

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



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

Ponente: Sr. Dr. _____

TRIBUNAL

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

TESIS DOCTORAL

JUAN JOSÉ NOGAL RUIZ
MADRID, 1999

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE FARMACIA
DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



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

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

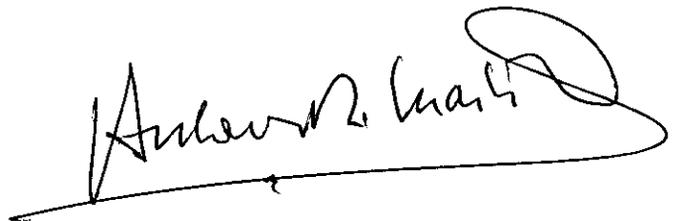
Directores: Dra. D^a. Alicia Gómez Barrio y Dr. D. Antonio R. Martínez Fernández

MADRID, 1999

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

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

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

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

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

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

F. Nietzsche

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

A TODOS, DE CORAZÓN, MUCHAS GRACIAS

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

ÍNDICE

ÍNDICE

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

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

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

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

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

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

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.- INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.- REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. TAXONOMÍA Y EVOLUCIÓN

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

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

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

Filo I: SARCOMASTIGOPHORA Honigberg & Balamuth, 1963.

Subfilo I: MASTIGOPHORA Diesing, 1866.

Clase II: ZOOMASTIGOPHOREA Calkins, 1909.

Superorden I: PARABASILIDEA Honigberg, 1973.

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

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

Subfamilia: TRICHOMONADINAE Honigberg, 1963.

Género: *Trichomonas* Donné, 1836.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.2. MORFOLOGÍA Y BIOLOGÍA

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

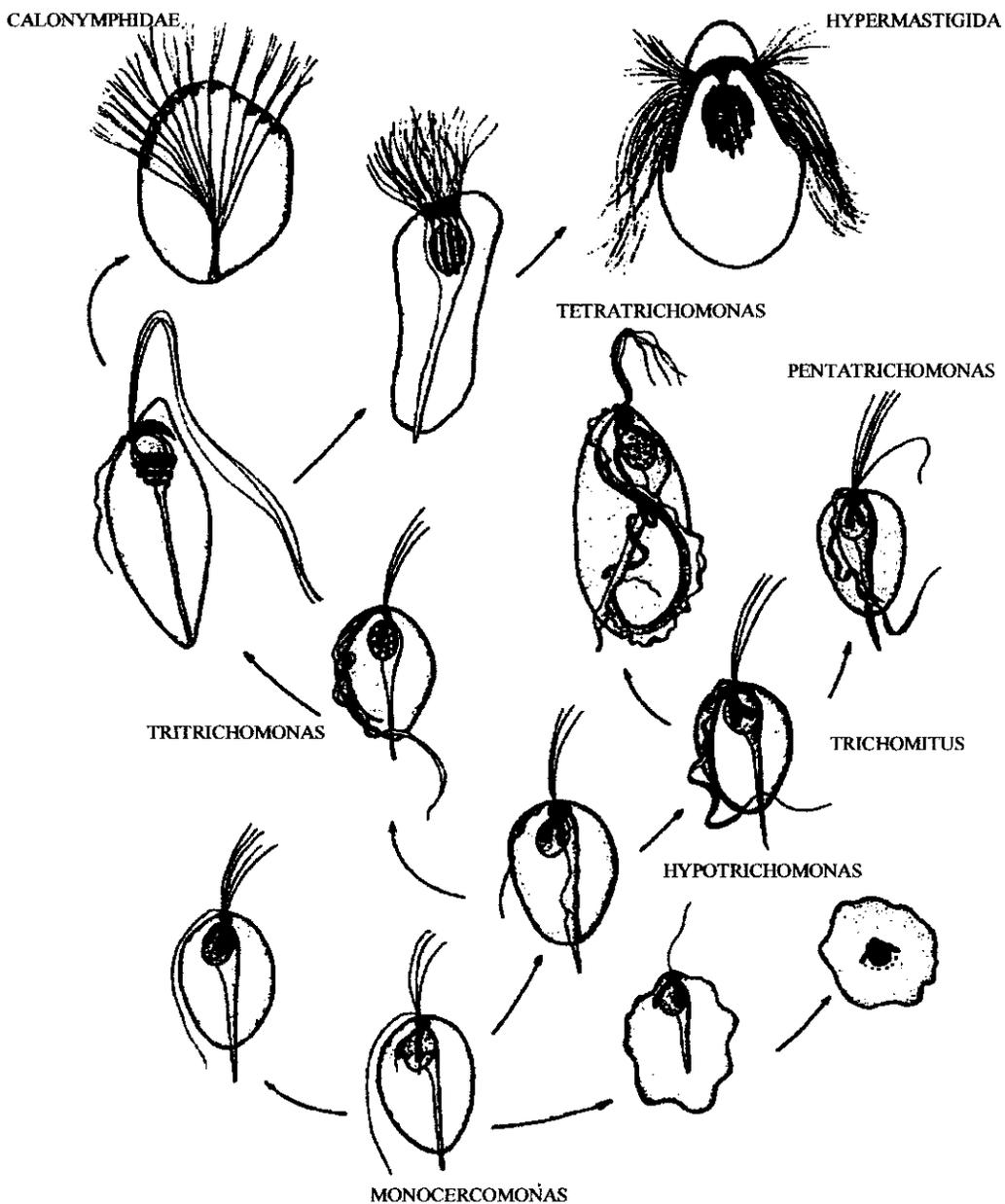
El tamaño de la especie en preparaciones fijadas y teñidas es de $9,70 \pm 0,07 \times 7,00 \pm 0,04 \mu\text{m}$, produciéndose un incremento de un tercio en los trofozoitos vivos (Honigberg & Brugerolle, 1990).

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

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

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

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



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

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

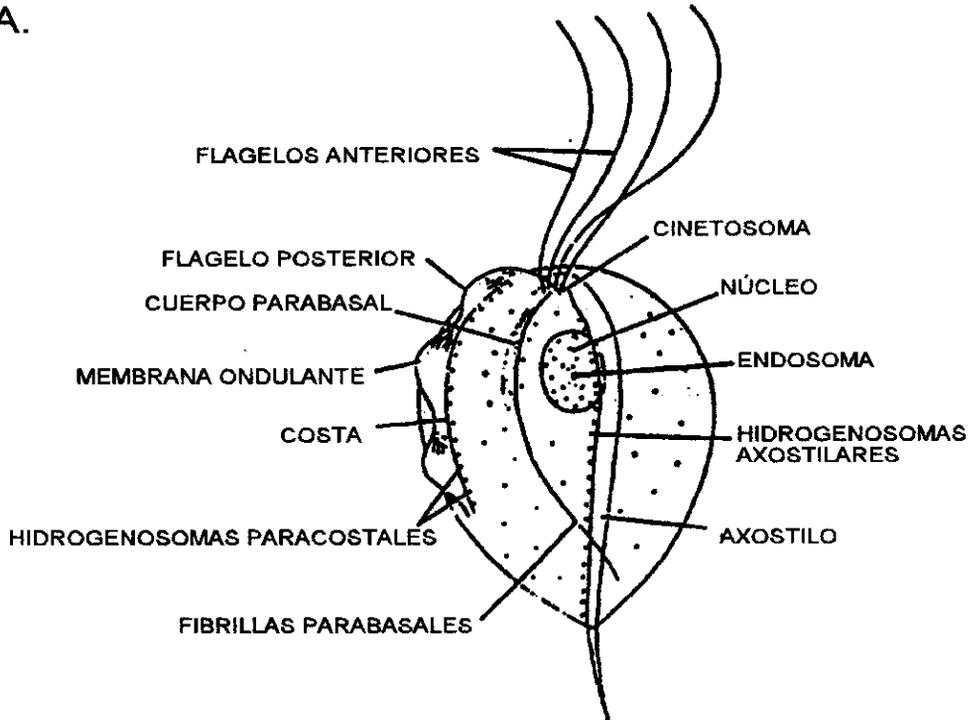
Los hidrogenosomas son los orgánulos implicados en el metabolismo energético de este grupo de protozoos, que carecen de mitocondrias por su naturaleza anaeróbica. Fueron descubiertos por Lindmark & Müller en 1973 y denominados así por encontrarse en ellos los enzimas responsables de la formación de hidrógeno molecular. Son cuerpos esféricos de 0,5 a $1 \mu\text{m}$ que parecen formarse por división de los preexistentes (Nielsen & Diemer, 1976). Por ello, al igual que las mitocondrias y cloroplastos, son probablemente de origen endosimbionte. Los equivalentes reductores procedentes de la oxidación, se eliminan vía formación de H_2 molecular, o bien vía de malato o acetato, dependiendo de la presión parcial de CO_2 existente, estas reacciones metabólicas acumulan energía en forma de ATP.

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

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

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

A.



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

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

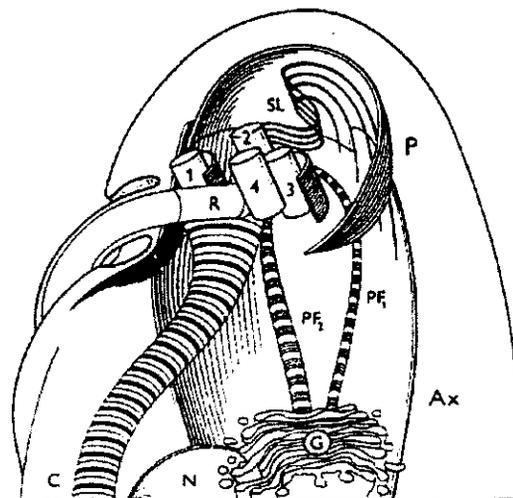
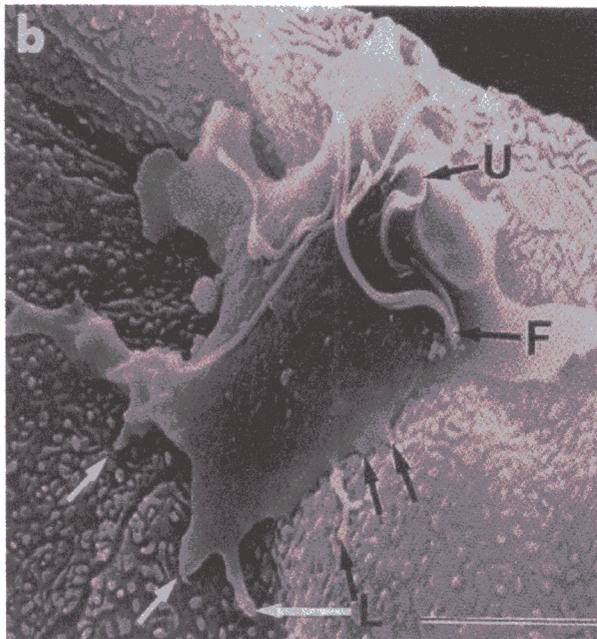
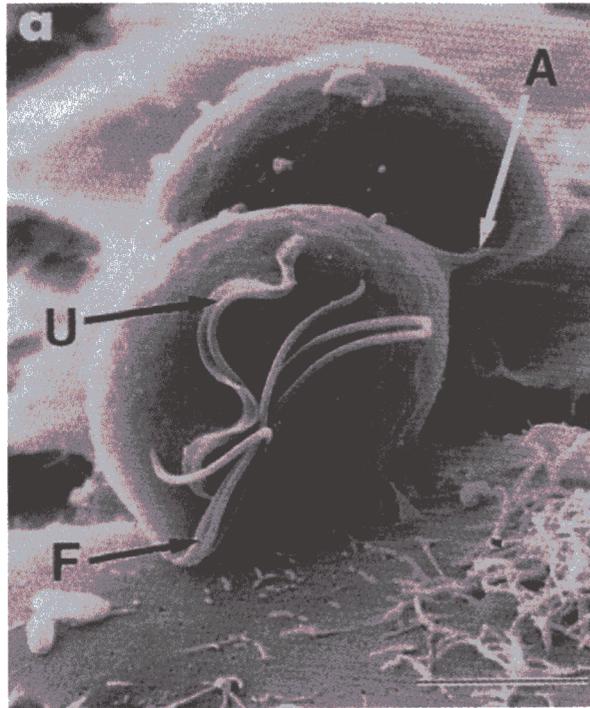


FIGURA 2.3. Morfología elipsoidal (a) típica del trofozoito de *T. vaginalis*. En la imagen obtenida mediante microscopia electrónica se señalan el axostilo (A), los flagelos (F) y la membrana ondulante (U).



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

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

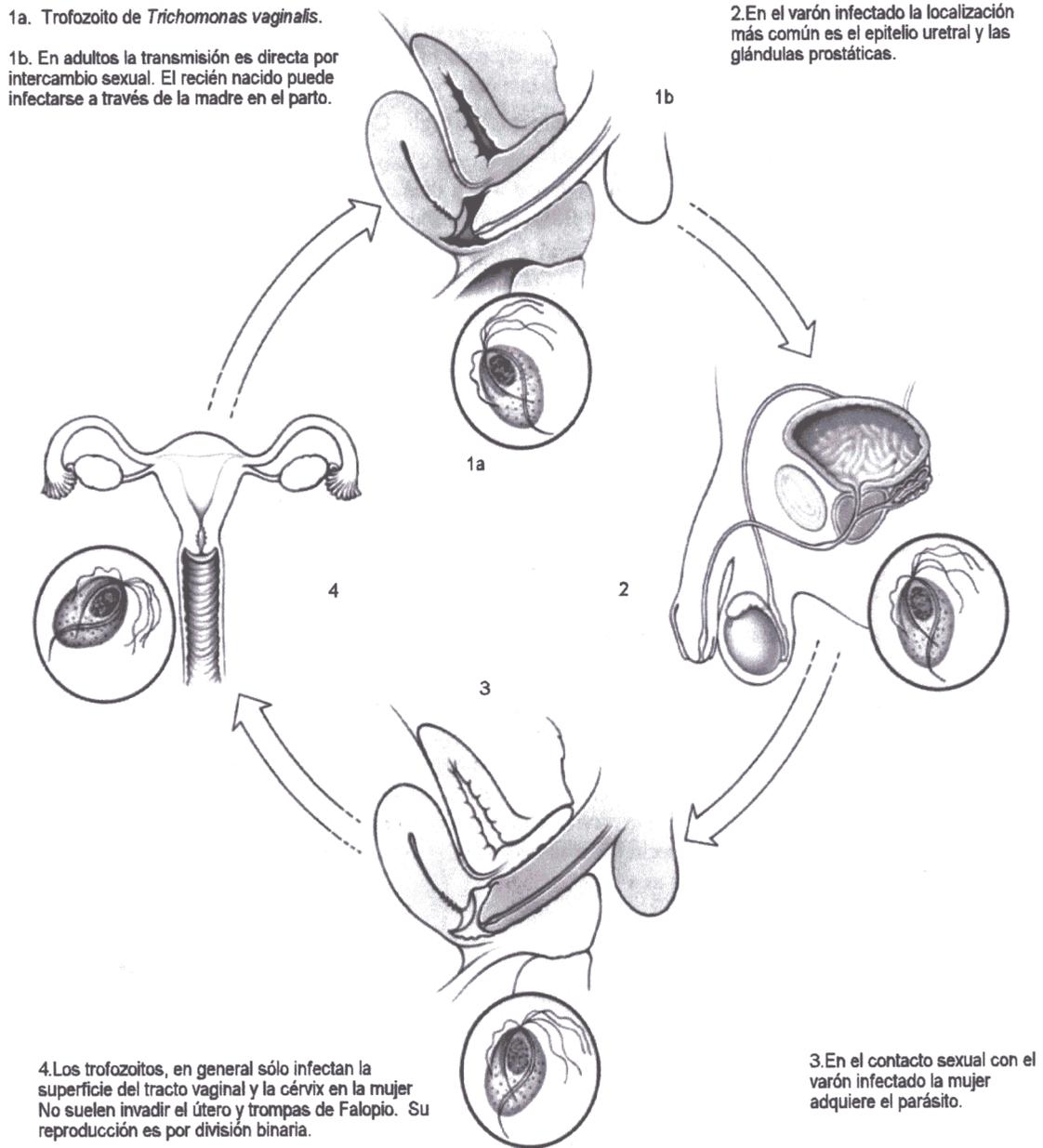
La alimentación del parásito tiene lugar por pinocitosis y fagocitosis; en el proceso se ve involucrada la estructura microtubular, formándose vacuolas alimenticias de tamaño diverso (Juliano & Bandeira, 1985). El proceso es más activo en los dos tercios posteriores de la célula. La capacidad del protozoo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

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

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

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

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



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

2.3. MANIFESTACIONES CLÍNICAS

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

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

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

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

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

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

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

TABLA 2.1. Signos y síntomas de la tricomonosis vaginal.

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

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

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

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

Según Petrin *et al.* (1998), la tricomonosis en el varón puede encuadrarse en alguna de las tres categorías siguientes: 1) portador asintomático, identificado por la investigación de contactos sexuales con mujeres infectadas, 2) tricomonosis aguda, caracterizada por uretritis purulenta y 3) enfermedad sintomática leve, que es clínicamente similar a otras uretritis gonocócicas.

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

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

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

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

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

2.4. MECANISMOS IMPLICADOS EN LA PATOGENIA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.5. EPIDEMIOLOGÍA DE LA TRICOMONOSIS

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

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

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

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

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

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

2.5.1. Método de transmisión

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.5.2. Factores relacionados con la supervivencia del parásito

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

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

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

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

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

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

2.5.3. Factores relacionados con la prevalencia de la enfermedad

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.5.4. Prevalencia de la tricomonosis en la mujer

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

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

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

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana (II)

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

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana

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

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana (III)

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

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana (IV)

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

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana (v)

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

TABLA 2.2. Estudios clínicos de tricomonosis humana

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

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

Datos aclaratorios de la revisión:

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

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

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

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

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

2.6. TRATAMIENTO DE LA TRICOMONOSIS

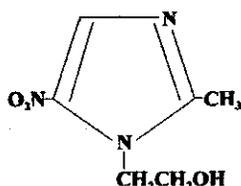
En el año 1954, el laboratorio farmacéutico francés Rhône-Poulenc encontró un nuevo agente tricomonocida al estudiar una gran variedad de antibióticos, antimaláricos y amebicidas (Lossick, 1990). Dicho agente precursor de los 5-nitroimidazoles, recibió el nombre de metronidazol (1-(2- hidroxietil)-2-metil-5-nitroimidazol),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

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

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

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

2.6.1. Estructura y propiedades fisico-químicas de metronidazol



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

2.6.2. Espectro antiinfeccioso

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

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

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

2.6.3. Uso

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

2.6.4. Mecanismo de actuación de los 5-nitroimidazoles

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

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

T. vaginalis produce H₂ y CO₂ a partir de piruvato, tratándose de una reacción piruvato deshidrogenasa-ferredoxin oxidorreductasa, como se demostró en *Tritrichomonas foetus* (Marczak *et al.*, 1983). En este tipo de reacción el piruvato se combina con fosfato, produciendo acetil fosfato, H₂ y CO₂, y requiere coenzima A y ferredoxina.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABREVIATURAS:

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

CML: Concentración Mínima Letal.

CMC: Concentración Mínima Citocida.

DL50: Dosis Letal 50.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.8.1. INFECCIONES VAGINALES

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Tras un tratamiento inmunosupresor los resultados no son concluyentes:

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

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

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

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

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

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

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

2.8.2. INFECCIONES ECTÓPICAS

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

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

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

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

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

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

2.8.2.1. Infecciones intraperitoneales

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

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

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

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

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

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

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

2.8.2.1.1. Evolución y manifestaciones patológicas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.8.2.1.2. Ensayos intraperitoneales de patogenia en ratón

A. Mortalidad.

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

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

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

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

B. Índices de patogenia.

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

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

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

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

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

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

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

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

C. Cambios de virulencia.

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

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

2.8.2.2. Infecciones subcutáneas

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

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

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

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

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

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

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

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

En contraste a estos datos publicados, Krieger y su equipo (1983) examinan 7 aislados clínicos del parásito, dos de los cuales resultan no infectantes para ratones C₃H. Los otros aislados causaban abscesos en un porcentaje variable de los hospedadores (5% - 71%); y los autores usan la relación lesión/infección producida para deducir la virulencia de la cepa.

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

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

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

2.8.2.2.1. Evolución y manifestaciones patológicas

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

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

2.8.2.2.2. Estudio histopatológico

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

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

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

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

2.8.2.2.3. Ensayos subcutáneos de patogenia en ratón

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

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

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

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

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

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

La reproducibilidad del ensayo fue cuestionada por Delachambre (1981), quien realizó análisis estadísticos de resultados señalando la excesiva variabilidad en las respuestas de los ratones BALB/c tras la inoculación de dos clones de *T. vaginalis*. No obstante, Honigberg y su equipo (1961; 1984) muestran que la homogeneidad es satisfactoria cuando los resultados son sometidos al análisis de la varianza. La ausencia de homogeneidad estadística de los resultados puede indicar incorrecciones de tipo técnico que pueden ser identificadas y subsanadas. El desarrollo con éxito del ensayo demanda paciencia y un estricto seguimiento del protocolo descrito. El volumen medio de abscesos de 6 días en la cepa C57Bl/6 para 77 aislados frescos de *T. vaginalis* (Honigberg *et al.*, 1984; Kulda *et al.*, 1977) se sitúa en un rango continuo desde 60 mm³-230 mm³. El tamaño intrínseco de las lesiones subcutáneas indica un potencial de virulencia específico.

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

2.8.2.3. Infecciones intramusculares.

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

El inóculo aplicado varía, según los autores, de $1,5 \times 10^5$ a $2,5 \times 10^6$ tricomonas en 0,2 ml de medio TYM con agar suplementado o no con suero (Schnitzer *et al.*, 1950; Ivey & Hall, 1964) o en 0,1 ml de solución salina (Gavrilesco, 1962); produciendo lesiones cuyo volumen y persistencia depende de la dosis infectante (Schnitzer *et al.*, 1950).

La lesión es un nódulo palpable en el tejido inoculado a los 3 días p.i.. La lesión progresa gradualmente hasta formar un amplio absceso después de 14 a 18 días. El tamaño límite que puede llegar a alcanzar es de 800-2000 mm³ y contiene un material gris verdoso lleno de parásitos y leucocitos. Los abscesos disminuyen después de 8 a 12 semanas, pero conservan tricomonas viables. La posibilidad de usar infecciones intramusculares para ensayos de virulencia de tricomonas ha sido sugerida por Gavrilesco (1962).

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

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

2.8.3. CORRELACIÓN ENTRE PATOGENIA EXPERIMENTAL Y CLÍNICA

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

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

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

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

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

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

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

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

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

La discrepancia entre los resultados de varios ensayos puede ser explicada por la diferente sensibilidad a múltiples factores que controlan la virulencia de la cepa. En este sentido, Stejska y Kulda (1990) realizaron a lo largo de un año, ensayos con una cepa virulenta mantenida en cultivo sin observar atenuación de la virulencia en los ensayos subcutáneos (volumen de lesión 180 mm³); sin embargo el índice medio de infección decrece un 20%, la mortalidad desciende de 80 % a 23 %, y el tiempo medio de la muerte se incrementa de 9,8 a 17,6 días.

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

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

2.9. INMUNOPARASITOLOGÍA

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

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

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

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

2.9.1. La respuesta inmunológica frente a los parásitos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.9.1.2. La respuesta inmunitaria frente a protozoos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.9.1.2.2. La activación de los linfocitos T citotóxicos

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

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

2.9.1.2.3. La activación de los linfocitos B

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

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

2.9.1.3. Aspectos inmunológicos de la tricomonosis humana y experimental

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

A.- Complemento

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

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

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

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

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

B. - Neutrófilos polimorfonucleares

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

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

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

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

C.- Macrófagos

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

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

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

D.- Anticuerpos naturales

La existencia de factores líticos (mediados por el complemento) y aglutinantes en el suero de individuos no expuestos a *T. vaginalis* ha obligado a definir el límite mínimo de positividad para los métodos diagnósticos basados en la determinación de anticuerpos séricos. La actividad lítica se ha asociado, generalmente, a la intervención de anticuerpos inespecíficos, salvo para Weld y Kean (1958) quienes la vinculan con la presencia de dióxido de carbono (CO₂) en el suero. En general, dependiendo de la técnica utilizada, títulos de 1/20 a 1/60 se consideran inespecíficos (Honigberg, 1970).

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

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

el conjunto de los mecanismos de defensa del hospedador.

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

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

A.- Anticuerpos específicos

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

B.- Anticuerpos locales

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

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

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

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

C.- Inmunidad mediada por células

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

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

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

La capacidad de los neutrófilos para eliminar al parásito ha sido comprobada *in vitro* por Rein *et al.* (1980), parece uno de los mecanismos dependiente de O₂ y complemento, aunque ocurre en ausencia de anticuerpos específicos, sugiriendo los autores que la activación de la vía alternativa del complemento determina la unión del componente C3b a la superficie del parásito. Posteriormente, C3b se une a los receptores específicos de los neutrófilos. Los autores presentan de forma fascinante, cómo los neutrófilos rodean y fraccionan un parásito, demasiado grande para ser ingerido entero, concluyendo con la fagocitosis por partes del tricomonádido.

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

2.9.2. Inmunomodulación

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

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

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

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

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

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

Inmunomoduladores no específicos

I. Productos de origen microbiano:

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

III. Productos de síntesis:

Azimexón.
Cimetidina.
Inosine pranobox
Levamisol.

II. Productos derivados de mamíferos:

Timosina α_1 . Timomodulina
Timosina fracción 5. Timoestimulina

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

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

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

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

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

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

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

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

2.9.2.1. Inmunosupresión

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

2.9.2.2.1. Antiinflamatorios no esteroideos (AINEs)

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

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

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

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

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

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

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

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

Por otra parte, se han desarrollado numerosos sistemas biológicos con el fin de investigar la selectividad de estos principios activos sobre la inhibición de ambas isoenzimas. Los resultados se expresan como el cociente entre la concentración inhibitoria 50 (CI₅₀) entre COX-2 y COX-1.

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

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

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

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

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

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

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

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

La interacción con los procesos de biosíntesis de citocinas, que tienen lugar en algunas células inflamatorias, como macrófagos y linfocitos principalmente, limita su liberación y por tanto sus efectos proinflamatorios. Así, en modelos quirúrgicos experimentales se ha demostrado que metamizol, indometacina y diclofenac inhiben la síntesis de IL-4, IL-6 e IL-1, a través de la inhibición de la ciclooxigenasa, y por ende la disminución de prostaglandinas (PGE₂). Finalmente, metamizol también activa la síntesis de IL-10, aunque según los modelos de forma poca significativa (García-Álvarez *et al.*, 1997).

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

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

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

2.9.2.2.2. Otros fármacos inmunomoduladores: SAMe

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

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

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

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

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

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

2.10.1. PAL (EXTRACTO DE *POLYPODIUM LEUCOTOMOS*)

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

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

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

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

Acciones Terapéuticas

A. Actividad antitumoral:

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

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

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

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

B. Actividad antipsoriásica:

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

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

C. Actividad frente a la dermatitis atópica

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

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

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

D. Actividad frente a vitiligo

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

E. Actividad inmunomoduladora

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

Cuéllar del Hoyo *et al.* (1997) investigan el efecto inmunomodulador del extracto de *P. leucotomos* en ratones BALB/c inmunizados con antígenos del tercer estadio larvario (LIII) de *Anisakis simplex*. De una parte, se observa un descenso en los anticuerpos específicos en los animales tratados antes y después de la inmunización. Este descenso fue principalmente en el isotipo IgG₁. En los animales tratados antes de la inmunización, la reducción de la subclase IgG₁ es muy marcada en relación al grupo no tratado, mientras que la subclase IgG_{2b} aparece tempranamente y con niveles ligeramente superiores que en el grupo control. De otra parte, en los animales tratados después de la inmunización también se observa una reducción de la subclase IgG₁, aunque no es tan marcada como en el grupo tratado en el periodo preinmunización. Los niveles de anticuerpos de la subclase IgG_{2a} fueron mayores que los de los grupos no tratados y, como en el grupo preinmunización, los anticuerpos de la subclase IgG_{2b} aparecen muy pronto pero permanecen en niveles similares a los de los controles.

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

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

Dea-Ayuela (1999), en ratones BALB/c demuestra que el tratamiento de PAL previo a la inmunización mediante antígeno de *Trichinella spiralis* ocasiona una disminución de las inmunoglobulinas totales a costa de las IgG₁ mientras que aumentan las IgG_{2a} y IgG_{2b}, apareciendo además IgG₃.

F. Actividad frente a la queratitis herpética

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

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

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

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

G. Actividad frente a herpes zoster

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

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

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

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

H. Actividad frente a patologías oftalmológicas de origen inmunológico

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

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

I. Actividad frente a aloinjertos cutáneos

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

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

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

J. Actividad frente a patologías neurológicas

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

K. Actividad fotoprotectora

Las reacciones agudas de la piel humana a la radiación ultravioleta (290-400 nm) son reconocidas como una forma de inflamación mediada por diversos mecanismos, entre los que cabe destacar: la acción directa de los fotones sobre el ADN, la generación de radicales libres del O₂ y la producción de mediadores inflamatorios como la histamina, prostaglandinas (PGD₂, PGE₂) y leucotrienos.

En la búsqueda de agentes fotoprotectores, *P. leucotomos* ha exhibido una interesante actividad antioxidante, antiinflamatoria y de protección a la luz UV, a través de un mecanismo de acción que implica la interacción con los radicales libres de O₂. Los resultados obtenidos representan un hallazgo significativo para su potencial uso clínico en el tratamiento de quemaduras solares y reacciones fototóxicas (González & Pathak, 1996).

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

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

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

L. Actividad frente a la esclerosis múltiple

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

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

2.10.2. CTP

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

Acciones terapéuticas:

En cuanto a su actividad biológica se ha descrito:

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

G. Acción hepatoprotectora: Un grupo de investigadores administran CCl_4 como sustancia hepatotóxica a ratas albinas, junto con el tratamiento intraperitoneal de un extracto aCTP, comprobando que se produce un descenso en las lesiones hepáticas (ASAC XIV, 1999). Otros autores (ASAC XV, 1999) obtienen unos resultados de idéntica naturaleza, revelando mediante análisis histopatológicos, un aumento en los procesos de regeneración. Nuevos ensayos demuestran, además, la baja toxicidad del extracto (ASAC XVI, 1999).

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

MATERIAL Y MÉTODOS

3.- MATERIAL Y MÉTODOS

3.1. MATERIAL

3.1.1. MATERIAL DE LABORATORIO

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

A.- Aparatos.

- Campana de flujo laminar (Telstar, S.A.).
- Microscopio óptico (Olympus BH-2).
- Incubador de CO₂ al 5% y 37 °C (Heraeus Instruments, S.A.).
- Autoclave (Clino-Matic, Selecta, S.A.).
- Congelador progresivo (Nicoool LM100, Winterthur S.A.).
- Balanza de precisión (Mettler AE 100).
- Micropipetas automáticas desde 2 hasta 5000 µl.
- Otros (pHmetro, destilador de agua, centrífuga de mesa,...).

B.- Material de disección.

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

C.- Material de plástico.

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

D.- Material de vidrio.

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

3.1.2. MATERIAL BIOLÓGICO

3.1.2.1. *Trichomonas vaginalis*.

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

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

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

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

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

La conservación se realiza por congelación en N₂ líquido a -170 °C (Yaeger, 1988). El protocolo de congelación requiere la siguiente pauta experimental:

- 1°.- Concentración de *T. vaginalis* por centrifugación a 2000 r.p.m.(350g) (5').
- 2°.- Lavado del concentrado con P.B.S. (Phosphate Buffered Saline) (x 3).
- 3°.- Dilución al 50% en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO), agente criopreservante, al 10% en P.B.S.
- 4°.- Reparto en crioviales (Biofreeze® vials, COSTAR, S.A.) de congelación.
- 5°.- Congelación gradual 1 °C/min. hasta alcanzar -70 °C en el congelador progresivo.
- 6°.- Introducción en los tanques de N₂ líquido.

La recuperación de las cepas congeladas se produce mediante la extracción del vial del N₂ líquido, para su inmersión en un baño de agua a 37 °C. Una vez descongelado, se vierte el contenido en un tubo con medio Diamond suplementado con suero y antibióticos.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.1.3. MEDIO DE CULTIVO

Medio Diamond

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

Composición:

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

Preparación:

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

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

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

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

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

3.1.4. PRODUCTOS ENSAYADOS

3.1.4.1. Extractos vegetales

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

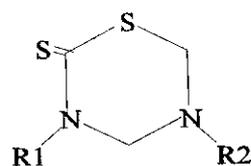
3.1.4.2. Productos de síntesis

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

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

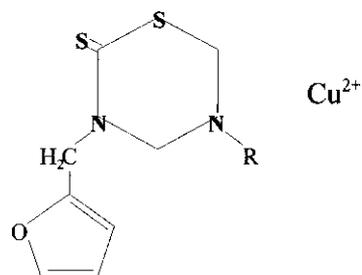
Sus estructuras se esquematizan en las tablas 3.1., 3.2. y 3.3., que aparecen en las siguientes páginas.

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



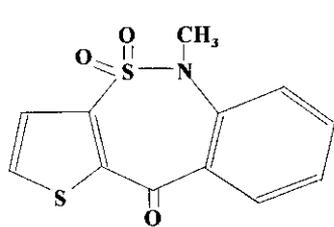
COMPUESTO	R ₁	R ₂
1a	FURFURILO	(CH ₂) ₅ -COOH
DL-1b	FURFURILO	CH(CH ₂ COOH)-COOH
1c	FURFURILO	CH ₂ -COOH
L-1d	FURFURILO	CH(CH ₂ Ph)-COOH
DL-1d	FURFURILO	CH(CH ₂ Ph)-COOH
L-1e	FURFURILO	CH[CH(CH ₃) ₂]-COOH
DL-1f	FURFURILO	CH[(CH ₂) ₂ COOH]-COOH
L-1g	FURFURILO	CH(CH ₃)-COOH
1h	FURFURILO	CH ₂ -CONH-CH ₂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

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

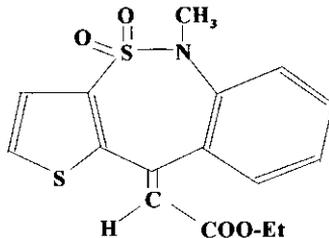


COMPUESTO	R
2AIB	$\text{C}[(\text{CH}_3)_2]-\text{COOH}$ (ácido 2-aminoisobutírico)
6-ACA	$(\text{CH}_2)_5-\text{COOH}$ (ácido 6-aminocaproico)
D-ASPA	$\text{CH}(\text{CH}_2\text{CONH}_2)-\text{COOH}$ (D-asparagina)
L-FA	$\text{CH}(\text{CH}_2\text{Ph})-\text{COOH}$ (L-β-fenilalanina)
Glic	CH_2-COOH (glicina)
L-Alán	$\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COOH}$ (L-alanina)

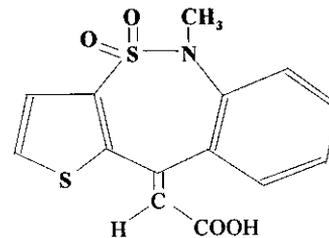
TABLA 3.3. Estructura molecular de los compuestos: Serie CP (Tieno(2,1)benzotiazepinas S,S-dióxidos y dibenzo(c,f)tiazepinas S,S-dióxidos).



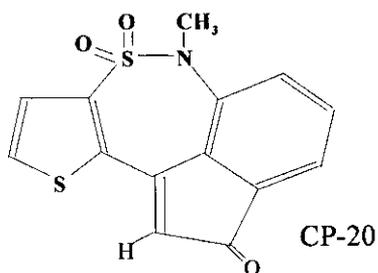
CP-1



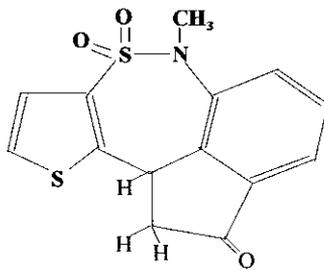
CP-6



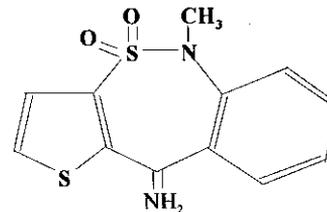
CP-18



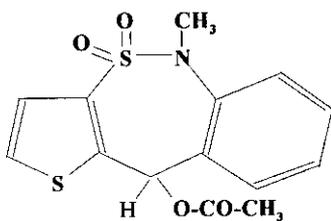
CP-20



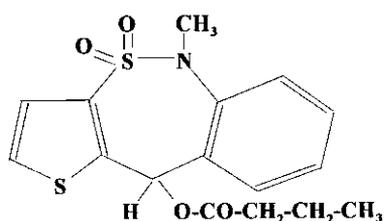
CP-47



CP-39

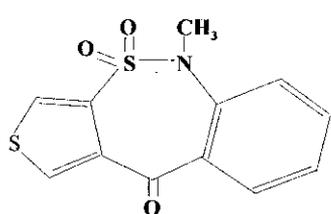


CP-237

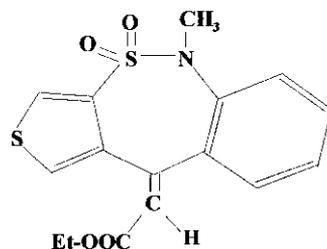


CP-169

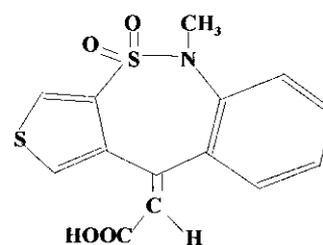
TABLA 3.3. Estructura molecular de los compuestos: Serie CP (Tieno(2,1)benzotiazepinas S,S-dióxidos y dibenzo(c,f)tiazepinas S,S-dióxidos) (II).



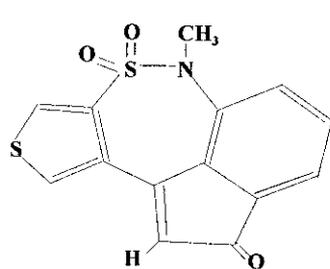
CP-9



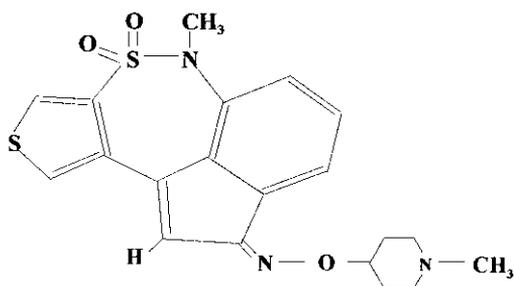
CP-14



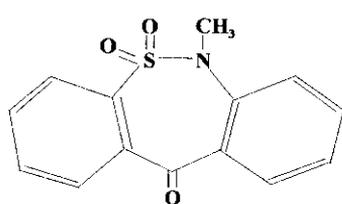
CP-17



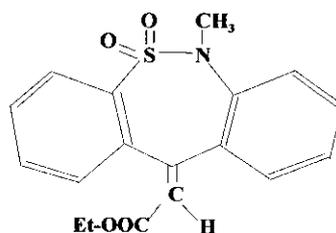
CP-42



CP-216



CP-5



CP-7

3.1.4.3. Farmacología experimental

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

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

3.1.5. REACTIVOS Y SOLUCIONES GENERALES

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

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

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

- NaCl 8,00 g
- HK₂PO₄ 1,21 g
- H₂KPO₄ 0,34 g
- H₂O 1000 cc
- pH : 7,3

5. Tampón citrato-fosfato

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

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

6. Sustrato revelador

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

Justo antes de su utilización añadir 4 μ l de H₂O₂ por cada 10 ml de solución. Esta solución se debe preparar fresca cada vez que se requiera, en un tubo protegido de la luz.

7. Solución de frenado (H₂SO₄ 3N)

SO ₄ H ₂ 98%	80 ml
Agua destilada c.s.p.	500 ml

8. Conjugado para ELISA

Inmunoglobulinas de cabra anti-IgG+M, IgG, IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃ de ratón marcadas con peroxidasa (CALTAG Laboratories).

3.2. MÉTODOS

3.2.1. CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VITRO*

1. Procedimiento

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

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

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

Los tubos se incuban en estufa de 37°C (5% CO₂). Al cabo de 5-6 horas, en el inicio de la fase exponencial, se dispensan los productos de síntesis (o extractos vegetales) en las concentraciones adecuadas al diseño de la prueba y se realiza el recuento de los controles.

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

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

a. Índice de crecimiento (I.C.)

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

b.1. Porcentaje de crecimiento (%C)

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

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

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

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

c. Porcentaje de reducción (%R)

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

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

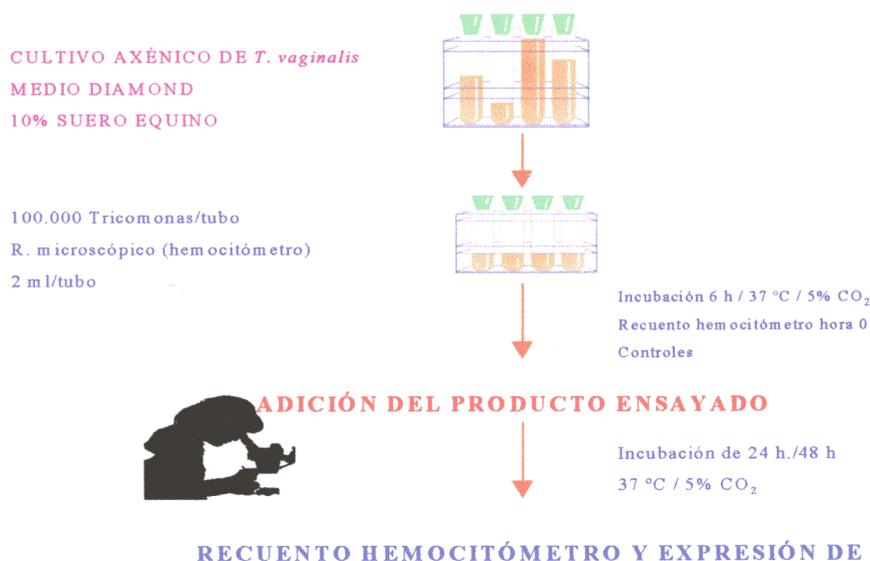


FIGURA 3.4. Metodología del cribado farmacológico *in vitro* frente a *T. vaginalis*

3. Preparación de los productos naturales o de síntesis ensayados

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

3.2.2. MODELO MURINO DE INFECCIÓN INTRAPERITONEAL

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

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

3.2.2.1. Preparación del inóculo

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

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

3.2.2.2. Pauta de inoculación

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

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

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

3.2.2.3. Necropsia y valoración de las lesiones

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

TABLA 3.1.a. Valoración de las lesiones y la mortalidad en el modelo de *T. vaginalis*

I.- MORTALIDAD DURANTE LA EXPERIENCIA	
- Ratones muertos al 3 ^{er} día p.i	50 puntos
- Ratones muertos al 4 ^o día p.i.	44 puntos
- Ratones muertos al 5 ^o día p.i.	38 puntos
- Por cada día de retraso 6 puntos menos.	
- Ratones muertos después del día 10 ^o p.i.	6 puntos
II.- LÍQUIDO ASCÍTICO	
- Menos de 1ml	2 puntos
- De 1 a 2 ml	4 puntos
- Más de 2ml	6 puntos
III.- PERITONEO Y GRASA PÉLVICA	
- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3	2 puntos
- Necrosis puntiforme múltiple y/o necrosis única de 3 a 5 mm de diámetro	4 puntos
- Necrosis múltiples de 3 a 5 mm y/o necrosis única de 5 a 10 mm de diámetro	6 puntos
- Necrosis extendida por toda la pelvis	8 puntos
- Necrosis diseminada en cavidad abdominal afectando el meso intestino y zona perirrenal	10 puntos

TABLA 3.1.b. Valoración de mortalidad y lesiones en el modelo de *T. vaginalis*(cont.)

IV.- BAZO, PÁNCREAS, ESTÓMAGO	
- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o esplenomegalia	2 puntos
- Necrosis puntiforme múltiple y/o necrosis única de 3 a 5 mm de diámetro	4 puntos
- Necrosis única de 5 a 8 mm	6 puntos
- Necrosis de 8 a 10 mm afectando a más de un órgano . . .	8 puntos
- Necrosis de 10 de 15 mm englobando a más de un órgano.	10 puntos
- Necrosis mayores de 15 mm que ocupan más de un órgano e interesando también a hígado y asas intestinales	12 puntos
V.- HÍGADO (CARA VISCERAL)	
- Necrosis puntiforme en número de 1 a 3 y/o fina capa superficial de fibrina sobre el lóbulo de Spigelio	2 puntos
- Necrosis de 3 a 5 mm y/o necrosis parcial del lóbulo de Spigelio o de los lóbulos ventrales derecho o izquierdo	4 puntos
- Necrosis de 5 a 8 mm y/o necrosis total del lóbulo de Spigelio o necrosis equivalente en los lóbulos ventrales dcho. o izq	6 puntos
- Necrosis de 8 a 10 mm	8 puntos
- Necrosis afectando a la mayor parte de la superficie	10 puntos

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

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

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

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

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

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

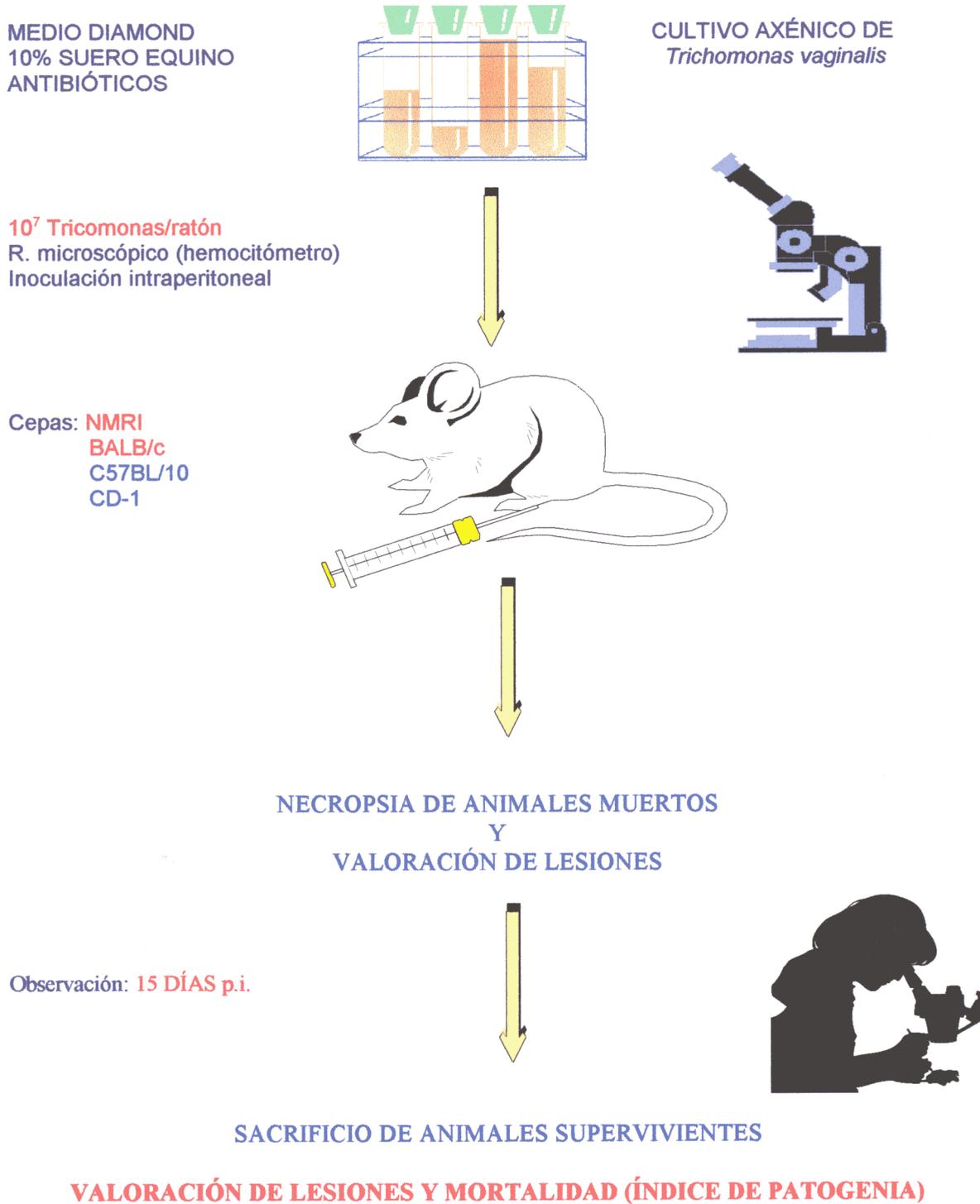


FIGURA 3.5. Metodología del ensayo de patogenia experimental de *T. vaginalis*.

3.2.3. CRIBADO FARMACOLÓGICO *IN VIVO*

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

El protocolo establecido empíricamente se puede esquematizar como sigue:

Día 0: Inoculación intraperitoneal de *Trichomonas vaginalis*.

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

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

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

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

3.2.4. DETERMINACIÓN DE LA PATOGENIA DE AISLAMIENTOS AUTÓCTONOS

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

3.2.6. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)

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

3.2.6.1. Infección experimental y obtención de sueros

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

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

3.2.6.2. Preparación del antígeno

Los cultivos de *T. vaginalis* en fase de crecimiento exponencial se centrifugaron a 2000 r.p.m. (350g), resuspendiendo el precipitado en un tampón Tris-HCl 1N, pH 6,0; posteriormente, se somete la suspensión a procesos de congelación y descongelación sucesivos en N₂ líquido, o bien, alternativamente, se sonica mediante pulsos de 10 segundos la muestra en un sonicador VIRTIS (VIRSONIC), manteniendo los tubos eppendorf en un baño de hielo.

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

3.2.6.3. Determinación de anticuerpos: Ig G + Ig M, Ig G, Ig G₁, Ig G_{2a}, Ig G_{2b} y Ig G₃.

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

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

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

A continuación, añadimos 100 µl de anti-inmunoglobulina de ratón marcada con peroxidasa a una dilución de 1/2000 (IgG e IgG+M) o 1/1500 (IgG₁, IgG_{2a}, IgG_{2b} e IgG₃) y se incuba una hora a 37 °C. Tras lavar tres veces con PBS-Tween 20 se añaden 100 µl de sustrato cromogénico (40 mg OPD + 100 ml Tampón citrato-fosfato + 40 µl H₂O₂). La incubación se realiza a temperatura ambiente y protegiendo la placa de la exposición directa a la luz. Una vez que se inicia la reacción coloreada, cuando la diferencia de color entre el control positivo y negativo es máxima y, antes de que los pocillos sin suero empiecen a adquirir color, se añaden 50 µl por pocillo de la solución de frenado (H₂SO₄, 3N).

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

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

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

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

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

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

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

B. Preparación de reactivos:

B.1. Tampón de lavado: Se añade el contenido completo del tampón de lavado 30x y se diluye hasta un volumen final de 1,5 litros con H₂O destilada o desionizada.

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

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

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

C. Estándares: Usar una hora después de su reconstitución. Si utilizas muestras de suero o plasma reconstituir el estándar con H₂O destilada. Reconstitución del estándar en el vial etiquetado: 4000 pg/ml el estándar será disuelto durante un minuto. Realizar una dilución seriada 1/4; 1000 pg/ml, 250 pg/ml, 62,5 pg/ml, 15,6 pg/ml.

3.2.7. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

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

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

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

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

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

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

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

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

De entre los posibles test no paramétricos se han utilizado:

- La prueba U de Mann-Whitney.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ABRIR EXPERIENCIAS Y RESULTADOS

