaginalis*. *Lancet*, 2 (8255): 1107.
- TERAS, J. (1954). Experimental investigation of pathogenicity of *Trichomonas vaginalis* (in Russian), thesis. State Unjiversity of Tartu.
- TERAS, J. (1961). On the protective effect of the blood sera of patients with trichomoniasis of the genito-urinary tract on white mice infected intraperitoneally with cultures of *Trichomonas vaginalis*. *Izv.*

## BIBLIOGRAFÍA

---

- Akad. Nauk. Est. SSR (Biol. Ser.)* 10: 19-26.
- TERAS, J. y ROIGAS, E. (1966). Characteristic of the patho-morfological. reaction in cases of experimental infection with *Trichomonas vaginalis*. *Wiad. Parazytol.*, 12: 161-172.
- THAPAR, M. A.; PARR, E. L. y PARR, B.R. (1990). Secretory immune responses in mouse vaginal fluid after pelvic, parenteral or vaginal immunization. *Immunology*, 70: 121-125.
- THOMASON, J. L.; GELBART, S.M.; SOBUN, J.F.; SCHULIEN, M.B.; HAMILTON, P. R. (1988). Comparison of four methods to detect *Trichomonas vaginalis*. *J. Clin. Microbiol.*, 26 (9): 1869-1870.
- THOMSON, A. W.; CARROLL, P. B.; McCAULEY, J.; WOO, J.; ABU-ELMAGD, K.; STARZL, T E. y THIEL, D. H. VAN (1993). FK-506: A novel immunosuppressant for treatment of autoimmune disease. *Springer Semin. Immunopathol.*, 14: 323-344.
- THONG, K. W.; COOMBS, G. H.; SANDERSON, B. E. (1987a). S-adenosylmethionine and transmethylation reactions in trichomonads. *Parasitol. Res.*, 73: 193-198.
- THONG, K. W.; COOMBS, G. H.; SANDERSON, B. E. (1987b). L-Methionine catabolism in trichomonads. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 23: 223-231.
- TITUS, R. G.; CEREDIG, R.; CERROTTINI, J. C. y LOUIS, J. A. (1985). Therapeutic effect of anti-L3T4 monoclonal antibody GK 1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically susceptible BALB/c mice. *J. Immunol.*, 135: 2108-2114.
- TOCHER, J.H. y EDWARDS, D.I. (1994). Evidence for the direct interaction of reduced metronidazole derivatives with DNA bases. *Biochem. Pharmacol.* 48: 1089-1094.
- TOKUDA, M.; KARATA, N.; MIZOGUCHI, A. (1994). Effect of low-dose cyclosporin A on systemic lupus erythematosus disease activity. *Arthritis Rheum.*, 37: 551-558.
- TOYOS, J.M. (1974). Patogenia experimental de *Trichomonas vaginalis* Donné 1836, en el ratón (*Mus musculus*). *Tesis doctoral*. Facultad de Veterinaria de la Universidad de León.
- TRINCHIERI, G. (1989). Biology of Natural Killer cells. *Adv. Immunol.*, 47: 187-323.
- TRINCHIERI, G y PERUSSIA, B. (1985). Immune interferon: a pleiotropic lymphokine with multiple effects. *Immunol. Today*, 6: 131-136.
- TRUSSELL, R.E. (1947). *Trichomonas vaginalis* and trichomoniasis. Springfield (USA), p. 277.
- TSAI, Y. H.; PRICE, K. E. (1973). Experimental models for the evaluation of systemic trichomonocides. *Chemotherapy*, 18: 348- 357.
- TUONIMEN, M.; BOHLIN, L.; LINDBORN, L. O. y ROLFSEN, W. (1991). Enhancing effect of Calaguala on the prevention of rejection on skin transplants in mice. *Phytoth. Res.*, 5: 234-236.
- ## U
- UFAW (1976). Handbook on the care and Management of Laboratory Animals. Philadelphia.
- UHLENHUTH, P.; SHOENHERR, K. E. (1955). Untersuchungen über die Übertragungsmöglichkeiten verschiedener Trichomonadearten auf kleine Versuchstiere. *Z. Immunitätsforsch. Exper. Ther.*, 112: 48-56.

ULLOA, M.; CAMPOS, A.; BARANDA, J.; SAN JUAN, I.; VILLAR, V. DEL; MERINO, F.J.; LARUMBE, M.E.; GÓMEZ, J. (1993). Enfermedades de transmisión sexual en una subpoblación de alto riesgo de la provincia de Soria. *Enf. Infecc. Microbiol. Clín.* 11, nº6, 299-303.

URABE, S.; YOSHIDA, S.I.; MIZUGUCHI, Y. (1988). Sexually transmitted diseases among prostitutes in Fukuoka, Japan. *Japanese J. Med. Science & Biol.*, 41 (1): 15-20.

## V

VARGAS GONZÁLEZ, J.; GARCÍA, E.; GUTIÉRREZ, F. y OSORIO, C. (1981). Síntesis de ácidos nucleicos y nivel de AMP cíclico en tumores murinos después del tratamiento *in vitro* con Anapsos. *Arch. Fac. Med. XL*: 39-46.

VARGAS GONZÁLEZ, J.; GARCÍA, E.; GUTIÉRREZ, F. y OSORIO, C. (1983). Anapsos an antipsoriatic drug wich increases the proportion of supressor cells in human peripheral blood. *Ann. Immunol.*, 134: 393-400.

VARGAS GONZÁLEZ, J. y JIMÉNEZ AGUIRRE, D. (1986). Anapsos una saponina que aumenta la respuesta al virus del Herpes zóster. *Antol. Dermatol.*, 3: 11-14.

VENNERSTROM, J. L.; LOVELACE, J. K.; WALTERS, V. B.; HANSON, W. L. y KLAYMAN, D. L. (1990). Berberine derivatives as antileishmanial drugs. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 34: 918-921.

VERSHINSKY, B. V. (1957). Experiment on the infection of *Mesocricetus auratus* with *Trichomonas vaginalis* Donné 1836. *Zool. Zh.*, 36: 1774-1776.

VILLAR, R.; CALLEJA, J.M.; MORALES, C. y CÁCERES, A. (1997). Screening of 17 guatemalan medicinal plants for platelet antiagregant activity. *Phytother. Res.*, 11: 441-445.

VILLARRUBIA, V. G.; MORENO-KOCH, M. C.; CALVO, C.; GONZÁLEZ, S.; ÁLVAREZ-MON, M. (1997). The immunosenescent phenotype in mice and humans can be defined by alterations in the natural immunity reversal by immunomodulation with oral AM3. *Immunopharmacol. Immunotoxicol.*, 19 (1): 53-74.

VIÑA, J. R.; PALLARDÓ, F. V. y GARCÍA, C. (1996). Metabolic implications of gamma-cystathionase activity in mammals. In: *III Workshop on methionine metabolism: molecular mechanism and clinical implications*. (Mato, J. M. y Caballero, A. eds.). CSIC, Madrid, Spain.

VOOGD, C.E; VAN DER STEEL, J. J. y JACOBS, J.A. (1974). The mutagenic action of nitroimidazoles. Metronidazole, nimorazole, dimetridazole and ronidazole. *Mut. Res.*, 26: 483-490.

## W

WANG, A. L. y WANG, C. C. (1991). Viruses of the protozoa. *Ann. Rev. Microbiol.*, 45: 251-263.

WARTON, A. y HONIGBERG, B. M. (1983). Analysis of surface saccharides in *Trichomonas vaginalis* strains with various pathogenicity levels by fluorescein-conjugated plant lectins. *Parasitol. Res.*, 69: 149-159.

WEINBERG, J. B.; HOBBS, M. M.; MISUKONIS, M. A. (1985). Phenotypic characterization of gamma interferon-induced human monocyte polykaryons. *Blood*, 66: 1241-1246.

WELD, J. T. y KEAN, B. H. (1958). A factor in serum of human beings and animals that destroys *Trichomonas vaginalis*. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 98: 494-496.

## BIBLIOGRAFIA

---

- WHITE, E.; HART, D. y SANDERSON, B. E. (1983). Polyamines in *Trichomonas vaginalis*. *Mol. Biochem. Parasitol.*, 9: 309-318.
- WILDFEVER, A. (1974). Die Chemotherapie der vaginalen Trichomoniasis und Candidosis der Maus. *Arzneim. Forsch.*, 24: 937-943.
- WILKINSON, D.; ABDOOL KARIM, S. S.; HARRINSON, A.; LURIE, M.; COLVIN, M.; CONNOLLY, C.; STURM, A. W. (1999). Unrecognized sexually transmitted infections in rural South African women: a hidden epidemic. *Bull. World Health*, 77 (1): 22-28.
- WILKINSON, D.; NDOVELA, N.; HARRINSON, A.; LURIE, M.; CONNOLLY, C. y STURM, A. W. (1997). Family planning services in developing countries: an opportunity to treat asymptomatic and unrecognised genital tract infections? *Genitourin Med.*, 73 (6): 558-560.
- WILLIAMS, R. F. y HODGEN, G. D. (1982). The reproductive cycle in female macaques. *Am. J. Primatol.*, 1(suppl): 181-192.
- WILSON, T. E.; MINKOFF, H.; McCALLA, S.; PETTERKIN, C. y JACCARD, J. (1997). The relationship between pregnancy and sexual risk taking. *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 174 (3): 1033-1036.
- WISEMAN, C.; RAO, S. y KENNEDY, P. (1989). Low dose cyclophosphamide lowers CD8<sup>+</sup> peripheral blood lymphocytes in melanoma and other cancers. *Proc AACR*, 30: 412.
- WOS, S. M. y WATT, R. M. (1986). Immunoglobulin isotypes of anti-*Trichomonas vaginalis* antibodies in patients with vaginal trichomoniasis. *J. Clin. Microbiol.*, 24: 790-795.
- Y**
- YAEGER, R. G. (1988). Long term cryopreservation of the amastigotes stages of hemoflagellates. *J. Protozool.*, Feb, 35 (1): 114-115.
- YAHARE, I. y EDELMAN, G. M. (1972). Restriction of the mobility of lymphocyte immunoglobulin receptors by concanavalin A. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 69: 608-612.
- YANO, A.; YUI, K.; AOSAI, F.; KOJIMA, S.; KAWANA, T. y OVARY, Z. (1983). Immune response to *Trichomonas vaginalis*. Immunochemical and immunobiological analyses of *Trichomonas vaginalis* antigens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 72: 150-157.
- YAMAMOTO, M.; MASUI, T.; SUGIYAMA, K.; YOKOTA, M.; NAKAGOMI, K.; NAKAZAWA, H. (1991). Anti-inflammatory active constituents of *Aloe arborescens* Miller. *Agr. Biol. Chem.*, 55: 1627-1629.
- YAP, E. H.; HO, T. H.; CHAN, Y. C.; THONG, T. W.; NG, G. C.; HO, L. C. y SINGH, M. (1995). Serum antibodies to *Trichomonas vaginalis* in invasive cervical cancer patients. *Genitourin. Med.*, 71 (6): 402-404.
- YERELI, K.; BALCIOGLU, I. C.; DEGERLI, K.; ÖZBILGIN, A.; DALDAL, N. (1997). Incidence of *Trichomonas vaginalis* among women having vaginal discharge, in Manisa, Turkey. *J. Egypt. Soc. Parasitol.*, 27 (3): 905-911.
- YOCUM, D. E. (1996). Cyclosporine, FK-506, Rapamicin, and other immunomodulators. *Clinical Immunol. and the Rheumatologist*. 22 (1): 132-154.
- YOUNIS, N.; KHATTAB, H.; ZURAYK, H.; EL-MOUELHY, M.; AMIN, M.F.; FARAG, A.M. (1993). A community study of gynecological and related morbidities in rural Egypt. *Studies in Family Planning*,

24 (3): 175-186.

## Z

ZAREMBA, A. y SZARMACH, H. (1979). In vitro studies of the action of *Trichomonas vaginalis* on spermatozoa. *Przegląd Dermatol.*, 66 (1): 33-37.

ZHANG, Z. (1996). Epidemiology of *Trichomonas vaginalis*. A prospective study in China. *Sex. Transm. Dis.*, 23 (5): 415-424.

ZHANG, Z. F. y BEGG, C. B. (1994). Is *Trichomonas vaginalis* a cause of cervical neoplasia? Results from a combined analysis of 24 studies. *Int. J. Epidemiol.*, 23 (4): 682-690.

ZHANG, Z. F.; GRAHAM, S.; YU, S. Z.; MARSHALL, J.; ZIELEZNY, M.; CHEN Y. X.; SUN, M.; TANG, S. L.; LIAO, C. S.; XU, J. L. (1995). *Trichomonas vaginalis* and cervical cancer. A prospective study in China. *Am. Epidemiol.*, 5 (4): 325-332.

ZLOTNIK, A.; RANSOM, J.; FRANK, G., FISCHERAND, M., HOWARD, M. (1987). Interleukin 4 is a growth factor for activated thymocytes: possible role in T cell ontogeny. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84: 3856-3860.

ZMIROU, D.; TRAMONI, M.C.; EL-SAWY, A.; BERGUE, J.; GUERI, M.; AZZOPARDI, Y.; CHARREL, M. (1988). Epidemiological approach to genital infections and sexually transmitted diseases diagnosed amongst female outpatients. The physician's attitudes. *Med. et Malad. Infect.*, 18 (1): 17-23.

ZWEIMAN, B. (1984). Cortocosteroid effects on circulating lymphocyte subset levels in normal humans. *J. Clin. Immunol.*, 4: 151-155.

**ANEXO**

---

## ANEXO I

### **HIPERSENSIBILIDAD DE TIPO IV (O RETARDADA).**

En términos generales, y según la clasificación de Coombs y Gell, la hipersensibilidad de tipo IV incluye aquellas reacciones que tardan en desarrollarse más de 12 horas tras una estimulación antigénica apropiada, implicando mecanismos más propios de la inmunidad celular que de la humoral. Aquí se incluyen todas aquellas reacciones mediadas por células capaces de generar daños tisulares, lo que supone la incorporación de los mecanismos inmunopatológicos provocados por las células T citotóxicas.

Son reacciones inflamatorias complejas, en las que de entrada intervienen macrófagos y fibroblastos, para posteriormente enfrentarse a un antígeno, requiriendo la participación de linfocitos T sensibilizados que dañan los tejidos del hospedador. Fundamentalmente, esta reacción se inicia por las citocinas de los linfocitos Th1 que atraen y activan macrófagos, células NK, linfocitos citotóxicos y neutrófilos.

A diferencia de otras formas de hipersensibilidad, la de tipo IV no puede transferirse de un animal a otro mediante el suero, pero sí por las células T (células Th1 en los ratones). Obviamente, está asociada con la inmunidad protectora mediada por células T, aunque no siempre hay una correlación completa entre hipersensibilidad retardada e inmunidad protectora. En otras ocasiones, los mecanismos implicados provocan daños tisulares debidos a efectos secundarios indeseables que surgen a raíz de la acción antimicrobiana, o bien de derivados de su acción frente a antígenos no microbianos, p. e. alérgenos.

Los tipos más comunes de hipersensibilidad retardada son por contacto, tuberculínica y granulomatosa.

La hipersensibilidad granulomatosa se produce, habitualmente, a consecuencia de la presencia de un microorganismo u otras partículas, que la célula es incapaz de destruir. En ocasiones puede estar causada por la continua presencia de inmunocomplejos.

Los granulomas están formados por la agregación y proliferación de macrófagos y pueden persistir durante semanas. Esta reacción es, por sus consecuencias clínicas, la más grave de todas las respuestas de hipersensibilidad retardada. La complicación para identificar el tipo de respuesta de hipersensibilidad se acrecienta cuando los diferentes tipos de reacción se solapan o bien ocurren secuencialmente tras un solo estímulo antigénico.

Asimismo, la interpretación funcional sobre la regulación de la respuesta inmunitaria nos obliga a pensar que la supervivencia del parásito requiere la reducción de la inmunidad mediada por células del hospedador.



Mecanismo general de las reacciones de hipersensibilidad retardada (DTH):

a) *Fase de sensibilización*: Reconocimiento del antígeno extraño, su presentación a células T vírgenes (que no han entrado en contacto con el antígeno) y la posterior activación clonal de las mismas. En los ganglios linfáticos, los linfocitos Th1 se activan, se expanden clonalmente y dan lugar a una población memoria, ya sensibilizada frente al antígeno.

b) *Fase de provocación*: En la que el segundo contacto con el antígeno desencadena una respuesta DTH completa, con tres etapas diferenciadas:

- Etapas de activación: La presentación del antígeno y la producción de otras citocinas coestimuladoras por parte de las células presentadoras de antígeno (APCs) como la IL-1 activan los linfocitos Th1 CD4 que, una vez activados, comienzan la producción de citocinas para el desarrollo de la fase efectora.

- IL-2, de acción autocrina y paracrina. Es la clave en los procesos de activación del linfocito T y necesaria para la síntesis del IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  y linfotóxina.
- IFN- $\gamma$ , mediador de la respuesta DTH, siendo sus efectos principales la activación de macrófagos y el aumento en la expresión de moléculas de clase II sobre APCs: macrófagos y células endoteliales fundamentalmente.
- TNF- $\beta$  o linfotóxina (LT). Aumenta la capacidad de las células endoteliales para reclutar y activar leucocitos.

- Etapas efectoras que se subdivide en:

- a. Desarrollo de una reacción inflamatoria localizada mediante la regulación de las células endoteliales vasculares del proceso inflamatorio.
  - a.1.) Producción de prostaciclina ( $\text{PGI}_2$ ), NO y quimiocinas (IL-8) que actúan como factores quimioatrayentes que favorecen la extravasación leucocitaria.
  - a.2.) Por otro lado, TNF- $\alpha$ , inducen la expresión secuencialmente de moléculas de adhesión como E-selectina (adhesión temprana de neutrófilos) y VCAM-1 e ICAM-1, que permiten el posterior reclutamiento de monocitos y linfocitos T hacia el lugar inflamatorio .
- b. Fase de resolución, en la que los macrófagos, últimas células efectoras en las reacciones DTH, activadas por IFN- $\gamma$  que elimina el antígeno desencadenante de todo el proceso. Al tiempo que se liberan mediadores inflamatorios (PAF) y otras citocinas IL-1, TNF- $\alpha$ .

Desde el punto de vista parasitológico, esta hipersensibilidad es la responsable de las patologías hepáticas en la esquistosomosis, los granulomas producidos por las larvas migratorias, las inflamaciones de la leishmaniosis, algunas lesiones producidas por ectoparásitos, y probablemente parte de las lesiones cardíacas de la enfermedad de Chagas.

## ANEXO II

Las **citocinas** según su origen y sus efectos sobre las células diana (Abbas *et al.*, 1995), se clasifican como: factores de crecimiento hematopoyético, interferones, linfocinas, monocinas y quimiocinas.

### Factores de crecimiento hematopoyético

NOMBRE	EFECTOS
<b>Factores estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)</b>	-Favorece la producción, maduración y diferenciación de precursores neutrófilos. -Aumenta la actividad de neutrófilos maduros.
<b>Factor estimulante de granulocitos macrófagos (GM-CSF)</b>	-Favorece el crecimiento y diferenciación de células progenitoras multipotenciales. -Actúa sobre la diferenciación de granulocitos y fagocitos mononucleares.
<b>Factor estimulante de colonias de monocitos macrófagos (M-CSF)</b>	-Favorece la producción y diferenciación de monocitos.

### Interferones

NOMBRE	FUENTE CELULAR	EFECTO
<b>Interferón-<math>\alpha</math> (IFN-<math>\alpha</math>)</b>	Monocitos/macrófagos Linfocitos B Células NK	-Inhiben la replicación viral, ya que favorecen la síntesis de proteínas que inhiben la replicación de ADN o ARN viral. -Inhiben la proliferación celular.
<b>Interferón-<math>\beta</math> (IFN-<math>\beta</math>)</b>	Fibroblastos	-Activan a las células NK.
<b>Interferón-<math>\gamma</math> (IFN-<math>\gamma</math>)</b>	Linfocitos T Células NK	-Es el principal activador de macrófagos, a partir de linfocitos T, favoreciendo la formación de radicales libres. -Aumenta la expresión de moléculas de clase I y II del CMH. -Favorece la diferenciación de linfocitos T y B. Activador de la generación de especies reactivas de oxígeno en neutrófilos. -Estimula la actividad citolítica de células NK. -Activa las células endoteliales para la expresión de moléculas de adhesión.

## Linfocinas

Nombre	Fuente celular	Efectos
<b>Interleucina-2 (IL-2)</b>	Linfocitos T activados	-Factor de proliferación autocrino y paracrino de linfocitos T. -Factor de proliferación de linfocitos B. Favorece la secreción de anticuerpos. -Aumenta la actividad citolítica de las células NK.
<b>Interleucina-3 (IL-3)</b>	Linfocitos T Células cebadas	-Estimula la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas en la médula ósea. -Promueve la proliferación y desarrollo de células cebadas.
<b>Interleucina-4 (IL-4)</b>	Linfocitos T Células cebadas Basófilos Macrófagos	-Factor de proliferación y diferenciación de linfocitos B. Favorece la secreción de anticuerpos IgE. -Induce la diferenciación de linfocitos. -Activa la célula endotelial para la expresión de moléculas de adhesión específicas para linfocitos, monocitos y eosinófilos. -Factor de proliferación de mastocitos. -Inhibe la activación de macrófagos.
<b>Interleucina-5 (IL-5)</b>	Linfocitos Th Células cebadas Eosinófilos	-Estimula la proliferación y activa las funciones de los eosinófilos. -Favorece la diferenciación de linfocitos B.
<b>Interleucina-6 (IL-6)</b>	Linfocitos T Monocitos/macrófagos Células endoteliales Fibroblastos	-Efectos sistémicos: Estimula la producción de proteínas de fase aguda en hepatocitos. Actúa como pirógeno endógeno. Favorece la proliferación de células madre hematopoyéticas. -Efectos locales: Factor de crecimiento y diferenciación de linfocitos B y T.
<b>Interleucina-9 (IL-9)</b>	Linfocitos T	-Incrementa la actividad de células cebadas.

Nombre	Fuente celular	Efectos
<b>Interleucina-10 (IL-10)</b>	Linfocitos Th Macrófagos Linfocitos B	-Inhibe la activación de linfocitos T mediada por macrófagos, ya que disminuye la expresión de moléculas de clase II del CMH y la secreción de citocinas en estos macrófagos. -Favorece la proliferación y secreción de anticuerpos en linfocitos B.
<b>Interleucina-13 (IL-13)</b>	Linfocitos T	-Inhibe la producción de citocinas en monocitos/macrófagos. -Estimula el crecimiento y diferenciación de linfocitos B, así como la secreción de IgE.
<b>Interleucinas-14 (IL-14)</b>	Linfocitos T	-Favorece la proliferación de linfocitos B activados.
<b>Linfotoxina</b>	Linfocitos T	-Activador de neutrófilos. -Activador de células endoteliales para la expresión de moléculas de adhesión y secreción de citocinas.

### Monocinas

	Efectos de interleucina-1 (IL-1)	
Efectos locales	-Sobre células endoteliales  -Sobre linfocitos	-Favorece la expresión de moléculas de adhesión específicas para neutrófilos y monocitos.  -Favorece la proliferación y activación de linfocitos B y T. -Induce la expresión del receptor para IL-2. -Induce la expresión génica de linfocinas.
Efectos sistémicos	-Sobre el hipotálamo  -Sobre el hígado  -Sobre la médula ósea  -Sobre el metabolismo	-Produce fiebre mediada por la generación de PGE <sub>2</sub> . -Incremento en la secreción de ACTH por parte de la hipófisis produciendo tanto la liberación de glucocorticoides endógenos. -Inducción de la síntesis de proteínas de fase aguda. -Estimulación en la producción de factores de crecimiento hematopoyético, favoreciendo la leucocitosis. -Caquexia.

## Monocinas

	<b>Efectos del TNF-<math>\alpha</math></b>	
Efectos locales	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sobre células endoteliales</li> <li>-Sobre leucocitos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Induce la expresión de moléculas de adhesión.</li> <li>-Activa a monocitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos para combatir microorganismos.</li> <li>-Induce la producción de citocinas en monocitos/macrófagos (IL-1, IL-6, quimiocinas y el propio TNF-<math>\alpha</math>).</li> <li>-Potencia la lisis mediada por Tc, al aumentar la expresión de moléculas de clase I.</li> </ul>
Efectos sistémicos	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Sobre el hipotálamo</li> <li>-Sobre el hígado</li> <li>-Sobre la médula ósea</li> <li>-Sobre la coagulación</li> <li>-Sobre el metabolismo</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Fiebre dependiente de PGE<sub>2</sub>.</li> <li>-Induce la síntesis de proteínas de fase aguda.</li> <li>-Inhibe la división de la célula madre de la médula ósea.</li> <li>-Activa el sistema de coagulación.</li> <li>-Produce caquexia por inhibir la liberación de ácidos grasos de las lipoproteínas, y alterar el catabolismo de proteínas en músculo.</li> </ul>

<b>Nombre</b>	<b>Fuente celular</b>	<b>Efectos</b>
Interleucina-12 (IL-12)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Monocitos/Macrófagos</li> <li>Linfocitos T</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Es el más potente activador de las células NK para la secreción de IFN-<math>\gamma</math>. Además favorece su crecimiento y actividad citolítica.</li> <li>-Incrementa la actividad citolítica de linfocitos Tc y macrófagos.</li> <li>-Actúa sinérgicamente con otras citocinas favoreciendo la proliferación de células hematopoyéticas.</li> <li>-Favorece la diferenciación de linfocitos Th.</li> <li>Inhibe la secreción de IgE en linfocitos B.</li> </ul>
Interleucina-15 (IL-15)	<ul style="list-style-type: none"> <li>Monocitos</li> <li>Linfocitos T</li> <li>Células del estroma de la médula ósea</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Estimula la proliferación de linfocitos T, con actividad similar a la de la IL-12.</li> </ul>

## Quimiocinas

Nombre	Fuente celular	Efectos
<b>Interleucina-8 (IL-8)</b>	Monocitos/macrófagos Linfocitos T Neutrófilos Células endoteliales Fibroblastos,...	-Factor quimiotáctico para neutrófilos, linfocitos T y basófilos. -Activa los neutrófilos para la liberación de enzimas lisosomales y la generación de especies reactivas de oxígeno y LTB <sub>4</sub> . -Favorece la adhesión de neutrófilos y monocitos a la célula endotelial.
<b>Proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1)</b>	Monocitos/macrófagos Fibroblastos Linfocitos B Células endoteliales	-Factor quimiotáctico de monocitos. -Estimula la liberación de histamina por basófilos. -Regula la producción de citocinas por monocitos.
<b>RANTES</b>	Linfocitos T Plaquetas	-Factor quimiotáctico de monocitos, linfocitos T, eosinófilos y basófilos. -Estimula la liberación de histamina por basófilos.

Presidente:

Dr. Alcala Rodriguez

Vocales:

Dr. Rodriguez Cacho

Dr. Ochoa de Oca

Dr. Ayala de la Puente

Secretario:

Dr. Escario de Trempo

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal que al

margen se expresa, para juzgar esta tesis doctoral,

acordó por Unanidad calificarla

de Sobresaliente "Cum Laude"

Madrid, 21 de Febrero de 1900

El Secretario del Tribunal

