



ABRIR EXPERIENCIA Y RESULTADOS

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.

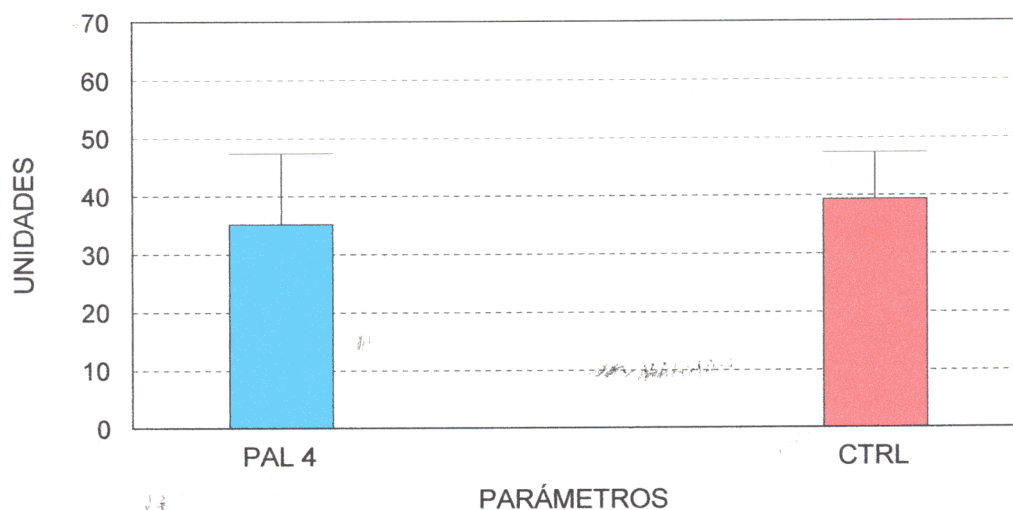
Una vez seleccionada la dosis de 20 mg/Kg/día, se pasa a comprobar su efecto en ratones BALB/c, incluyendo un lote adicional que recibe dosis de 40 mg/Kg/día en el mismo periodo de tratamiento.

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

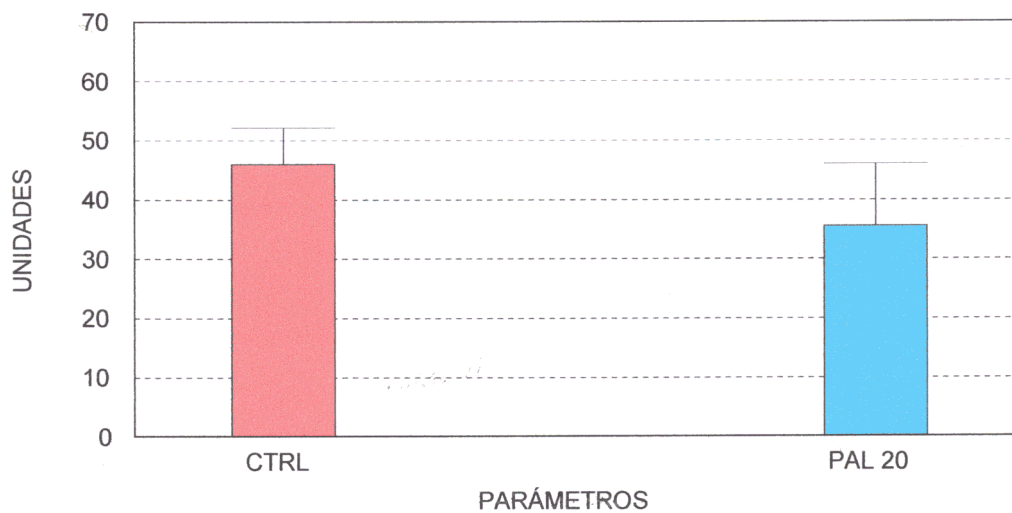
PAL 4		M.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	14	2	8	12	8	6	50
	2	6	2	8	12	8	12	48
	3	6	2	6	12	8	10	44
	4	6	2	6	12	8	10	44
	5	0	4	6	12	10	12	44
	6	0	0	4	6	6	4	20
	7	0	0	4	10	6	2	22
	8	0	0	6	10	8	6	30
	9	0	0	4	6	4	4	18
	10	0	0	8	12	6	6	32
MEDIA		3,20	1,20	6,00	10,40	7,20	7,20	35,20
D.E.		4,73	1,40	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	2	50
	2	26	4	10	2	0	46
	3	14	2	10	12	8	54
	4	14	6	6	4	2	34
	5	14	6	10	12	6	52
	6	14	4	8	12	6	48
	7	6	0	10	12	8	44
	8	0	2	10	12	8	40
	9	0	4	10	12	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	32
	2	14	4	10	10	6	48
	3	14	2	10	10	6	44
	4	14	4	10	12	6	48
	5	6	4	10	12	6	46
	6	0	2	4	8	8	28
	7	0	0	4	6	6	20
	8	0	0	10	10	8	36
	9	0	0	6	10	8	30
	10	0	0	10	6	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)	-

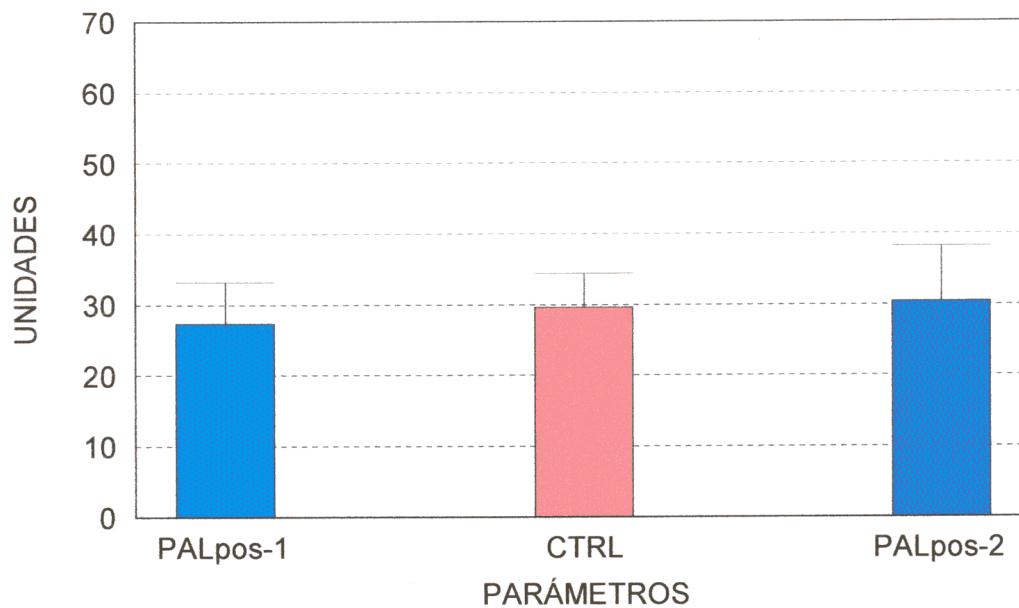
TABLA 4.60. Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de PAL (20 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *t. vaginalis*.

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).

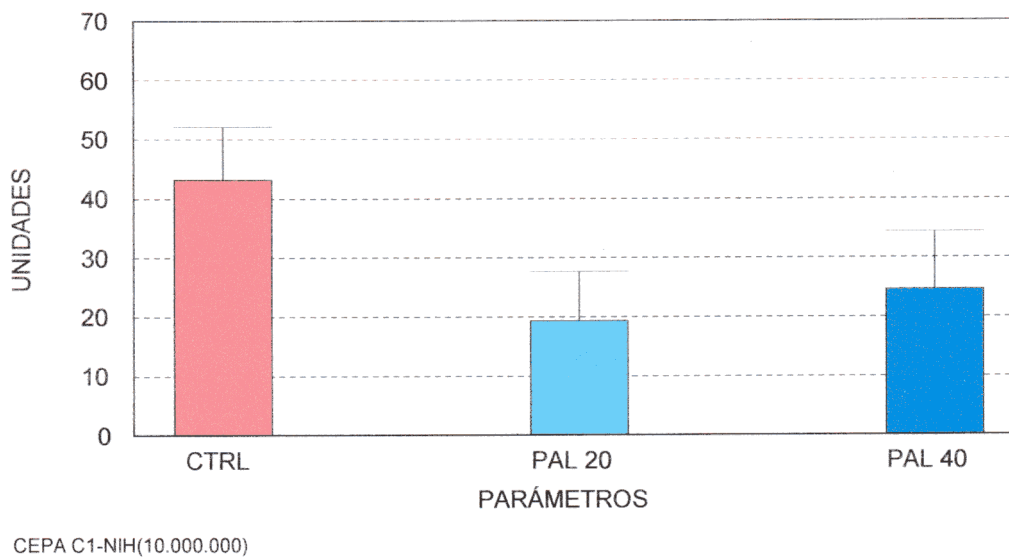


TABLA 4.63. Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de PAL (20 mg/Kg/día) Y PAL (40 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis* (RATÓN BALB/c).

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	PALpre 20	PALpre 40
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 43,20 $\pm$ 8,95	-		
PALpre 20 19,40 $\pm$ 8,22	4,0 (p<0,01)	-	
PALpre 40 24,60 $\pm$ 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- γ). 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	
$\bar{x} \pm D.E.$	CONTROL	CICLOFOSFAMIDA
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*.

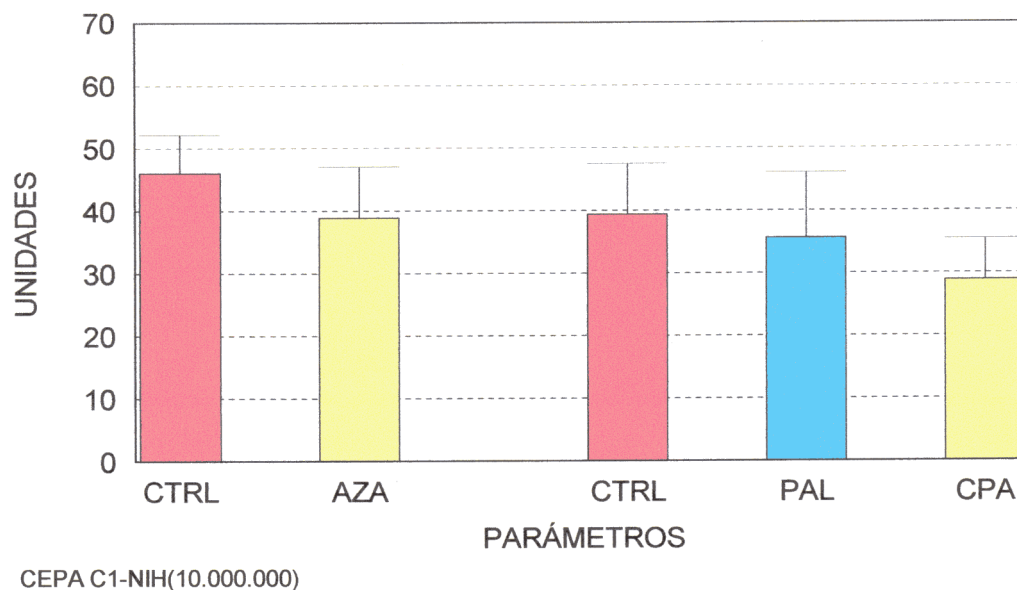


TABLA 4.67. Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de AZA y CPA (100 mg/Kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
$\bar{x} \pm D.E.$	CONTROL	AZATIOPRINA	PALpre 20
CONTROL 46,00 $\pm$ 6,16	-		
AZATIOPRINA 38,83 $\pm$ 8,15	33,5 (p>0,05)	-	
PALpre 20 mg/Kg 35,60 $\pm$ 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

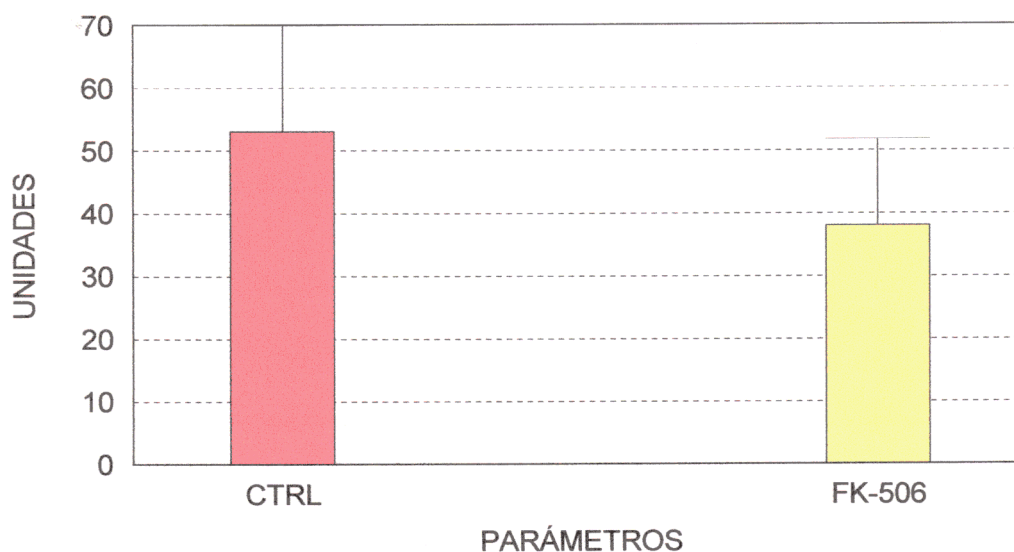
GRÁFICO 4.34. Índice de patogenia del lote experimental FK-506 (10 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis* (Ratón BALB/c).

TABLA 4.69. Sinopsis del índice de patogenicidad y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de FK-506 (10 mg/kg/día) en el modelo de patogenicidad experimental de *T. vaginalis* (RATONES BALB/c).

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY	
	CONTROL	FK-506
$\bar{x} \pm D.E.$		
CONTROL 53,14 $\pm$ 16,80	-	
FK-506 38,00 $\pm$ 13,82	9,0 (p<0,05)	-

4.5.1.2.2. Inmunoestimulantes: Inmunoferrón 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 inmunoferrón y timoestimulina.

Así, se ha observado que los ratones NMRI infectados por *T. vaginalis* y tratados con inmunoferrón 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 inmunoferrón $-53,80 \pm 6,82$ - 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.

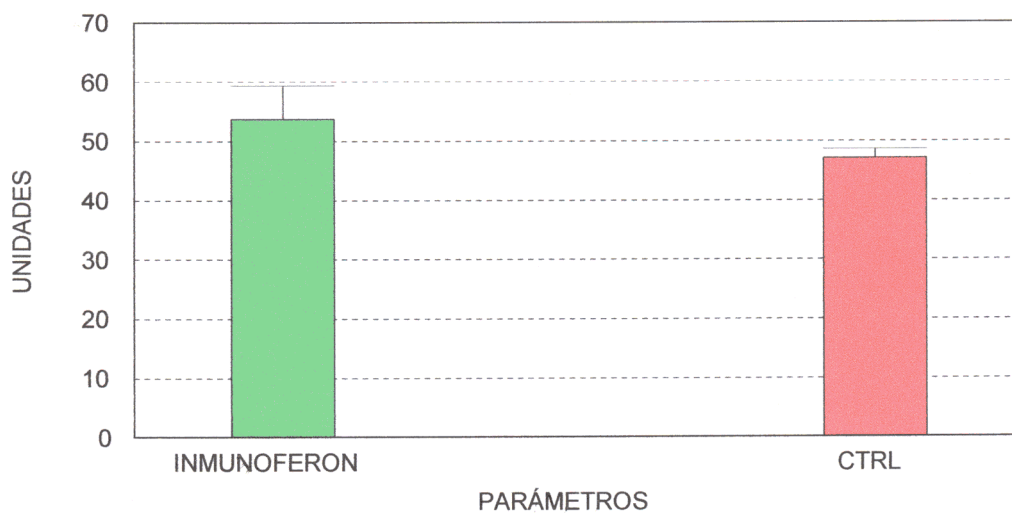
Los I. P. de los grupos CTRL $-43,60 \pm 5,79$ - y TP-1 $-47,75 \pm 4,20$ - no presentan diferencias significativas. Sin embargo, el grupo PAL $-34,60 \pm 3,65$ - difiere significativamente de los I. P. de los grupos anteriores.

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 inmuferón (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
Inmuferón		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 Inmuferón (1,30 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis*.

CEPA C1-NIH(10.000.000/ratón)

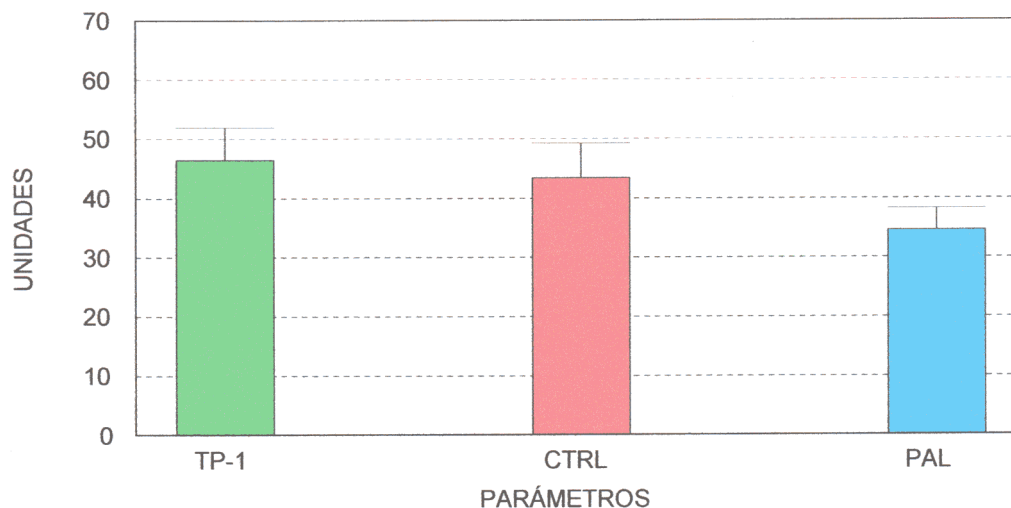
TABLA 4.71. Sinopsis del índice de patogenicidad y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de inmunoferrón (1,30 mg/kg/día) en el modelo de patogenicidad experimental de *T. vaginalis*.

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	L.A.	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	L.A.	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	L.A.	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)

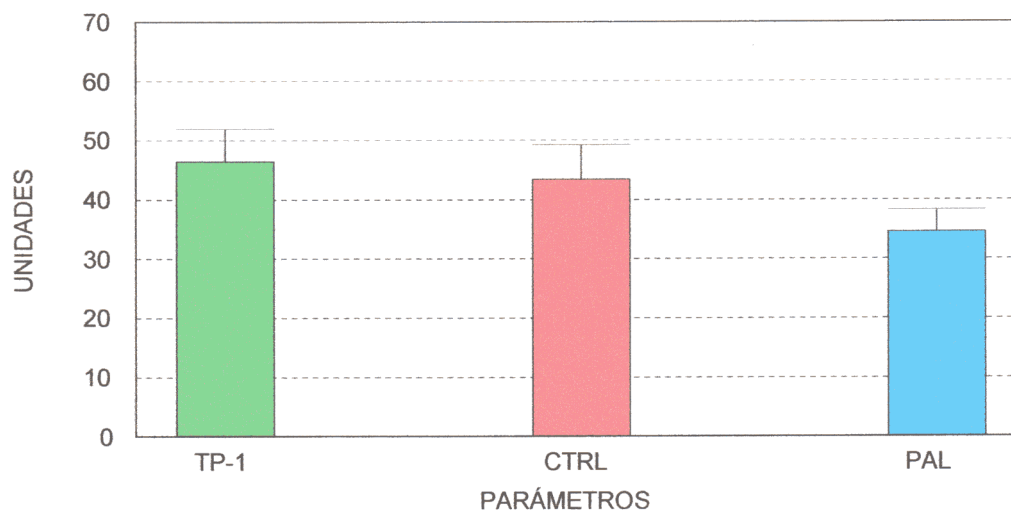
TABLA 4.73. Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de timoestimulina (24 mg/kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
$\bar{x} \pm D.E.$	CONTROL	TP-1	PALpre
CONTROL 43,40 $\pm$ 5,82	-		
TP-1 46,44 $\pm$ 5,55	26,5 (p>0,05)	-	
PALpre (20 mg/Kg) 34,60 $\pm$ 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.	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
TP-1		M	L.A.	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.	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

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*.

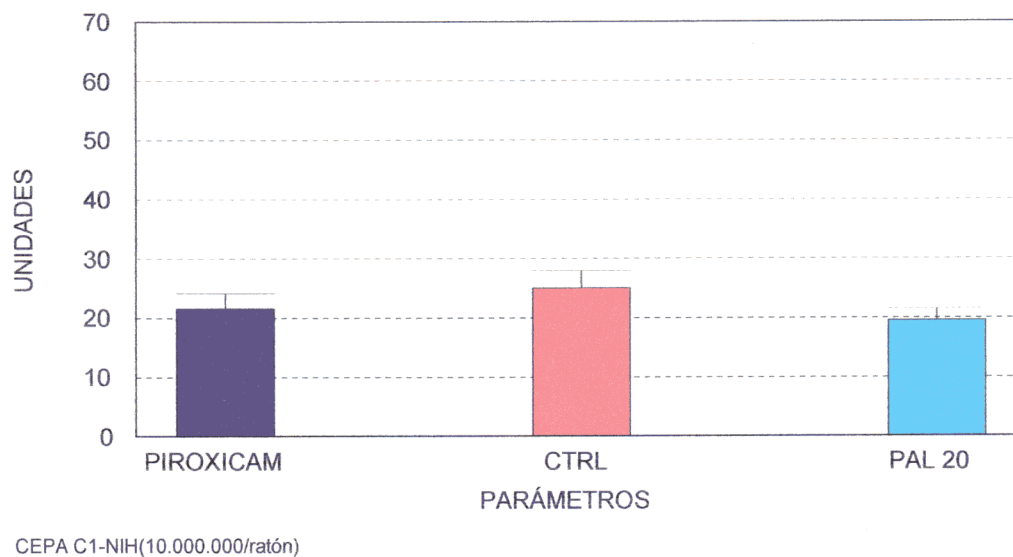


TABLA 4.77. Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de piroxicam (10 mg/kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	PIROXICAM	PALpre
$\bar{x} \pm D.E.$			
CONTROL 25,11 $\pm$ 2,85	-		
PIROXICAM 21,60 $\pm$ 2,63	15,0 (p<0,05)	-	
PALpre 20 19,56 $\pm$ 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).

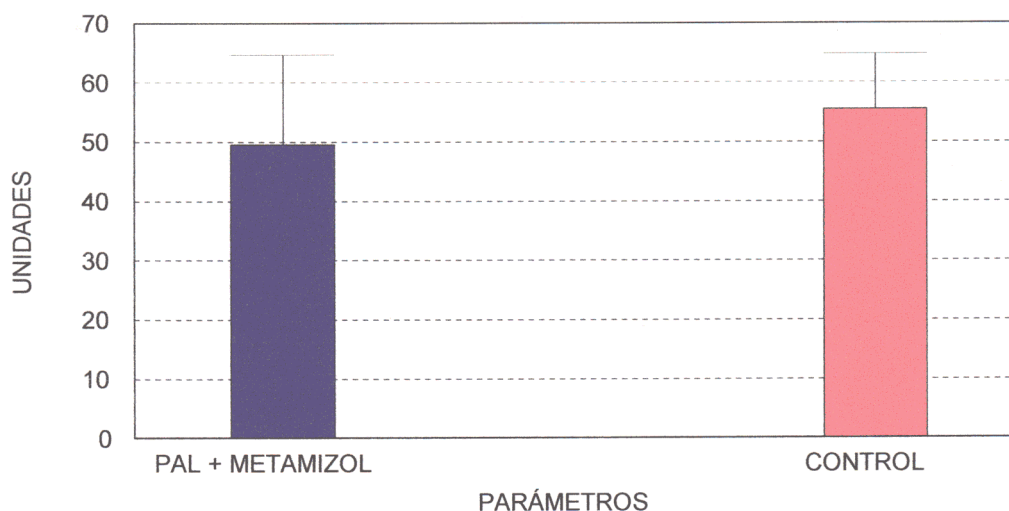


TABLA 4.79. Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de PALpre + METAMIZOL (274,87 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

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*.

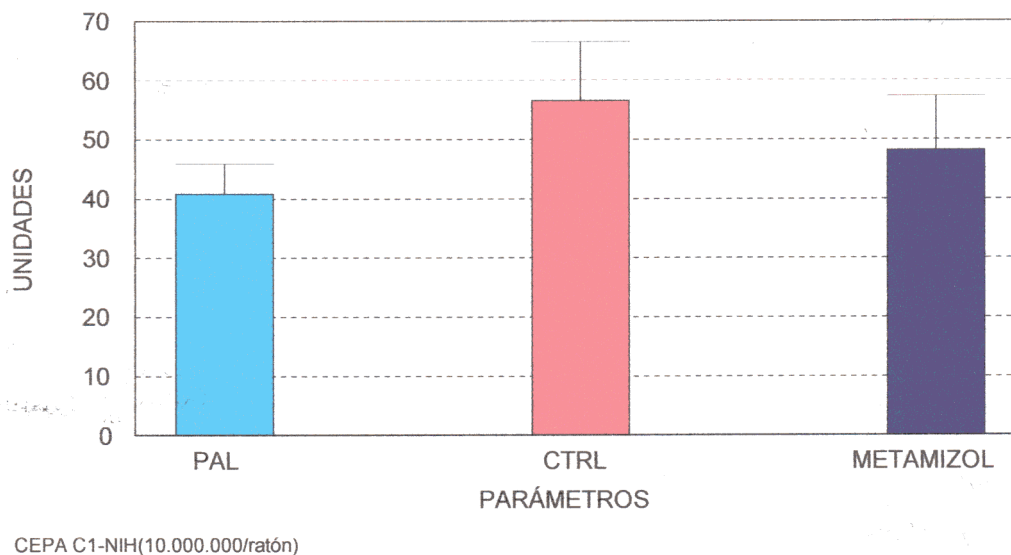


TABLA 4.81. Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de metamizol (274,98 mg/Kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY		
	CONTROL	METAMIZOL	PALpre 20
CONTROL 56,80 ± 9,67	-		
METAMIZOL 48,22 ± 9,13	18,5 (p<0,05)	-	
PALpre 20 40,80 ± 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.

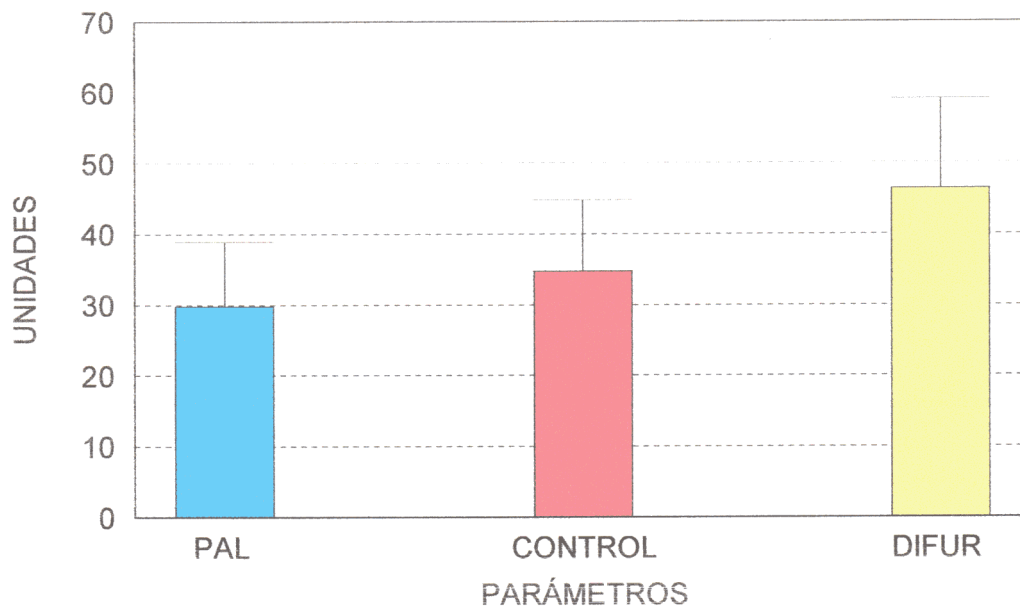
Por su parte, en el lote tratado con la concentración inferior (200 mg/Kg/día) manteniendo la pauta de 3 días, no se registran muertes achacables al tratamiento con el adyuvante (SPN2).

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.	L.A.	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.	L.A.	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.	L.A.	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*.



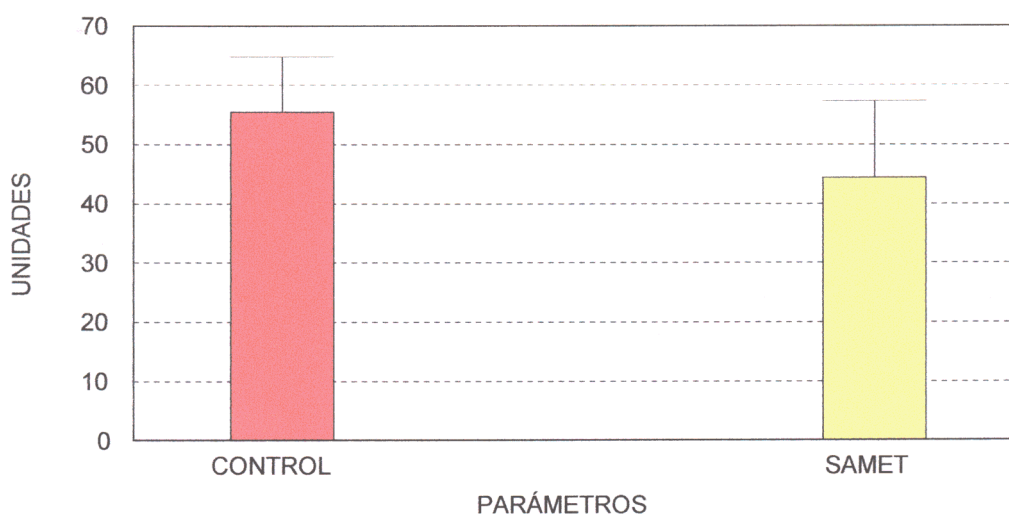
CEPA C1-NIH(10.000.000/ratón)

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.	L.A.	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.	L.A.	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.	L.A.	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	

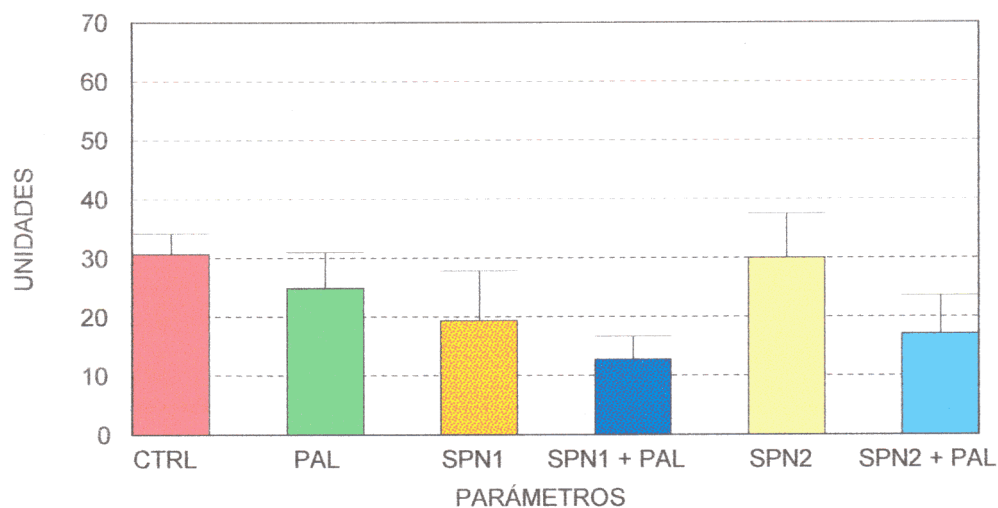
TABLA 4.87. Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de timoestimulina (24 mg/Kg/día) y PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

ÍNDICE DE PATOGENIA	U MANN-WHITNEY			
$\bar{x} \pm D.E.$	CONTROL	PALpre 20	SAPONINA (SPN1)	SPN1+PALpre
CONTROL 30,67 $\pm$ 3,46	-			
PALpre 20 24,89 $\pm$ 6,09	11,5 (p<0,01)	-		
SPN1 19,43 $\pm$ 8,46	5,5 (p<0,01)	22,5 (p>0,05)	-	
SPN1+PALpre 12,80 $\pm$ 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		
$\bar{x} \pm D.E.$	CONTROL	SPN2	SPN2 + PALpre
CONTROL 31,11 $\pm$ 4,26	-		
SPN2 30,00 $\pm$ 7,48	38,5 (p>0,05)	-	
SPN2 + PALpre 17,11 $\pm$ 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 una 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.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	-	-	-	-	-	-
	2	0	0	8	6	8	28
	3	0	0	6	10	2	24
	4	0	0	8	8	4	28
	5	0	0	10	6	6	30
	6	0	0	10	8	6	32
	7	0	0	10	10	4	32
	8	0	0	10	10	6	34
	9	0	0	6	10	4	26
	10	0	0	8	10	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.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	0	0	10	8	6	32
	2	0	0	6	6	4	18
	3	0	0	8	8	8	32
	4	0	0	6	4	0	10
	5	0	0	8	12	6	26
	6	0	0	4	8	8	24
	7	0	0	10	8	2	28
	8	0	0	4	12	2	20
	9	0	0	4	4	2	12
	10	0	0	10	8	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.	L.A.	P.	B./P./E.	H(V).	H(D).	I.P.
RATÓN	1	0	0	4	4	2	12
	2	0	0	6	6	4	18
	3	0	0	8	6	6	24
	4	0	0	8	6	6	26
	5	0	0	8	6	2	18
	6	0	0	0	0	4	6
	7	0	0	4	4	4	16
	8	0	0	6	4	4	18
	9	0	0	8	4	2	16
	10	0	0	6	6	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.	L.A.	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.	L.A.	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.	L.A.	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*.

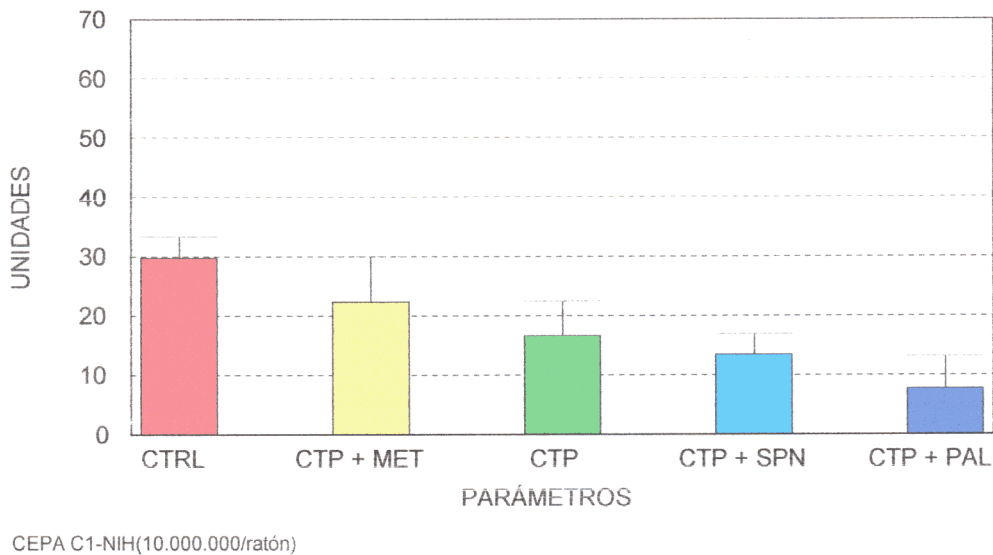


GRÁFICO 4.46. Índice de patogenia de los lotes experimentales CTP, CTP + PAL (20 mg/Kg/día) en el modelo experimental de *T. vaginalis* (RATÓN: BALB/c).

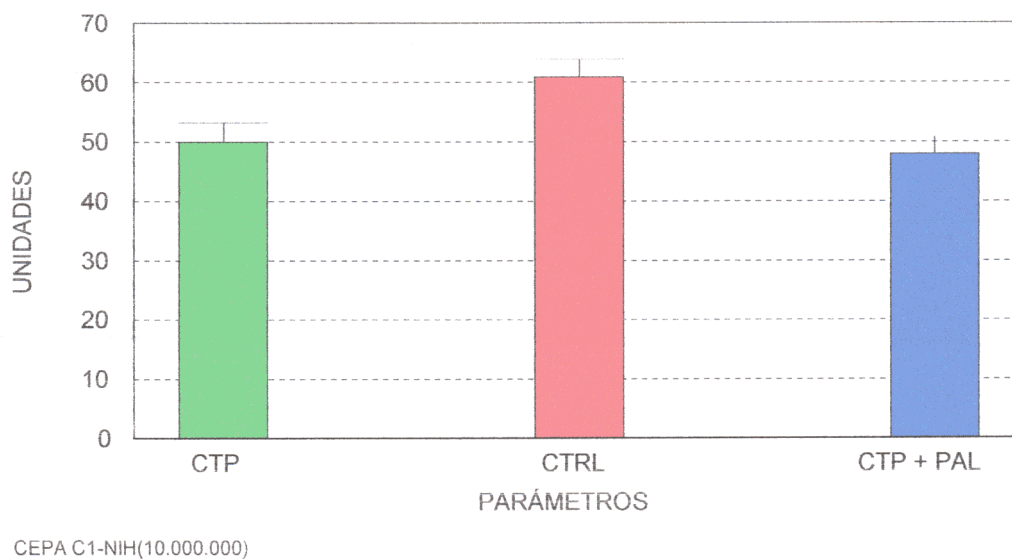


TABLA 4.94. Sinopsis del índice de patogenia y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de CTP (20 mg/Kg/día), CTP+MET (274,98 mg/Kg/día) en el modelo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

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 patogenicidad y significación estadística para el ensayo de inmunomodulación de CTP (20 mg/Kg/día), CTP + PAL (20 mg/Kg/día) En el modelo de patogenicidad 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- γ) 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- γ . 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 (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃) 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_p-DO_i) obtenida de 7 determinaciones independientes por duplicado, según se define en la propia tabla.

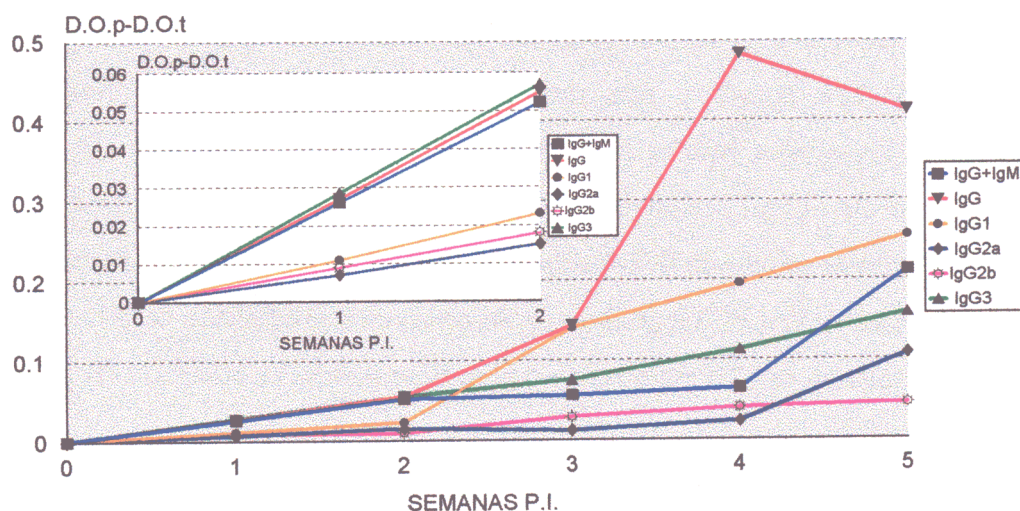
Más adelante, la Gráfica 4.47. recoge la evolución temporal de las subclases de IgG a lo largo de 5 semanas, aún cuando, el tramo crítico de mayor interés se limita al periodo de observación de las lesiones y la mortalidad (2 semanas), recogido en un recuadro ampliado en la misma.

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).

DO _p - DO _t ^a	SEMANAS P.I. ^c				
	1 ^b	2 ^b	3 ^b	4 ^b	5 ^b
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 ₁	0,011 ± 0,005	0,023 ± 0,003	0,140 ± 0,056	0,195 ± 0,065	0,255 ± 0,050
Ig G _{2a}	0,007 ± 0,003	0,015 ± 0,009	0,012 ± 0,004	0,023 ± 0,010	0,107 ± 0,043
Ig G _{2b}	0,009 ± 0,004	0,010 ± 0,004	0,029 ± 0,018	0,040 ± 0,010	0,045 ± 0,017
Ig G ₃	0,028 ± 0,009	0,055 ± 0,013	0,075 ± 0,020	0,112 ± 0,035	0,158 ± 0,036

- a. DO_p: Diferencia entre la densidad óptica del suero problema (procedente de ratones infectados con *T. vaginalis*) frente a antígeno y la seroalbúmina bovina (BSA).
DO_t: 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 (DO_p-DO_t) 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- γ) 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- γ (IFN- γ) e interleucina-4 (IL-4).

Si de una parte, IFN- γ 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- γ 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- γ respecto al CONTROL establecido. Asimismo, el tratamiento sinérgico de PAL+CTP produce un descenso en la producción de IFN- γ 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- γ 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- γ en ratones BALB/c infectados intraperitonealmente por *T. vaginalis* (GRUPO CONTROL).

DÍAS POSTINFECCIÓN	D.O. 1	D.O. 2	D.O. $\bar{x}$	IFN- γ (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 ($\lambda = 450$ nm) y la concentración de IFN- γ calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IFN- γ recombinante.

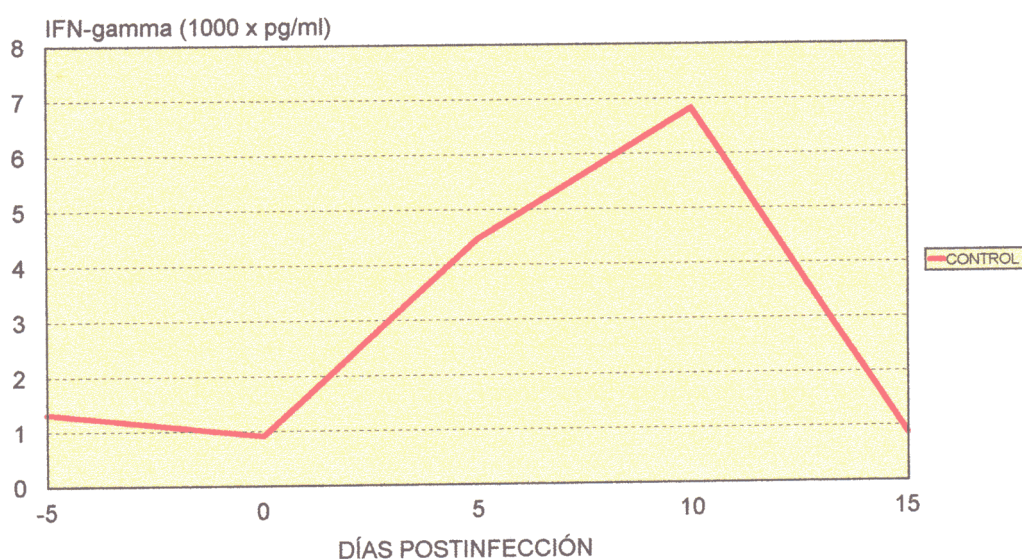
GRÁFICA 4.48. Evolución de la concentración de interferón- γ en el curso de la infección intraperitoneal de ratones BALB/c con *T. vaginalis* sin tratamiento (grupo control).

TABLA 4.99. Dinámica de la concentración sérica de IFN- γ 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- γ (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- γ calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IFN- γ recombinante.

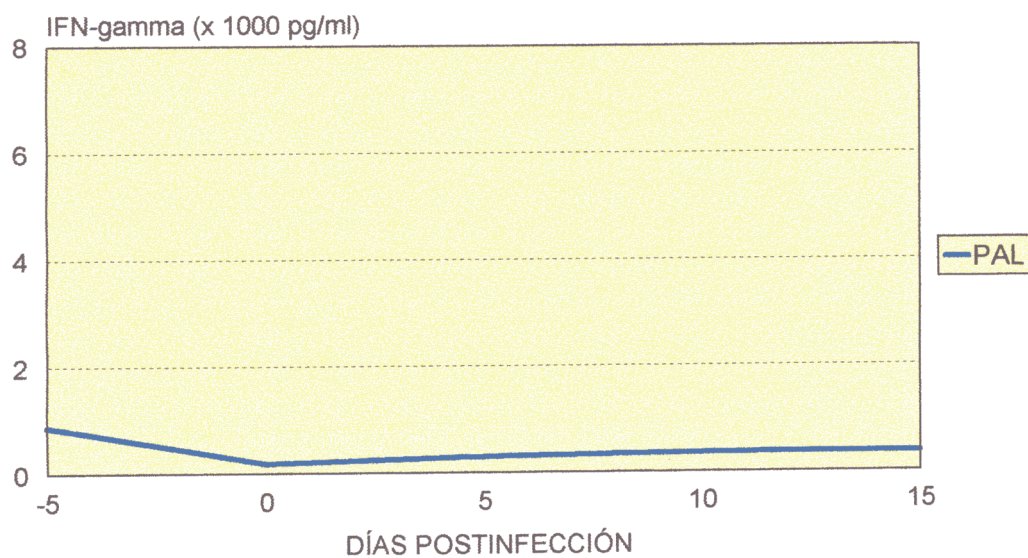
GRÁFICA 4.49. Evolución de la concentración de IFN- γ en el curso de la infección intraperitoneal con *T. vaginalis* tras el tratamiento con PAL (días -10 a 0 p.i.).

TABLA 4.100. Dinámica de la concentración sérica de IFN- γ 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- γ (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 ($\lambda = 450$ nm) y la concentración de IFN- γ calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IFN- γ recombinante.

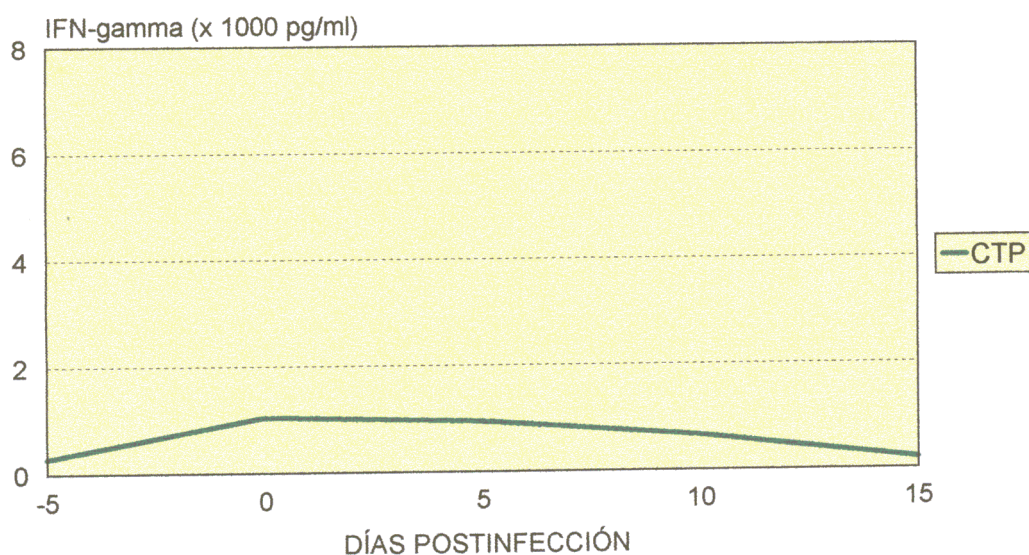
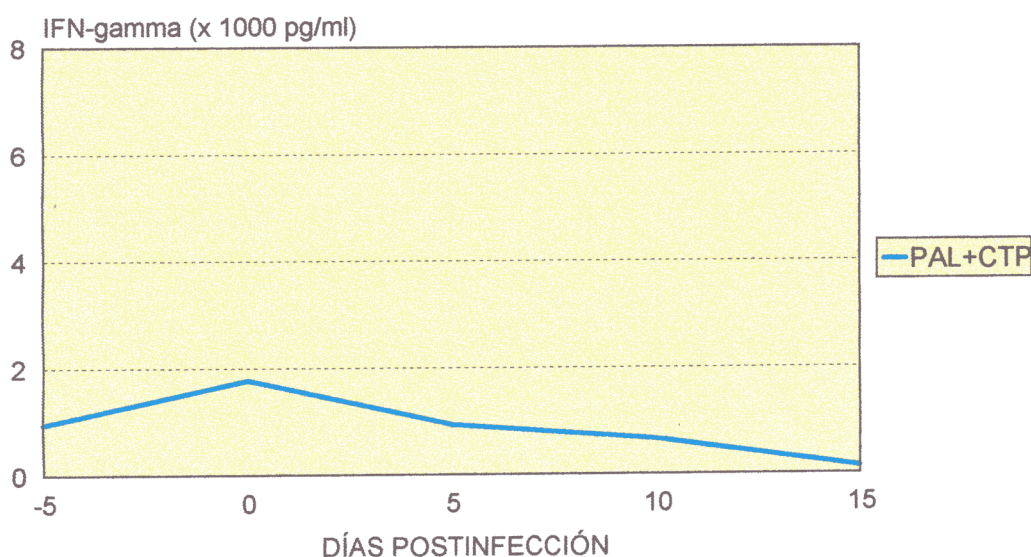
GRÁFICA 4.50. Evolución de la concentración de interferón- γ en el curso de la infección intraperitoneal con *T. vaginalis* tras el tratamiento con CTP (días -10 a 0 p.i.).

TABLA 4.101. Dinámica de la concentración sérica de IFN- γ 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- γ (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 ($\lambda = 450$ nm) y la concentración de IFN- γ calculada mediante la interpolación en la recta de regresión (recta de calibrado) procedente de un patrón de IFN- γ recombinante.

GRÁFICA 4.51. Evolución de la concentración de interferón- γ 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- γ en los lotes control, y tratados con PAL, CTP, PAL+CTP.

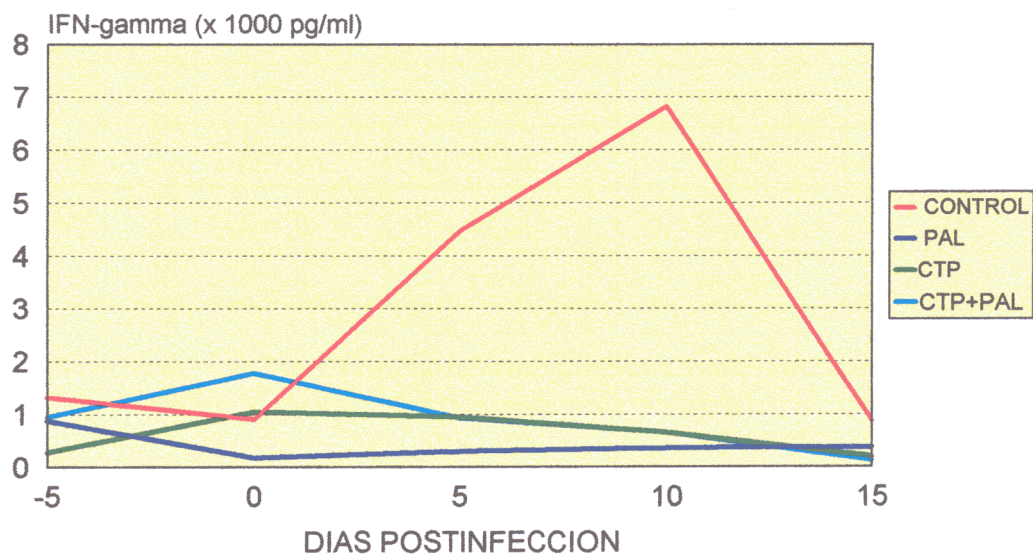


TABLA 4.102. Dinámica de la concentración sérica de IL-4 en ratones balb/c infectados con *T. vaginalis* (GRUPO CONTROL).

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 ($\lambda = 450$ 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.

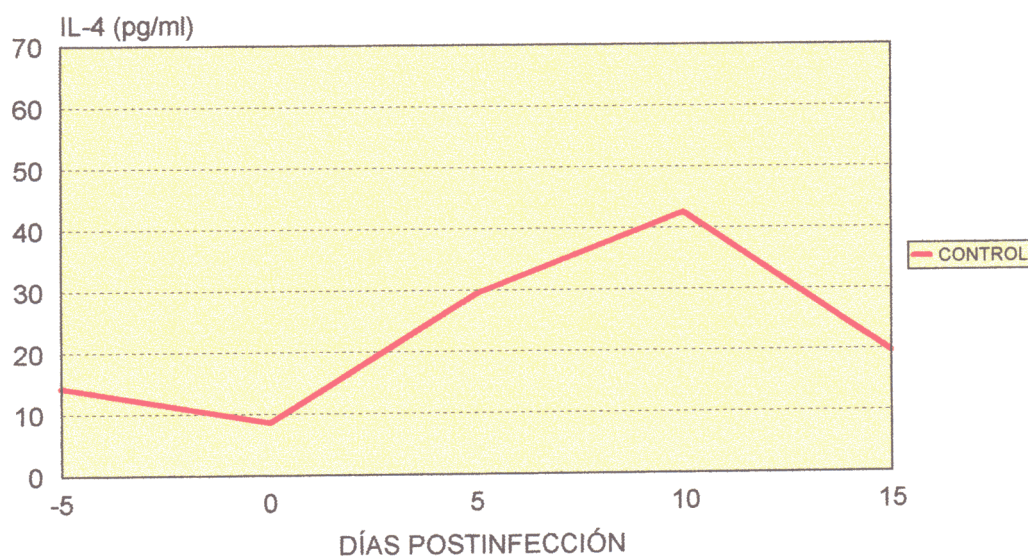
GRÁFICA 4.53. Evolución de la concentración de interleucina-4 en el curso de la infección intraperitoneal de ratones BALB/c con *T. vaginalis* (grupo control).

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 ($\lambda = 450$ 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).

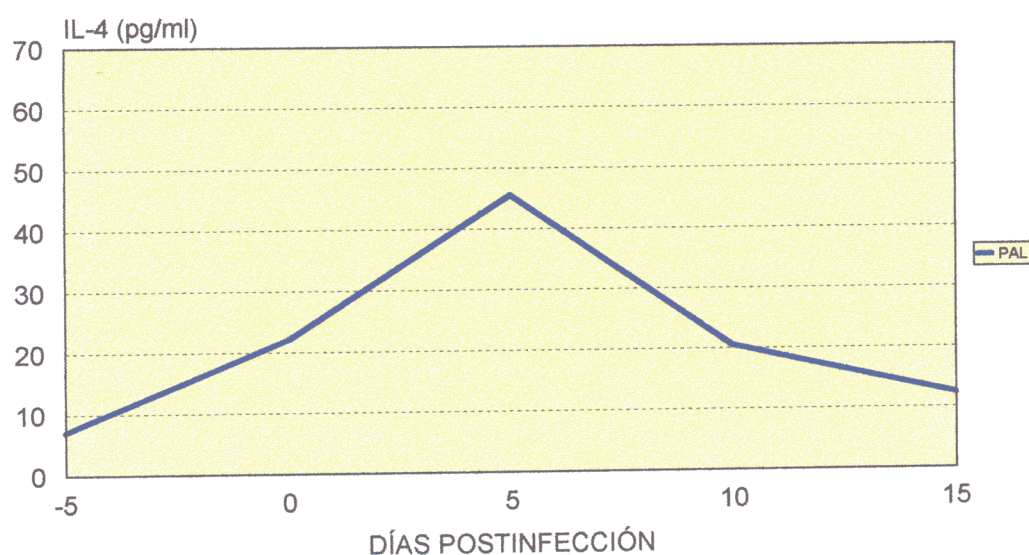


TABLA 4.104. Dinámica de la concentración sérica de IL-4 en ratones balb/c infectados con *T. vaginalis* y tratados con CTP (GRUPO CTP).

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.

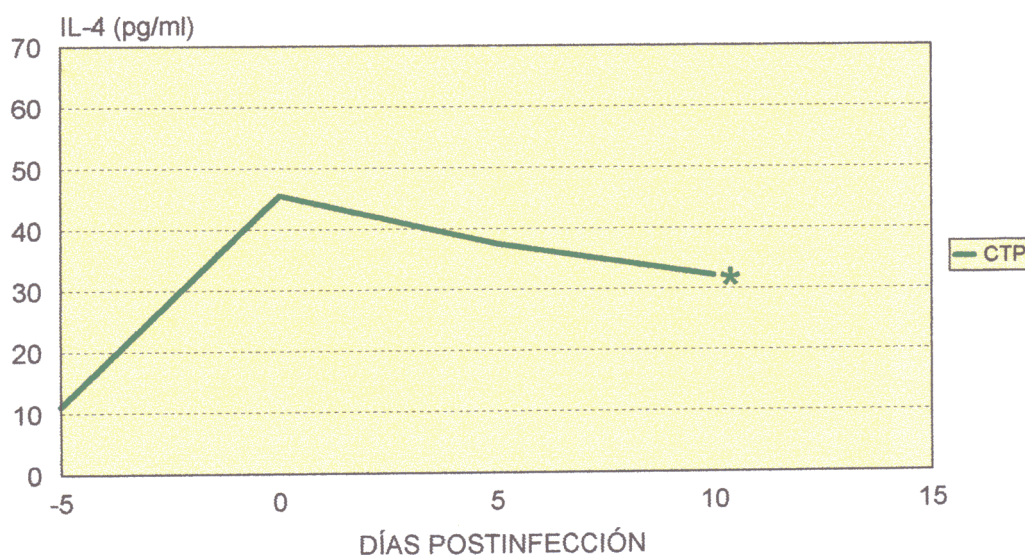
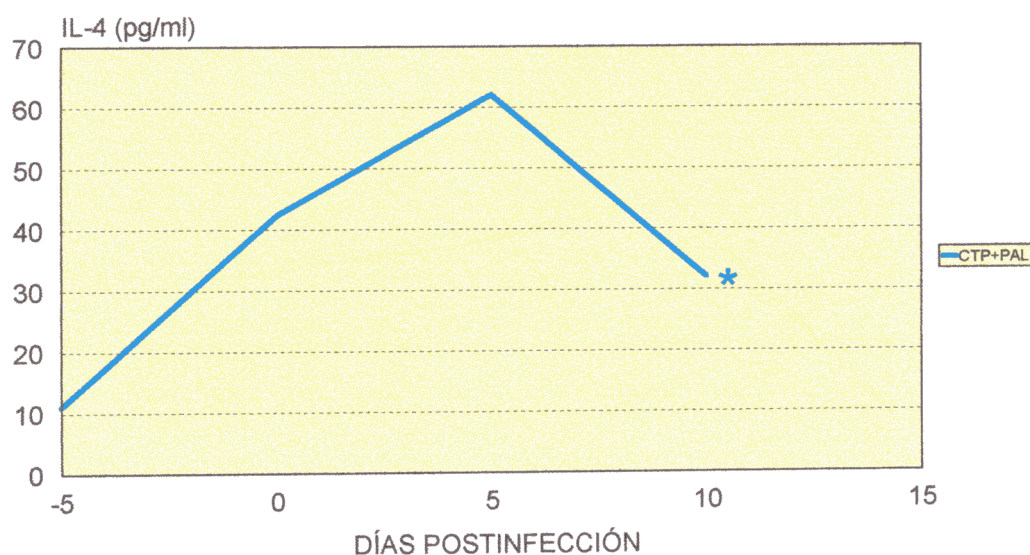
GRÁFICA 4.55. Evolución de la concentración de interleucina-4 en el curso de la infección intraperitoneal con *T. vaginalis* tras el tratamiento con CTP (días -10 a 0). El asterisco señala la última determinación disponible.

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).

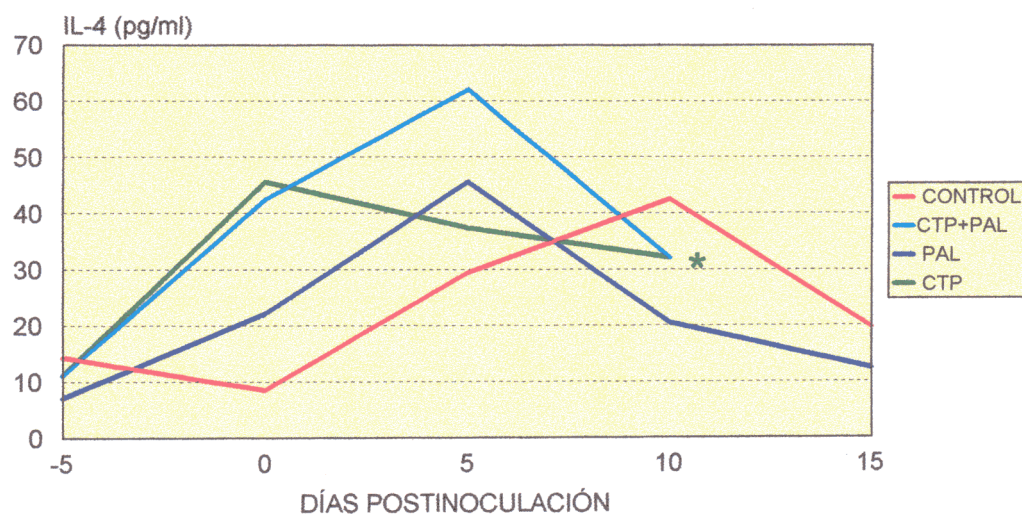
DÍAS POSTINFECCIÓN	D.O. 1	D.O. 2	D.O. $\bar{x}$	IL-4 (pg/ml)
-5	0,104	0,123	0,113	11,060
0	0,311	0,159	0,235	42,410
5	0,311	-	0,311	62,020
10	0,195	-	0,195	32,090
15	-	-	-	-†

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 tetrahydro-2H-1,3,5-tiadiazin-2-iones.

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-proteína 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 tetrahydro-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 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 Ca^{2+} se deba a su capacidad natriurética (eliminación de 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^{2+} .

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^{2+} (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^{2+} 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 antiprotozoósicos.

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% (%C₂₄₋₄₈:44,21-43,10), 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% (%C₂₄₋₄₈:37,99-45,62) y 70% (%C₄₈:32,51) 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 tricomónica.

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 N₂ 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
Ratón				
Peso	18-20 g	18-20 g	18-20 g	20-25 g
Nº/lote	10-12	10-20	10-20	10
Inóculo				
Nº parásitos	4×10^6 / ratón	10^6 / ratón	10^7 / ml	10^7 / ratón
Vol. medio	0.5 ml	0.5 ml	0.8 ml	0.5 ml
Observación (días)	10	21	11	15
Criterio	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.
Valoración	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 = Σ valores parciales.	Elaborada tabla de valoración de las lesiones.	Tabla de valoración de las lesiones de Toys modificada.
Virulencia	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: Toys (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 tricomonicidas 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 tricomonicida 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 tricomonicidas 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⁺ (linfocitos Tc) y un incremento en la proporción CD4⁺/CD8⁺ (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- γ). 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- α e IFN- γ (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 Inmunoférón (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.

Inmunoférón, 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- γ .

Además, se produce un significativo efecto estimulante sobre la actividad de las células NK en los ratones tratados con Inmunoférón (AM3), lo que puede explicarse por la marcada

inducción de INF- γ 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- γ 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⁺/CD8⁺ en tejido esplénico

después de la inmunodepresión quirúrgica por resección del intestino delgado. Este mismo efecto, sin embargo, no fue observado con el inmunoestimulante Inmuferón.

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 prostanoideos, 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 (PGE₂) 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- γ (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- γ 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- γ 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- α . Por último, IFN- γ también induce marcados cambios en la estructura y función de los

macrófagos. En neutrófilos, IFN- γ 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 (PGE₂) y TNF- α .

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 exacerba 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 sulfolípidio 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 ciclooxygenasa (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 ciclooxygenasa, 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 ciclooxygenasa 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 (Cooper, 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 γ -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 γ -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 nuestros 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ 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- γ .

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- α 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 patogenia en torno a un 15% respecto al lote testigo no tratado (control).

Nuevamente, el estudio de las citocinas IL-4 e IFN- γ 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- γ 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- γ 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- γ .

En cuanto a la composición fitoquímica de CTP se ha señalado la presencia de ácido fumárico, β -sitosterol y taninos. El β -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 patogenicidad 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- γ 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 patogenicidad 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- γ , IL-2 y TNF- α 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 Cu^{2+} con derivados de las tiadiazinas disustituidas debe ser la causa de la interesante actividad tricomonicida 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).

- 6ª.- 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*.
- 7ª.- 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*.
- 8ª.- Los ratones BALB/c infectados intraperitonealmente con *T. vaginalis* sufren un drástico incremento en los niveles séricos de IFN- γ , 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.
- 10ª.- El tratamiento con el extracto de *Polypodium leucotomos* (PAL), previo a la infección, suprime la respuesta dominante disminuyendo la concentración de IFN- γ , 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.
- 11ª.- El tratamiento con el extracto CTP provoca una disminución de los niveles séricos de IFN- γ , 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^a.- 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). *Immunologia 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. Springer-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). Intradermal 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.; KHOSHMAN, 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 thiadiazine 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). β -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⁺ 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⁺, 2H4⁺ 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). β -sitosterol and β -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 '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; BALLE, 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.

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 SABEL, 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.; SABEL, 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.
- CERKASOVÁ, 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 BALLEST, 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-méthyl-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). Supression 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 antiprotzoaria 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 citotoxicity 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.

- 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 histochemique 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 BOTTOMLY, K. (1988). Autocrine growth of CD4⁺ 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 candidosis 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 β -sitosterol. *Planta Med.*, 39: 157-163.
- GUPTE, 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.

JITRIPHAH, 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* cytopathic 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- α 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.; VANDER BERG, A.J.J.; BEUKELMAN, C.J.; VAN DIJK, H.; LABADIE, R.P. (1997). Isolation of phitosterols 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. Tricomonads & 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). Comparasion 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 annti-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 *Tritrichomonas 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.; BOIJESEAU, 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^a. 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 MTIMAVALLYE, 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 trichomonacidal 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). Nachweis 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-MATTYAHU, 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.
- MORRISON, C. S.; SUNKUTU, M. R.; MUSABA, E. y GLOVER, 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). Immunoferron (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- γ 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^a-TREVIANO, 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.; DELECTORSKIY, 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.

- 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 antiprotzoaria 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. Micro.*, 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 leucorrhea 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.; PHILIPPSIN, 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 cythopathic 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. Infec. 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.

- 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 University 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.*

- Akad. Nauk. Est. SSR (Biol. Ser.)* 10: 19-26.
- TERAS, J. y ROIGAS, E. (1966). Characteristic of the patho-morphological. 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.
- TSAL, 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. *Phytoh. 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.; WALT, 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 antiaggregant 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.

- 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⁺ 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 co-estimuladoras 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- γ e TNF- α y linfotóxina.
- IFN- γ , 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- β 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 (PGI₂), NO y quimiocinas (IL-8) que actúan como factores quimioatrayentes que favorecen la extravasación leucocitaria.
 - a.2.) Por otro lado, TNF- α , 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- γ que elimina el antígeno desencadenante de todo el proceso. Al tiempo que se liberan mediadores inflamatorios (PAF) y otras citocinas IL-1, TNF- α .

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
Factores estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF)	-Favorece la producción, maduración y diferenciación de precursores neutrófilos. -Aumenta la actividad de neutrófilos maduros.
Factor estimulante de granulocitos macrófagos (GM-CSF)	-Favorece el crecimiento y diferenciación de células progenitoras multipotenciales. -Actúa sobre la diferenciación de granulocitos y fagocitos mononucleares.
Factor estimulante de colonias de monocitos macrófagos (M-CSF)	-Favorece la producción y diferenciación de monocitos.

Interferones

NOMBRE	FUENTE CELULAR	EFEECTO
Interferón-α (IFN-α)	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.
Interferón-β (IFN-β)	Fibroblastos	-Activan a las células NK.
Interferón-γ (IFN-γ)	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
Interleucina-2 (IL-2)	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.
Interleucina-3 (IL-3)	Linfocitos T Células cebadas	-Estimula la diferenciación y proliferación de células hematopoyéticas en la médula ósea. -Promueve la proliferación y desarrollo de células cebadas.
Interleucina-4 (IL-4)	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.
Interleucina-5 (IL-5)	Linfocitos Th Células cebadas Eosinófilos	-Estimula la proliferación y activa las funciones de los eosinófilos. -Favorece la diferenciación de linfocitos B.
Interleucina-6 (IL-6)	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.
Interleucina-9 (IL-9)	Linfocitos T	-Incrementa la actividad de células cebadas.

Nombre	Fuente celular	Efectos
Interleucina-10 (IL-10)	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.
Interleucina-13 (IL-13)	Linfocitos T	-Inhibe la producción de citocinas en monocitos/macrófagos. -Estimula el crecimiento y diferenciación de linfocitos B, así como la secreción de IgE.
Interleucinas-14 (IL-14)	Linfocitos T	-Favorece la proliferación de linfocitos B activados.
Linfotoxina	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_2 . -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

	Efectos del TNF- α	
Efectos locales	-Sobre células endoteliales -Sobre leucocitos	-Induce la expresión de moléculas de adhesión. -Activa a monocitos/macrófagos, neutrófilos, eosinófilos para combatir microorganismos. -Induce la producción de citocinas en monocitos/macrófagos (IL-1, IL-6, quimiocinas y el propio TNF-α). -Potencia la lisis mediada por Tc, al aumentar la expresión de moléculas de clase I.
Efectos sistémicos	-Sobre el hipotálamo -Sobre el hígado -Sobre la médula ósea -Sobre la coagulación -Sobre el metabolismo	-Fiebre dependiente de PGE₂. -Induce la síntesis de proteínas de fase aguda. -Inhibe la división de la célula madre de la médula ósea. -Activa el sistema de coagulación. -Produce caquexia por inhibir la liberación de ácidos grasos de las lipoproteínas, y alterar el catabolismo de proteínas en músculo.

Nombre	Fuente celular	Efectos
Interleucina-12 (IL-12)	Monocitos/Macrófagos Linfocitos T	-Es el más potente activador de las células NK para la secreción de IFN-γ. Además favorece su crecimiento y actividad citolítica. -Incrementa la actividad citolítica de linfocitos Tc y macrófagos. -Actúa sinérgicamente con otras citocinas favoreciendo la proliferación de células hematopoyéticas. -Favorece la diferenciación de linfocitos Th. - Inhibe la secreción de IgE en linfocitos B.
Interleucina-15 (IL-15)	Monocitos Linfocitos T Células del estroma de la médula ósea	-Estimula la proliferación de linfocitos T, con actividad similar a la de la IL-12.

Quimiocinas

Nombre	Fuente celular	Efectos
Interleucina-8 (IL-8)	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 ₄ . -Favorece la adhesión de neutrófilos y monocitos a la célula endotelial.
Proteína quimiotáctica de monocitos (MCP-1)	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.
RANTES	Linfocitos T Plaquetas	-Factor quimiotáctico de monocitos, linfocitos T, eosinófilos y basófilos. -Estimula la liberación de histamina por basófilos.

Presidente:

Dr. Aluado Rodríguez

Vocales:

Dr. Rodríguez Cacho

Dr. Ochoa de Oca

Dr. Aluado de la Puente

Secretario:

Dr. Escario G. Trempo

Reunido, en el día de hoy, el Tribunal que al

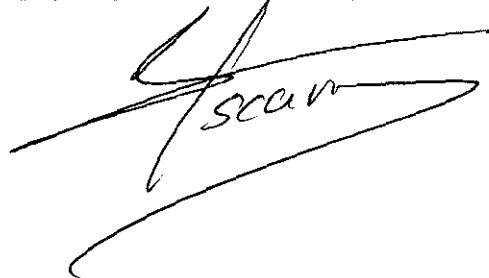
margen se expresa, para juzgar esta tesis doctoral,

acordó por Unanidad calificarla

de Sobresaliente "Cum Laude"

Madrid, 21 de Febrero de 1900

El Secretario del Tribunal

 Escario