

Universidad CEU Cardenal Herrera

Departamento de Farmacia



**Eficacia y tolerabilidad de una  
nueva formulación de Anfotericina B en  
perros naturalmente infectados por  
*Leishmania***

TESIS DOCTORAL

Presentada por:

**D. Ibán González Álvarez**

Dirigida por:

Dra. Dña. M<sup>a</sup> Auxiliadora Dea Ayuela

Dra. Dña. Dolores Remedios Serrano López

VALENCIA  
2017





La Dra. M<sup>a</sup> Auxiliadora Dea Ayuela del Departamento de Farmacia de la Universidad CEU-Cardenal Herrera y la Dra. Dolores Remedios Serrano López de la Universidad Complutense de Madrid

CERTIFICAN:

Que el trabajo titulado “**Eficacia y tolerabilidad de una nueva formulación de Anfotericina B en perros naturalmente infectados por *Leishmania*”**, realizado en el Departamento de Farmacia de la Universidad CEU-Cardenal Herrera, en el marco del programa de doctorado en Ciencias de la Salud por D. Ibán González Álvarez, Licenciado en Veterinaria y dirigido por la Dra. M<sup>a</sup> Auxiliadora Dea Ayuela y la Dra. Dolores Remedios Serrano López, reúne todos los requisitos legales y académicos necesarios para que el interesado pueda optar al título de Doctor por dicha Universidad

Valencia, a 20 de Marzo de 2017

Dra. Dña. M<sup>a</sup> Auxiliadora Dea Ayuela

Dra. Dña. Dolores R. Serrano López



# AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a las Dras. M<sup>a</sup> Auxiliadora Dea Ayuela y Dolores Serrano López, por el enorme esfuerzo y paciencia que han tenido conmigo, así como la enorme cantidad de conocimientos que he adquirido y aún me quedan por adquirir de ellas. Por su enorme comprensión y dedicación, ya que sin ellas, este trabajo nunca hubiera sido posible, por haberme sabido guiar en este arduo y tedioso camino en el que a veces se convierte el trabajo del investigador, pero que sabiendo llevarse, en la mayoría de los casos obtiene su recompensa y satisfacción; de ellas he sabido apreciar y compartir el amor por la investigación.

A mis compañeros de laboratorio, por haberme aguantado todas esas tardes, haberme ayudado a encontrar todos los materiales necesarios, explicarme algún que otro aparato y todo ello siempre con una sonrisa en la cara.

Al Dr. Pablo Bilbao por su asesoramiento en la estadística.

A los miembros de la protectora de Valencia, por su apoyo desinteresado y su gran trabajo en el cuidado de estos perros desamparados.

A mi gran amigo Carlos por apoyarme en la elaboración de este trabajo en los momentos que más me costaba y darme siempre ánimos.

A toda mi familia por ayudarme desde que llegué a este mundo y por seguir haciéndolo aún ahora, sobre todo a mi querida madre, la persona que me ha inculcado todos los valores que poseo y gracias a la cual soy la persona en que me he convertido hoy en día, para que siga estando a mi lado por mucho tiempo.



## RESUMEN

La leishmaniosis es una zoonosis en la que distintas especies animales actúan como reservorio del parásito. El perro es el principal reservorio de la enfermedad sufriendo graves patologías que pueden llegar a ser letales en el animal. La leishmaniosis canina es endémica en todos los países de la Cuenca Mediterránea, aunque en las últimas décadas ha comenzado a extenderse además por la zona norte de Europa. En el momento actual no existe cura farmacológica, ya que con los tratamientos actuales (principalmente Glucantime<sup>®</sup> y alopurinol) se consigue reducir la carga parasitaria y mejorar los síntomas clínicos de la enfermedad, pero después de un determinado periodo de tiempo, se vuelven a producir recidivas. Por lo tanto, existe una necesidad clínica en el mundo veterinario de desarrollar nuevos fármacos o nuevas formulaciones de fármacos ya comercializados que sean capaces de mejorar la evolución de esta enfermedad en perros.

En la leishmaniasis, los parásitos se acumulan preferentemente en los macrófagos del sistema retículo endotelial. En este tipo de enfermedad, es interesante vectorizar el fármaco hacia el lugar donde se localizan los parásitos y por lo tanto, favorecer la opsonización y fagocitosis de los fármacos administrados por parte de los macrófagos, lo cual puede realizarse por medio de cambios en el estado de agregación, tamaño de partícula e hidrofobicidad de las partículas que se vayan a administrar por vía intravenosa.

El uso de la anfotericina B se encuentra relegado a un segundo plano en el tratamiento de la leishmaniosis canina, a pesar de ser el tratamiento de elección en casos de leishmaniasis visceral en humanos. Las formulaciones lipídicas comercializadas de anfotericina B (AmBiome<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup> y Abelcet<sup>®</sup>) en el momento actual son las que presentan un mejor perfil de seguridad en comparación con la anfotericina B convencional (Fungizona<sup>®</sup> o anfotericina B dimérica); sin embargo, el coste del tratamiento es bastante elevado, limitando el uso de anfotericina B en el mundo veterinario.

Por esta razón, el objetivo de esta tesis se ha centrado en la evaluación farmacocinética y farmacodinámica de una nueva formulación de anfotericina B poliagregada que sea segura y al mismo tiempo coste-efectiva con aplicación a nivel veterinario en el tratamiento de la leishmaniasis canina.

En los estudios farmacocinéticos realizados en perros Beagle sanos, se observó que con la formulación poliagregada aunque las concentraciones plasmáticas no fueron tan

elevadas como las obtenidas por el AmBisome<sup>®</sup>, sin embargo, se obtuvo un balance beneficio/riesgo favorable, ya que se pudieron administrar dosis de hasta 10 mg/kg sin que se observados efectos adversos agudos en los Beagles y además se mantuvieron en el organismo concentraciones eficaces durante periodos de hasta 15 días. Esto facilita establecer un régimen de administración más cómodo y no hace falta una administración diaria de dosis bajas como en el caso de la Fungizona<sup>®</sup> debido a su nefrotoxicidad.

Además, se evaluó el perfil farmacocinético de la formulación poliagregada encapsulada en microsferas de albúmina. Dicha formulación aunque parece que permitió vectorizar mejor la anfotericina B ya que presentó menor riesgo de interacciones con fármacos que se unen a proteínas plasmáticas en un alto porcentaje, sin embargo, presentó un balance beneficio/riesgo menor que la formulación poliagregada sin encapsular, debido al riesgo de producir reacciones anafilácticas.

Con la administración de tres dosis de 5 mg/kg cada quince días de anfotericina B poliagregada se mantuvieron concentraciones eficaces en el organismo siendo esta la pauta elegida para comenzar los estudios de eficacia en perros infectados de forma natural. Además, se incluyó otra segunda pauta de tratamiento con dosis ligeramente inferiores, que consistió en 4 mg/kg cada quince días.

Con ambas dosis, se consiguió la reducción de los síntomas clínicos (en torno al 40%) al final del tratamiento, siendo las lesiones cutáneas las que mejoraron en mayor medida en la mayoría de los perros objeto de estudio. Con la dosis de 5 mg/kg además, se consiguió una reducción de los títulos de anticuerpos más rápida que con la dosis de 4 mg/Kg.

En conclusión, la anfotericina B poliagregada es una formulación sencilla de preparar, coste-efectiva, fácilmente escalable a nivel industrial y que es capaz de mejorar los síntomas de la leishmaniosis canina pudiendo ser de gran aplicación en el ámbito veterinario.

## SUMMARY

Leishmaniosis is a zoonosis in which different animal species act as reservoir of the parasite. The dog is the main reservoir of the disease suffering serious pathologies that can become lethal in the animal. Canine leishmaniasis is endemic in all the countries of the Mediterranean Basin, although in the last decades it has begun to spread also in the northern part of Europe. At the present time, there is no pharmacological cure, since the current treatments (mainly Glucantime<sup>®</sup> and allopurinol) reduce the parasitic load and improve the clinical symptoms of the disease, but after a certain period of time, recidives occur. Therefore, there is a clinical need in the veterinary world to develop new drugs or new formulations of already marketed drugs that are capable of improving the evolution of this disease in dogs.

In leishmaniasis, the parasites preferentially accumulate in the macrophages of the reticulo-endothelial system. In this type of disease, it is interesting to target the drug to the place where the parasites are located and by means favour of the opsonization and phagocytosis of the drugs by the macrophages, which can be done through changes in the state of aggregation, particle size and hydrophobicity of the particles administered.

The use of amphotericin B is relegated in the treatment of canine leishmaniasis despite being the treatment of choice of visceral leishmaniasis in humans. The commercially available lipid formulations of amphotericin B (AmBiome<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup> and Abelcet<sup>®</sup>) are those with a better safety profile compared to conventional amphotericin B (Fungizone<sup>®</sup> or amphoteric B); however, the cost of treatment is quite high, limiting the use of amphotericin B in the veterinary world.

For this reason, the aim of this thesis has focused on the pharmacokinetic and pharmacodynamic evaluation of a new formulation of poly-aggregated amphotericin B that is safe and at the same time cost-effective with veterinary application in the treatment of canine leishmaniasis.

In the pharmacokinetic studies performed on healthy Beagle dogs, it was observed that with the poly-aggregated formulation although plasma concentrations were not as high as those obtained by AmBisome<sup>®</sup>, however, showed a favorable benefit / risk balance, since the formulation could be administered up to doses of 10 mg / kg without being observed acute adverse effects in the Beagles and in addition effective concentrations were maintained in the organism for periods of up to 15 days. This makes easier to establish a more convenient regimen of administration and does not require a daily administration of low doses as in the case of Fungizone<sup>®</sup> due to its nephrotoxicity.

In addition, the pharmacokinetic profile of the encapsulated poly-aggregated formulation in albumin microspheres was evaluated. Although this formulation appears

to have allowed better targeting of the drug (specially lower risk of interactions with drugs that bind to plasma proteins in a high percentage), it presented a lower benefit / risk balance than the free poly-aggregated formulation due to the risk of producing anaphylactic reactions.

The administration of three doses of 5 mg / kg every fifteen days of poly-aggregated amphotericin B led to effective concentrations that were maintained in the organism. For this reason, this was the regime chosen for the pharmacodynamics studies in naturally infected dogs. In addition, a second treatment regimen was included with slightly lower doses, which consisted on 4 mg / kg every fortnight.

With both doses, a reduction in the clinical symptoms (around 40%) was achieved at the end of treatment, being cutaneous lesions improved in most of the dogs under study. At the dose of 5 mg / kg, a reduction in the antibody titles was achieved faster than at the dose of 4 mg / kg.

In conclusion, the poly-aggregated amphotericin B is a simple, cost-effective formulation that is easily scalable at the industrial level and is capable of improving the symptoms of canine leishmaniasis and may be of great application in the veterinary field.

# ÍNDICE

<b>REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....</b>	<b>1</b>
MORFOLOGÍA DEL PARÁSITO.....	3
ENCUADRE TAXONÓMICO .....	5
CICLO BIOLÓGICO .....	6
EPIDEMIOLOGÍA .....	9
TRANSMISIÓN DE LA LEISHMANIOSIS CANINA .....	14
MANIFESTACIONES CLÍNICAS.....	15
INMUNOPATOLOGÍA.....	23
TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO EN PERROS .....	29
ANFOTERICINA B: ESTADOS DE AGREGACIÓN Y FORMULACIONES.....	38
DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO .....	54
<b>CAPÍTULO I. ESTUDIO FARMACOCINÉTICO DE ANFOTERICINA B POLIAGREGADA Y ENCAPSULADA EN MICROESFERAS DE ALBÚMINA .....</b>	<b>61</b>
ANTECEDENTES .....	63
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	64
MATERIAL Y MÉTODOS .....	65
RESULTADOS .....	76
<b>CAPÍTULO II. ESTUDIO FARMACODINÁMICO DE ANFOTERICINA B POLIAGREGADA .....</b>	<b>89</b>
ANTECEDENTES .....	91
OBJETIVOS E HIPÓTESIS.....	92
MATERIAL Y MÉTODOS .....	93
RESULTADOS .....	106
<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>159</b>
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>179</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>183</b>
<b>ARTÍCULOS .....</b>	<b>217</b>



# **REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA**

---



## MORFOLOGÍA DEL PARÁSITO

*Leishmania* es un parásito polimórfico que presenta dos formas, amastigotes en los mamíferos y promastigotes en el vector invertebrado (Peters *et al.*, 1987; Bañuls *et al.*, 2007)

Los amastigotes miden aproximadamente de 2-4  $\mu\text{m}$  de diámetro y se encuentran en el interior de las células fagocíticas de mamíferos, son ovoides e inmóviles, tienen un núcleo redondeado. El kinetoplasto de forma alargada se sitúa adyacente al núcleo, en el extremo distal dentro de una bolsa flagelar se encuentra un diminuto flagelo, y además en el citoplasma se observa el megasoma equivalente a un fagosoma.

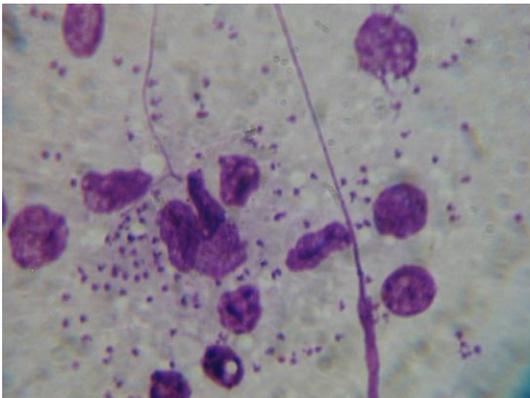


Fig 1. Amastigotes de *L.infantum* en una impronta de hígado

Los promastigotes miden de 5-20  $\mu\text{m}$  de largo y 1-4  $\mu\text{m}$  de ancho se encuentran en el intestino del mosquito. Presentan un núcleo central, un kinetoplasto y una bolsa flagelar que contiene en este caso un flagelo alargado y grande (Bates & Rogers, 2004).



Fig 2. Promastigotes de *L.infantum* en cultivo

Ambas formas presentan las estructuras propias de un eucariota, con algunas características propias. Presentan una membrana plasmática tapizada por un glucocálix formado por un conjunto de moléculas ancladas a la membrana a través de estructuras glucosil fosfatidilinositol (GPI) (Englund, 1993), que están relacionadas con la capacidad de invasión del parásito. Las principales moléculas que forman este glucocálix son una glicoproteína de 63 kDa (gp63) y el lipofosfoglicano (LPG).

La gp63, también conocida como leishmanolisina o metaloproteasa de superficie, es la proteína más abundante en los promastigotes de *Leishmania* (Yao *et al.*, 2003) y en menor proporción en los amastigotes.

Diferentes estudios han demostrado que la gp63 desempeña un papel crucial en la fijación y procesamiento del complemento, protegiendo a *Leishmania* en la entrada y permanencia en las células hospedadoras (Joshi *et al.*, 2002).

La abundancia y elevada actividad catalítica de este factor de virulencia (Kulkarni *et al.*, 2006) favorecen la diseminación del parásito a medida que digiere los constituyentes de la matriz extracelular del hospedador, como el colágeno tipo IV, la fibronectina o la laminina (McGwire *et al.*, 2003).

Además, los fragmentos de la fibronectina procesada por la gp63 pueden proteger a los parásitos dentro de los macrófagos, ya que atenúan la producción de intermediarios reactivos del oxígeno y favorecen la proliferación de los amastigotes (Kulkarni *et al.*, 2008).

Por otro lado, el lipofosfoglicano (LPG) es otro glucoconjugado, implicado en el anclaje del parásito al macrófago y a las microvellosidades intestinales del insecto, y en la inhibición de la respuesta oxidativa y la producción de óxido nítrico por parte del macrófago (Turco & Descoteaux, 1992). En el promastigote, está presente en un número muy elevado de copias, mientras que es poco abundante en el amastigote.

Además, presentan un glucosoma, que es un orgánulo exclusivo de los Kinetoplastidos que alberga las enzimas de las primeras etapas de la glucólisis y

presenta cierta similitud con los peroxisomas y glioxisomas de los eucariotas (Opperdoes & Michels, 1993).

## ENCUADRE TAXONÓMICO

La primera descripción que se hizo de *Leishmania* fue publicada por Leishman en 1903, quien observó la presencia de una serie de cuerpos ovals dentro de las células en la tinción de una punción obtenida del bazo de un paciente. Este paciente era un militar retirado que había estado destinado en la India, y que había ingresado en el Hospital Netley, donde trabajaba Leishman, mostrando como síntomas, fiebre, anemia y aumento del tamaño del bazo. Paralelamente, Charles Donovan confirmó estos hallazgos en diversos pacientes en Madrás (India). Ese mismo año, Sir Ronald Ross (director del Instituto Británico de Enfermedades Tropicales), propuso el nombre de *Leishmania donovani* para este protozoo (Bailey & Bishop, 1959).

La organización taxonómica se inició en 1916 basándose en criterios extrínsecos como la ecobiología, geografía, manifestaciones clínicas, vector, cultivo *in vitro*, y el reservorio. Lainson y Shaw en 1979 propusieron la separación taxonómica sub-específica, de los subgéneros, basándose en la localización en el intestino del vector: hipopilaria, en la que el parásito se desarrollarían en el intestino medio y posterior del vector (subgénero *sauroleishmania*), peripilaria para aquellos que tienen una fase de reproducción en la parte anterior, media y posterior del intestino (subgénero *viannia*) y suprapilaria, los que no llega al intestino posterior, pero se multiplican en el intestino medio antes de su migración al intestino anterior (subgénero *leishmania*). (Lainson & Shaw, 1987; Lainson *et al.*, 1979).

Posteriormente, en la última década del siglo XX, la clasificación taxonómica se realizó mediante el uso de análisis isoenzimático, agrupando las especies en complejos con zimodemas idénticos (Rioux *et al.*, 1990).

Actualmente, basándose en criterios moleculares, la clasificación queda de la siguiente manera (Bañuls *et al.*, 2007).

REINO	PROTOZOA (Cavalier-Smith 2002, 2003)	
SUBREINO	BICILIATA (Cavalier-Smith & Chao, 2003)	
INFRA-REINO	EXCAVATA (Cavalier-Smith 2002)	
SUPERFILO	DISCICRISTATA (Cavalier-Smith 1993)	
FILO	EUGLENOZOA (Cavalier-Smith, 1981)	
CLASE	KINETOPLASTEA (Honigberg, 1963 stat. nov. Margulis, 1974)	
ORDEN	TRYPANOSOMATINA (Kent, 1880 stat nov. Hollande, 1952)	
FAMILIA	TRYPANOSOMATIDAE (Doflein, 1901, Grobber, 1905)	
GÉNERO	<i>LEISHMANIA</i> (Ross, 1903)	
SUBGÉNERO	<i>LEISHMANIA</i>	<i>VIANNIA</i>
COMPLEJO	<i>donovani, tropica, major, aethiopica, mexicana</i>	<i>braziliensis, guyanensis, naffy, lainsoni</i>

Tabla 1. Clasificación taxonómica, basada en Cavalier-Smith, Honigberg, Vickerman, Kent, Doflein y Ross, adaptado de Bañuls *et al.*, 2007.

## CICLO BIOLÓGICO

En el ciclo biológico de *Leishmania* intervienen un hospedador vertebrado y otro invertebrado. En el hospedador invertebrado se observan formas promastigotes extracelulares en el epitelio intestinal de los vectores de la familia *Phlebotominae*. En el hospedador vertebrado cambia su morfología a amastigote, forma intracelular obligada de las células del sistema fagocítico mononuclear.

Se han descrito aproximadamente 80 especies de insectos dípteros de la familia *Plebotominae* como posibles vectores de *Leishmania*, sin embargo parece que solamente 30 especies de 2 géneros tienen importancia clínica, *Phlebotomus* en el viejo mundo y *Lutzomyia* en el nuevo mundo.



Fig 3. *Phlebotomus*, vector de *Leishmania*

Cuando un flebotomino hembra no infectado con *Leishmania* pica en la dermis o epidermis de mamíferos infectados con *Leishmania*, ingurgita sangre con células infectadas con amastigotes, estos se liberan en el estómago del mosquito y se adhieren a las microvellosidades de la pared luminal del intestino, después de un periodo aproximado de 24 horas se observan algunas formas promastigotes procíclicos que segregan quitinasa que les permite escapar de la matriz peritrófica e invadir el intestino medio, donde se transforman en promastigotes nectomonados que infectan el intestino medio y después de 48 horas cambian su morfología nuevamente a promastigote haptomona con capacidad de adhesión en las microvellosidades del epitelio intestinal para finalmente madurar a promastigotes metacíclicos infectantes que se anclan preferentemente en la hipofaringe y probóscide del mosquito, listos para infectar a un nuevo hospedador vertebrado. El ciclo continua cuando este flebotomino infectado al alimentarse lesiona la epidermis, dermis y vasos capilares del hospedador vertebrado, produciendo un ligero hematoma en el mamífero, posteriormente ingurgita sangre y regurgita desde la probóscide o intestino medio, entre 10 y 1000 promastigotes metacíclicos, aproximadamente.

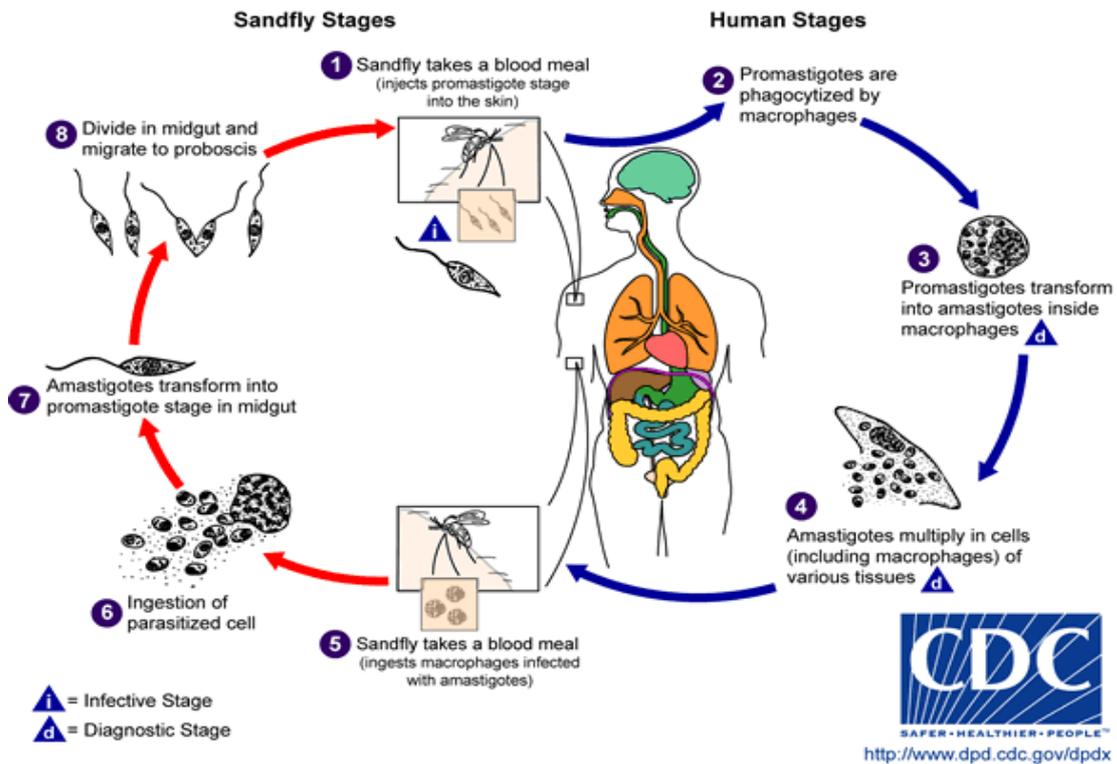


Fig 4. Ciclo biológico de *Leishmania* spp.  
Tomado del Center for Disease Control. USA.  
<http://www.dpd.cdc.gov/DPDx/HTML/Leishmaniasis.htm>

Estos promastigotes libres en el tejido dérmico se adhieren al macrófago preferentemente por su flagelo, a continuación penetran dentro del macrófago probablemente como resultado de la fagocitosis o por invasión del propio parásito, donde el macrófago intenta eliminarlo mediante la secreción de metabolitos derivados de oxígeno, óxido nítrico, lisozimas, e hidrolasas lisosomales, pero *Leishmania* tiene la capacidad de evadir la acción inmunológica inespecífica del macrófago transformándose en amastigote, el cual queda englobado dentro de una vacuola parasitófora, donde se multiplica activamente, Cuando el macrófago está repleto de parásitos se rompe, y los amastigotes liberados son capaces de invadir otras células fagocíticas (Peters *et al.*, 1987; Alvar-Ezquerro, 2001; Vannier-Santos *et al.*, 2002; Bates & Rogers, 2004).

## EPIDEMIOLOGÍA

La Organización Mundial de la Salud (OMS) considera que las leishmaniosis se encuentran distribuidas en Norte y Sudamérica, Europa, África y Asia y que son endémicas en las regiones tropicales y subtropicales de 98 países. Según esta misma organización, la leishmaniosis constituye la segunda causa de mortalidad en el hombre entre las enfermedades parasitarias, estimándose una prevalencia mundial de doce millones de casos y se cree que la incidencia anual oscila entre 1,5-2 millones de nuevos casos para las leishmaniosis cutáneas y 500.000 nuevos casos para la leishmaniosis visceral (OMS, 2014).

En Europa se ha descrito una leishmaniosis zoonótica visceral (LV) y cutánea (CL) causada por *L. infantum*, que tiene al perro como principal reservorio; otra forma de leishmaniosis cutánea antroponótica causada por *L. tropica*, que se produce de forma esporádica en Grecia. Y más recientemente, se ha descrito *L. donovani*, considerada como antroponótica y que se ha identificado en Chipre, donde ha causado casos tanto de leishmaniosis visceral como cutánea (Antoniou *et al.*, 2008; Gradoni, 2013).

En España, *Leishmania infantum* es la especie responsable, siendo la forma visceral la manifestación más frecuente. De forma general afecta fundamentalmente a adultos jóvenes, asociándose en un 43% de los casos a estados de inmunosupresión, existiendo en el 27,8% de los casos coinfección con VIH (Alvar *et al.*, 1997; OPS, 2006).

Desde el año 1996 hasta el 2011, en España la incidencia media anual notificada estuvo alrededor de 0,45 casos/100.000 habitantes. En este periodo, las mayores cifras de incidencia se registraron en la Comunidad Autónoma de Baleares, donde se llegaron a alcanzar tasas de incidencia de 4,72 y 4,59/100.000 hab. en 2005 y 2006, respectivamente. Durante ese periodo, otras comunidades autónomas como Valencia, Madrid, Andalucía o Cataluña mostraron tasas de incidencia superiores a la media. La primera alcanzó su valor máximo en 2003 con 0,70 casos/100.000 hab, Madrid en

2004 con 0,59/100.000, Andalucía 0,65/100.000 hab. en 2007 y, finalmente, Cataluña con 0,48/100.000 hab. en 2004. En los años 2010 y 2011 se observó un incremento significativo, como consecuencia de los casos notificados por la Comunidad de Madrid, asociados al brote que ha estado teniendo lugar en municipios de suroeste de la Comunidad (Amela *et al.*, 2012). Este brote comenzó en julio de 2009 y hasta el momento se han registrado cerca de 700 casos, afectando tanto a individuos inmunocompetentes como inmunosuprimidos (Horrillo *et al.*, 2015; Jimenez *et al.*, 2013).

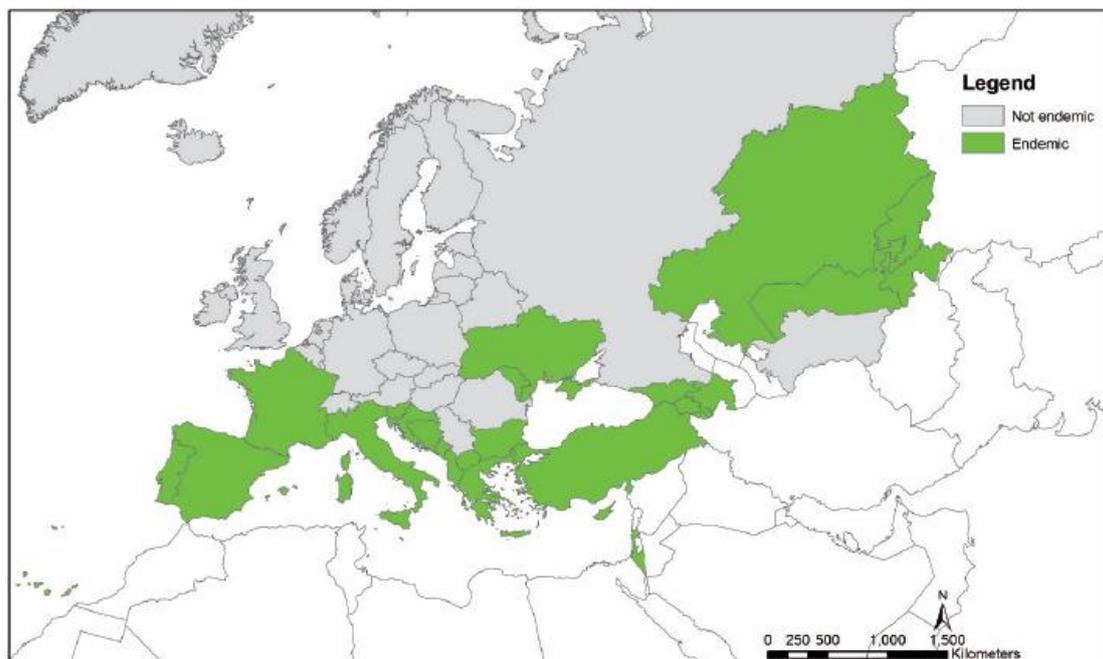


Fig 5. Areas endémicas y no endémicas de leishmaniosis en Europa. Fuente: WHO Regional Office for Europe, 2014.

La leishmaniosis es una zoonosis en la que distintas especies animales actúan como reservorio del parásito. El perro es el principal reservorio de la leishmaniosis causada por *L. infantum*, (Gramiccia & Gradoni, 2005), sufriendo graves patologías que pueden llegar a ser letales en el animal.

La leishmaniosis canina es endémica en todos los países de la Cuenca Mediterránea, España, Francia, Portugal, Italia, Grecia, Croacia, Albania, Chipre, Turquía y Malta (Dujardin *et al.*, 2008; Ready, 2017)

En los últimos años se ha producido un aumento de los casos de leishmaniosis canina en el norte de Europa. Diversos autores consideran que la aparición de estos casos se debe al calentamiento global y a la contigüidad territorial que favorecería la transmisión vectorial (Maia & Cardoso, 2015), pero también a la importación y/o adopción de animales infectados desde países endémicos (Ready, 2017) o a la posibilidad de que exista una transmisión congénita (Naucke & Lorentz 2012). En estos países considerados tradicionalmente como no endémicos, la leishmaniosis canina ha pasado a ser una enfermedad emergente (Antoniou *et al.*, 2013).

Recientemente, diversos estudios han demostrado la presencia de *Leishmania* en gatos, caballos y otros animales de compañía, lo que supondría la necesidad de reorientar las formas de control y prevención (Pennisi, 2015). Así, en base a estudios epidemiológicos empleando técnicas serológicas y/o moleculares, se sabe que la infección en felinos es frecuente en áreas endémicas pero inferior a la observada en perros (Chatzis *et al.*, 2014; Miró *et al.*, 2014)

Además, el parásito se ha encontrado en animales salvajes, como lagomorfos (Molina *et al.*, 2012), roedores (Papadogiannakis *et al.*, 2010; Helhazar *et al.*, 2013), murciélagos en Sudamérica (De Lima *et al.*, 2008; Savani *et al.*, 2010), chacales, zorros, lobos, ginetas y linceos (Muñoz-Madrid *et al.*, 2013). Esta situación parece sugerir que existe un ciclo epidemiológico silvestre independiente del que se produce entre el perro y el hombre (Sobrino *et al.*, 2008).

En nuestro país se estima que el 1-37 % de los perros pueden estar infectados (Alvar *et al.*, 2004; Miró *et al.*, 2008).

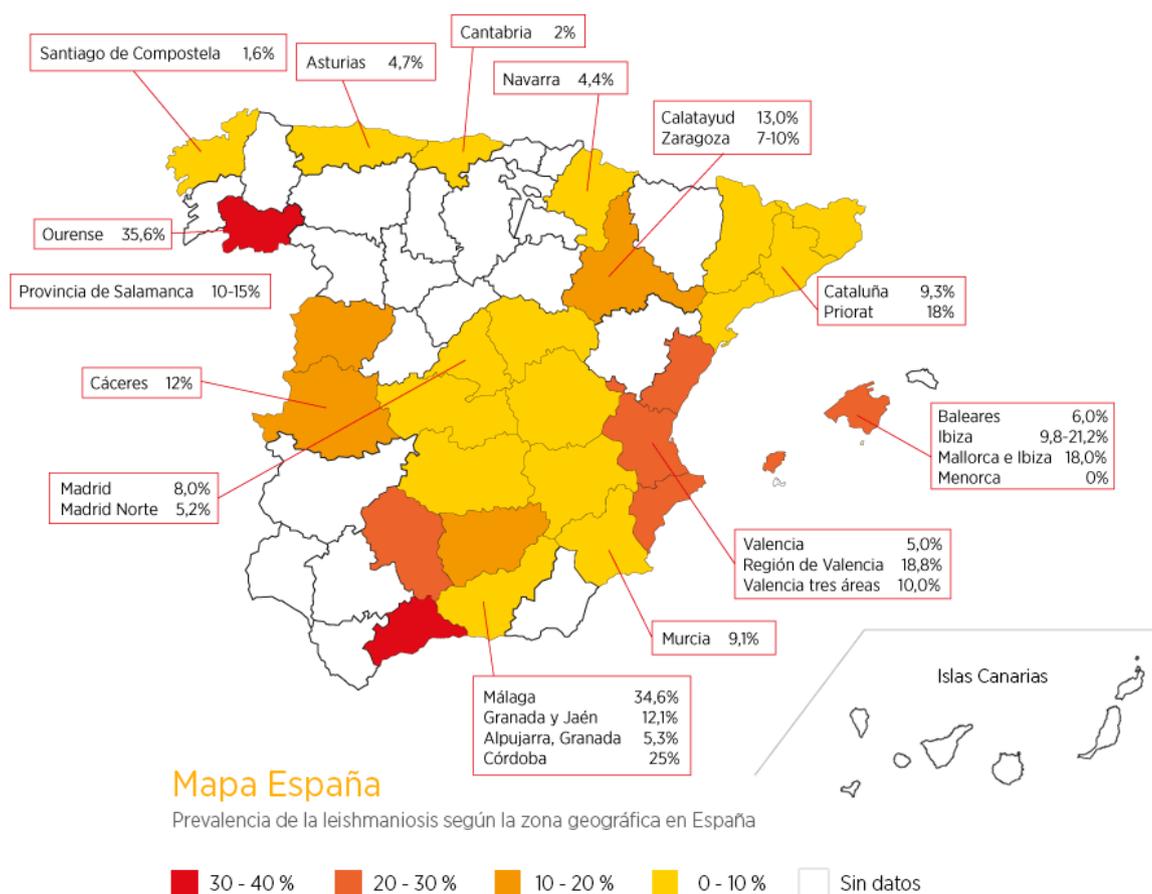


Fig 6. La incidencia de la leishmaniosis canina varía de unas zonas a otras, dependiendo de factores ambientales como son temperatura, humedad y situación geográfica. Tomado de Miró *et al.*, 2012.

La mayoría de los perros infectados con *Leishmania* no desarrollan síntomas clínicos o alteraciones clínico-patológicas. Los perros sintomáticos son en general seropositivos, sin embargo, los perros que son portadores sanos o asintomáticos no suelen desarrollar anticuerpos. Teniendo en cuenta que la mayoría de las encuestas epidemiológicas de leishmaniosis canina se suelen realizar mediante serodiagnóstico, la prevalencia real de la enfermedad es bastante más elevada que la seroprevalencia (Baneth *et al.*, 2008). Así, diversos estudios realizados en España en los que la seroprevalencia oscilaba entre el 10-26%, mostraron mediante técnicas de biología molecular una prevalencia de la enfermedad entre dos y tres veces superior (Solano-Gallego *et al.*, 2001; Fernández-Bellón *et al.*, 2008) y mediante la detección de

inmunidad celular específica se han detectado prevalencias de hasta un 65% (Cardoso *et al.*, 1998; Solano-Gallego *et al.*, 2000).

A pesar de las prevalencias elevadas registradas por las distintas técnicas, el 90-95% de los perros infectados por *L. infantum* no desarrollan signos clínicos ni alteraciones clinicopatológicas, siendo la prevalencia de la enfermedad frecuentemente inferior al 10% en regiones endémicas (Solano-Gallego *et al.*, 2009).

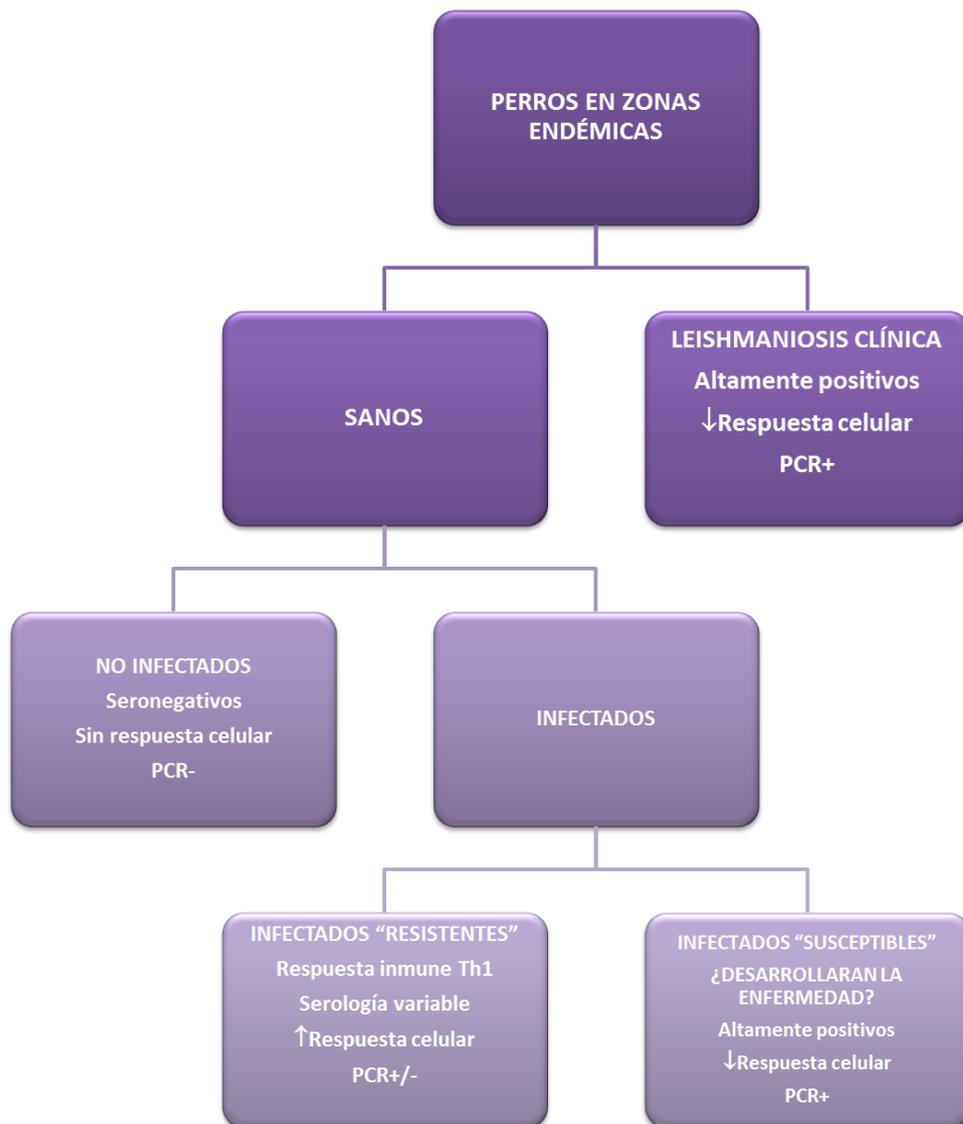


Fig 7. Estados clínicos y tipo de respuesta inmune en perros de zonas endémicas de *Leishmania infantum* endemic infection área (Modificado de Solano-Gallego *et al.*, 2009).

## TRANSMISIÓN DE LA LEISHMANIOSIS CANINA

Los insectos de la subfamilia Phlebotominae, son los únicos artrópodos capaces de ser vectores eficaces de la transmisión de *Leishmania* spp.

Se han descrito más de 800 especies de flebotominos, sin embargo, tan sólo 93 son vectores, probables o probados, de *Leishmania* (OMS, 2014).

Los flebotomos se encuentran ampliamente distribuidos en regiones templadas del planeta, y se han encontrado en los cinco continentes. Esta distribución se puede ver modificada en función de factores ambientales y ecológicos, detectándose recientemente flebotomos en zonas consideradas como libres de estos insectos (Ready, 2010)

Es suficiente un pequeño porcentaje de flebotomos portadores de *L.infantum* para mantener la transmisión en áreas endémicas, así, se ha detectado incluso una transmisión efectiva con un porcentaje de flebotomos infectados del 0,4% (Martín-Sánchez *et al.*, 2006).

El proceso de transmisión no solo depende de la densidad de población de vectores, sino de que coincidan en el tiempo con un elevado número de canidos (Quinnell *et al.*, 1997).

En los países de la Cuenca Mediterránea las especies de *Phlebotomus* implicadas son *P.ariasii*, *P.perniciosus*, *P.neglectus*, *P.tobbi*, *P.kandelakii* y *P.balcanicus* (Alten *et al.*, 2016).

En los países mediterráneos la densidad de los vectores varía mucho, no solo según la zona, sino también de forma estacional, incluso no coincidiendo entre la misma estación en años diferentes. Fenómenos meteorológicos locales, como el fuerte viento, o la lluvia intensa reducen la producción de huevos por los adultos y además la dureza del invierno afectan al desarrollo de las larvas y por tanto al número de insectos que aparecen en primavera (Alten *et al.*, 2016).

En zonas endémicas, los flebótomos son capaces de inocular entre 10-500 promastigotes junto con los metabolitos de la saliva en la dermis del hospedador (Maia *et al.*, 2011). Además, se ha podido determinar que un animal puede recibir cientos de picaduras durante la noche (Gradoni, 2002), lo que hace aumentar enormemente la probabilidad de que se produzca la transmisión del parásito.

Diversos autores han señalado la capacidad vectorial de otros artrópodos hematófagos, como las pulgas de los gatos (*Ctenocephalides felis felis*), las garrapatas (*Rhipicephalus sanguineus*) (de Moraes *et al.*, 2013; Paz *et al.*, 2013) o mosquitos del género *Culicoides* (Dougall *et al.*, 2011; Slama *et al.*, 2014).

## MANIFESTACIONES CLÍNICAS

Una de las características más notables de las leishmaniosis es la diversidad de enfermedades causada por agentes morfológicamente similares. Esta diversidad no está totalmente explicada por la diversidad genética de los parásitos. Además, está generada en parte por la variedad en la respuesta del hospedador a la infección y en parte por la restricción de los parásitos a partes u órganos específicos del cuerpo. (Ashford, 2000; Alvar, 2001; Alvar *et al.*, 2006)

### Manifestaciones clínicas en el hombre

Las principales variedades clínicas de las leishmaniosis en humanos son las siguientes:

- **Leishmaniosis cutánea**, causada por *L. tropica*, *L. major*, *L. aethiopica*, *L. mexicana*, *L. amazonensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis*, *L. peruviana* o *L. braziliensis*, pero puede ser causada por cualquiera de las especies de *Leishmania* que infectan al hombre. Se caracteriza por una lesión cutánea simple, o leishmanioma, en el sitio de la picadura del díptero. Normalmente es autolimitante, aconteciendo como un problema trivial y no hay manifestaciones sistémicas.

- **Leishmaniosis cutánea difusa**, causada por *L. aethiopica* o *L. amazonensis*. Los parásitos están restringidos a la piel pero se distribuyen por toda la superficie formando placas o nódulos. No hay respuesta humoral ni celular, es difícil de tratar y puede durar el resto de la vida del paciente.
- **Leishmaniosis mucocutánea**, causada normalmente por *L. braziliensis*. Después de meses o años de una lesión cutánea, los parásitos se metastatizan por vía linfática hacia la oronasofaringe. Se forman lesiones nodulares que evolucionan a úlceras. Al final se perfora el tabique y se produce una deformación de la nariz llamada “nariz de tapir”. Otras veces la lesión mucosa empieza en el paladar blando con posterior destrucción de la úvula.
- **Leishmaniosis visceral o Kala-azar**. Parece estar ampliamente restringida a niños en el caso de *L. infantum*, aunque a veces es menos dependiente de la edad como en la causada por *L. donovani*. También afecta a individuos de todas las edades que sufren enfermedades inmunosupresoras. En ambos casos, el curso de la enfermedad se sabe que está muy relacionado con el estado de salud del paciente en el momento de la infección y diversos estudios han demostrado que la malnutrición exagera la infección por *L. infantum*. La infección comienza en el sitio de la picadura apareciendo a veces una lesión primaria o leishmanioma. En ocasiones, puede ser simplemente una lesión autolimitante sin que se produzca enfermedad visceral. La forma visceral se desarrolla típicamente después de un periodo de incubación variable y se acompaña por fiebre en grado irregular y persistente. Una vez establecida la enfermedad, su desarrollo puede ser bastante variable: los síntomas severos pueden ser muy agudos con progresión rápida de enfermedad en dos semanas o la progresión puede ser insidiosa, casi sin notarse, hasta que los síntomas abdominales se convierten en más importantes. La esplenomegalia es el signo más notable; el bazo aparece muy agrandado y su tamaño se enfatiza al ir acompañado de caquexia. La hepatomegalia es menos consistente y menos extrema, pero se presenta normalmente en caso terminales.

El cuadro hematológico se altera considerablemente con anemia y leucopenia, que son los cambios más significativos.

- **Leishmaniosis dérmica post-kala-azar (LDPK)**, está causada por *L. donovani*, después de la cura de una leishmaniosis visceral inicial y es característica del subcontinente indio, aunque se observa ocasionalmente en África oriental. No está asociada a la infección por *L. infantum*.

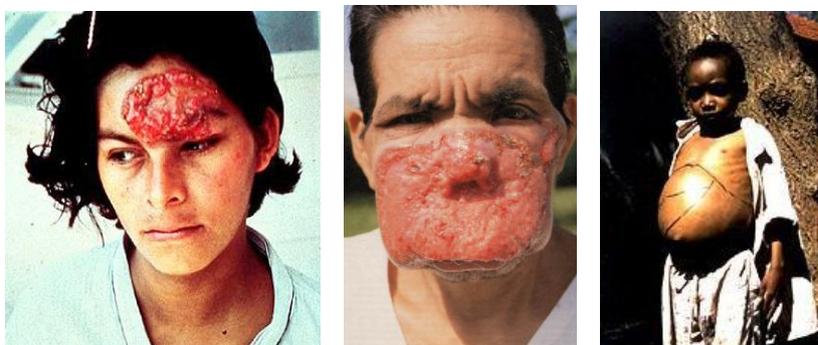


Fig 8. Diferentes manifestaciones de la leishmaniosis, de izquierda a derecha:  
Cutánea, mucocutánea y visceral

### Manifestaciones clínicas en el perro

En la leishmaniosis canina la gravedad del cuadro clínico es muy variable y va a depender de diversos factores dependientes tanto del hospedador como del parásito, como es la virulencia de la cepa causante de la infección, el tiempo de evolución, los órganos afectados, la terapéutica aplicada pero especialmente el estado inmunitario del animal. El periodo de incubación es largo y puede oscilar entre varios meses e incluso más de un año. (Manciati *et al.*, 1988; Molina *et al.*, 1994; Alvar *et al.*, 2004).

Actualmente los perros infectados se clasifican según la sintomatología. Se habla de perros con leishmaniosis clínica cuando el animal presenta signos clínicos y/o

alteraciones clínico-patológicas y perros con infecciones subclínicas, portadores sanos o asintomáticos cuando no presentan signos clínicos al examen físico ni alteraciones clínico-patológicas en los exámenes de laboratorio, pero se les ha confirmado la infección por el parásito (Solano-Gallego & Baneth, 2008; Baneth *et al.*, 2008)

Los principales hallazgos encontrados en el examen físico son lesiones cutáneas, linfadenomegalia generalizada, pérdida de peso progresiva, atrofia muscular, intolerancia al ejercicio, disminución del apetito, letargia, esplenomegalia, poliuria, polidipsia, lesiones oculares, epistaxis, onicogriposis, vómitos o diarreas.

(Ciaramella *et al.*, 1997; Baneth *et al.*, 2008)



Fig 9. En los estados avanzados de la enfermedad los síntomas más característicos son la pérdida de peso, la atrofia muscular y la onicogriposis.

Sin embargo, es importante tener en cuenta que, en las áreas endémicas, la aparición de uno solo de los síntomas señalados debe ser motivo para realizar diagnóstico diferencial con otras posibles causas (Koutinas *et al.*, 1999).

Los cuadros clínicos se pueden clasificar en dos grandes grupos: lesiones cutáneas localizadas o generalizadas y los trastornos generales, con síntomas específicos e inespecíficos. (Miró & Molina, 2006; Paltrinieri *et al.*, 2010).

### **Lesiones cutáneas**

➤ Formas localizadas.

La leishmaniosis cutánea localizada se ha definido como un “chancro de inoculación”. Este chancro es la lesión cutánea primaria, producida por el vector en el punto de inoculación. Consiste en una lesión asimétrica aprurítica, que aparece a los 20 días de la infección y que sufre una evolución con tres fases clínicas diferentes: eritemo-escamosa, ulcero-costrosa, de mayor tamaño que la fase anterior, y lesión pre-cicatricial. La localización suele ser en zonas desprovistas de pelo: trufa, pabellón auricular, labios, zona glabra del abdomen, etc.

La duración media de la lesión es de seis meses, periodo durante el cual la mayor parte de los animales son seronegativos.

➤ Formas generalizadas: coinciden con la diseminación orgánica del parásito. Pueden presentarse diversas formas clínicas (Ciaramella *et al.*, 1997).

- Forma queratoseborreica: caracterizada por la aparición de lesiones alopécicas y descamativas difusas, generalmente simétricas y apruríticas. Inicialmente se localizan en la cabeza y en las extremidades, extendiéndose progresivamente al resto del cuerpo.
- Forma nodular: aparición de nódulos únicos o múltiples, ulcerados o no, apruríticos e indoloros. Generalmente, de escaso tamaño, y localizados con mayor frecuencia en zonas de la piel exentas de pelo.

- Forma pápulo-costrosa: menos frecuente. Se trata de una erupción generalizada, no pruriginosa, cuyas lesiones asemejan a una foliculitis bacteriana, con pústulas estériles.
- Otras formas cutáneas son: hiperqueratosis nasales y plantares, perionixis y onicogriposis y ulceraciones en las uniones mucocutáneas. Las lesiones histopatológicas observadas a partir de biopsias de las lesiones cutáneas corresponden, en la mayoría de los casos, a una dermatitis difusa de tipo granulomatoso. (Font *et al.*, 1996).

### **Trastornos generales**

- Síntomas inespecíficos:
  - Adelgazamiento, astenia e inapetencia: originando en casos extremos caquexia en el animal.
  - Atrofia muscular: sobre todo facial (temporales y maseteros).
  - Anemia no regenerativa.
  - Linfadenomegalia localizada o generalizada, que es el signo más frecuentemente observado en los perros afectados, junto con la pérdida de peso.
- Síntomas específicos:
  - Alteraciones renales: el depósito de inmunocomplejos en los glomérulos renales genera una glomerulonefritis, inicialmente de carácter agudo y reversible, pero que a medida que la enfermedad avanza, puede evolucionar a una glomerulonefritis intersticial con alteración de la membrana basal y de los glomérulos, instaurándose una insuficiencia renal, con un incremento de la urea y creatinina en sangre, proteinuria grave y anemia. Este cuadro clínico, de

mal pronóstico, suele ser la causa más frecuente de muerte en los animales con leishmaniosis.

- Alteraciones hepáticas: la presencia de parásitos en el hígado da lugar a una hepatitis de carácter granulomatoso, con un incremento de las enzimas hepáticas y una sintomatología típica consistente en vómitos, adelgazamiento, poliuria-polidipsia, ascitis, etc.
- Alteraciones digestivas: mucho menos frecuentes. Se trata de diarreas del intestino grueso que pueden verse acompañadas de melena, y que corresponden a una colitis ulcerativa granulomatosa provocada por el acúmulo de parásitos en la mucosa intestinal.
- Lesiones oculares: las más frecuentes son lesiones inflamatorias de carácter granulomatoso del segmento anterior (blefaritis, conjuntivitis, uveitis y queratitis o sus asociaciones) (Peña *et al.*, 2000).

En el segmento posterior pueden presentarse con menor frecuencia hemorragias retinianas, coriorretinitis o desprendimiento de retina. En raras ocasiones, la uveitis hipertensiva puede desencadenar un glaucoma, de mal pronóstico.

- Poliartritis: se consideran erosivas en los estados crónicos de la enfermedad, y se deben a la respuesta inmunitaria del animal afectado.
- Hemorragias: epistaxis, hematuria, melena, etc...

Tabla 2. Estadios clínicos de la leishmaniosis canina basados en el estado serológico, signos clínicos, hallazgos de laboratorio, y el tipo de terapia y pronóstico (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Estadio clínico	Serología*	Signos clínicos	Hallazgos de laboratorio	Tratamiento	Pronóstico
<b>Estadio I Enfermedad Leve</b>	Negativa o títulos positivos muy bajos	Perros con signos clínicos leves como linfadenomegalia Periférica o dermatitis papular	Normalmente no se observan anormalidades Clinicopatológicas  Perfil normal renal de creatinina <1,4 mg/dl UPC < 0,5 no proteinúrica	Alopurinol o antimonio de meglumina o miltefosina/ Alopurinol + antimonio de Meglumina o Alopurinol + miltefosina**	Bueno
<b>Estadio II Enfermedad Moderada</b>	Títulos de anticuerpos de bajos a positivos	Perros con los signos clínicos del estadio I y que pueden presentar lesiones cutáneas simétricas o difusas como dermatitis/ onicogriposis exfoliativa, ulceraciones (en el plano nasal, almohadillas plantares, prominencias óseas, uniones mucocutáneas), anorexia, pérdida de peso, fiebre, y epistaxis.	Anormalidades clinicopatológicas como leve anemia no regenerativa, hiperglobulinemia hipoalbuminemia síndrome de hiperviscosidad del suero <b>Subestadios</b> a) Perfil normal de creatinina < 1,4 mg/dl UPC < 0,5 no proteinúrica b) Creatinina <1,4 mg/dl; UPC=0,5-1	Alopurinol + Antimonio de meglumina o Alopurinol + miltefosina	Bueno o reservado
<b>Estadio III Enfermedad grave</b>	Niveles medios o altos de anticuerpos	Perros, que a parte de tener los signos de los estadios I y II, pueden presentar signos derivados de las lesiones causadas por los inmunocomplejos vasculitis, uveítis y glomerulonefritis	Anormalidades clinicopatológicas enumeradas en el estadio II Enfermedad renal crónica (ERC) IRIS Estadio I con UPC > 1 o estadio II (creatinina 1,4-2 mg/dl)	Alopurinol + antimonio de meglumina o alopurinol + miltefosina Seguir las guías IRIS de la ERC	Reservado a malo
<b>Estadio IV Enfermedad muy grave</b>	Niveles medios o altos de anticuerpos	Perros con los signos clínicos enumerados en el estadio II. Tromboembolismo pulmonar, síndrome nefrótico y enfermedad renal terminal	Anormalidades clinicopatológicas enumeradas en el estadio II ERC IRIS (creatinina 2-5 mg/dl) y estadio IV (creatinina > 5mg/dl) Síndrome nefrótico con marcada proteinuria UPC > 5	Únicamente alopurinol Seguir guías IRIS para ERC	Malo

\*Perros con niveles de anticuerpos de negativos a medios deben confirmarse como infectados mediante otras técnicas diagnósticas como la citología, histología, inmunohistoquímica o PCR. Los niveles altos de anticuerpos, definidos como la elevación 3-4 veces sobre el nivel de corte por un laboratorio de referencia son concluyentes para el diagnóstico de Leishmaniosis canina

\*\*Perros en estadio I (enfermedad leve) requieren un tratamiento menos prolongado con uno o dos medicamentos

## INMUNOPATOLOGÍA

En el perro se han establecido dos tipos de respuesta inmune (Bourdoiseau *et al.*, 1997; Barbieri, 2006).

-Una respuesta celular eficaz, basada en la producción de linfocitos Th1 que producen IFN- $\gamma$  e IL-2, potentes activadores de macrófagos y de la muerte de los amastigotes intracelulares en colaboración con TNF- $\alpha$  (Vouldoukis *et al.*, 1996).

Este tipo de respuesta solo se observa en un porcentaje inferior al 10% de los perros enfermos, a estos animales se les considera “resistentes”, no presentando anticuerpos, pero con una respuesta proliferativa específica de las células T frente a antígenos de *Leishmania*. Este fenómeno es similar al que aparece en personas inmunocompetentes frente a la infección por *L.infantum*.

-Respuesta humoral ineficaz, propia de la mayoría de los perros afectados o “susceptibles” que se basa en la inducción de los linfocitos Th2 supresores, productores de IL-4 e IL-10, que dan lugar a la estimulación de los linfocitos B, provocando hipergammaglobulinemia inespecífica, con producción masiva de anticuerpos anti-*Leishmania* no protectores y con células T negativas. Se trata de una reacción de hipersensibilidad de tipo III con formación de abundantes inmunocomplejos, responsables de la mayoría de los síntomas más graves.

Aunque existe una estrecha relación entre los elevados niveles de IL-10 y el desarrollo de la leishmaniosis visceral en humanos (Nylen & Sacks, 2007), esta asociación no es tan clara en la leishmaniosis canina. Diversos estudios en los que se determinaban los niveles de IL-10 en tejidos (Quinnell *et al.*, 2001) o en suero (Solano-Gallego *et al.*, 2009) encontraban niveles similares de IL-10 en los tejidos de perros naturalmente infectados y de animales sanos. Tampoco parece haber diferencias en la producción de esta citoquina entre perros asintomáticos, oligosintomáticos y polisintomáticos (Carrillo *et al.*, 2007). Por tanto, no parece que la IL-10 tenga un papel inmunoregulador en la leishmaniosis visceral canina.

Respecto a la polarización de las respuestas Th1 o Th2, entre ambas puede existir una amplia gama de posibilidades. En una primera fase, de duración variable, se producen ambas repuestas, con expresión de citoquinas de ambas vías, hasta que por motivos desconocidos, se polariza en un sentido u otro. Así, de un 20 a un 50% de los perros tendría una respuesta Th2 con progresión a enfermedad patente, y el resto mantendría un estado de tolerancia (Alvar, 2001).

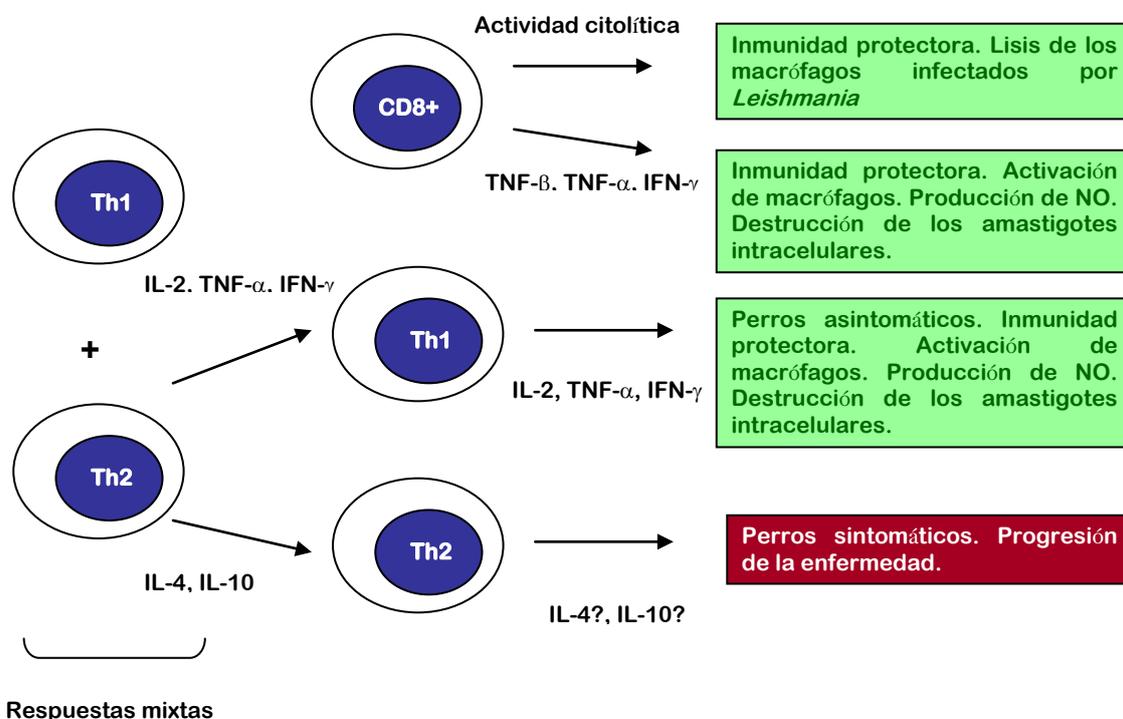


Fig 10. Representación esquemática de la regulación inmune por los tipos de células Th y las células T citotóxicas en la leishmaniosis canina visceral. Una respuesta mixta Th1-Th2 temprana puede dirigirse hacia una inmunidad protectora o a una respuesta Th2 con exacerbación de la enfermedad. Citoquinas como IL-12 pueden activar la respuesta Th1 y las células CD8+, desarrollando una actividad citotóxica y secretando citoquinas activadoras de macrófagos.

En los casos en que la respuesta inmune no es eficaz, se produce la diseminación del parásito principalmente a los órganos hematopoyéticos (bazo, médula ósea), donde continua la replicación del parásito, y desde aquí, su diseminación al resto de los órganos (piel, riñón, hígado, tubo digestivo, ojos, articulaciones, etc) (Miró & Fraile, 1999).

Las lesiones producidas en los animales enfermos se deben a varios mecanismos inmunopatogénicos: (Miró & Molina, 2006).

- Reacciones inflamatorias de carácter granulomatoso: son las responsables de la sintomatología cutánea (Ordeix *et al.*, 2005), las alteraciones digestivas (las diarreas del intestino grueso están relacionadas con el excesivo infiltrado en las placas de Peyer por la presencia de amastigotes de *Leishmania* que dificultan la digestión y la absorción), las lesiones articulares y oculares.

- Liberación de citoquinas por los macrófagos: responsables de los trastornos generales de la enfermedad (fiebre, adelgazamiento, astenia, atrofia muscular, etc.).

- Producción de inmunocomplejos y de infiltrado de macrófagos y células plasmáticas que se depositan en el glomérulo renal, los vasos sanguíneos y articulaciones y van a ser los responsables de la glomerulonefritis (Costa *et al.*, 2003), casos atípicos de vasculitis y algunas de las lesiones oculares más graves (como uveitis).

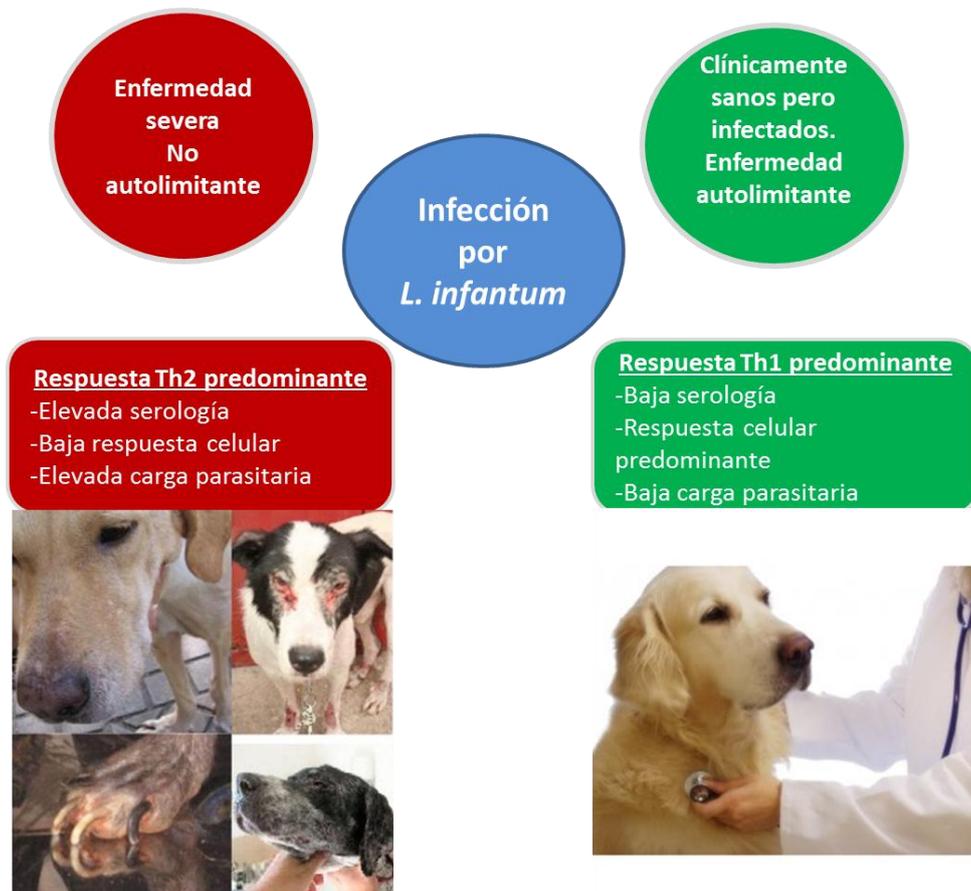


Fig 11. Manifestaciones clínicas y características inmunológicas en perros infectados por *L. infantum*. Modificado de Solano-Gallego *et al.*, 2011.

La genética parece que tiene influencia a la hora de determinar la resistencia a la leishmaniosis clínica; por ejemplo, en perros de caza ibicencos, la prevalencia de casos de enfermedad es mucho menor que en otras razas y esta característica se ha asociado a una mayor reactividad de las células inmunes (Solano-Gallego *et al.*, 2000).

Un hecho muy significativo en la leishmaniosis canina es, la caída progresiva de linfocitos CD4+ entre el sexto y el octavo mes después de la infección coincidiendo con la aparición de sintomatología. Además, se considera que la inmunosupresión específica frente a la infección en los animales “sensibles” se debe, en parte, a la ausencia de linfocitos T CD4+, mientras que los CD8+ no sufren ningún cambio. Es por ello que ciertos autores consideran que el valor del cociente CD4+/CD8+ es un

parámetro importante en el diagnóstico de la leishmaniosis, invirtiéndose en los perros enfermos o “sensibles” (Moreno *et al.*, 1999).

Además, en los animales susceptibles se observan bajos niveles de IFN- $\gamma$ , lo que puede deberse a una disminución de la población CD4+, lo que conlleva una falta de capacidad para proliferar frente a los antígenos crudos del parásito y a un estado inmunológico del animal próximo a la inmunosupresión (Moreno *et al.*, 1999).

Desde las primeras semanas también se observa un aumento en los linfocitos CD28+ que son precursores de los linfocitos B, por lo que se exagera la respuesta humoral. Además, al igual que en los humanos, esta alta producción de inmunoglobulinas va a favorecer al parásito ya que los anticuerpos facilitan su fagocitosis por parte del macrófago (Slappendel, 1988).

Existen numerosos estudios que hacen referencia al análisis de diferentes proteínas como posibles candidatos vacunales (Foroughi-Parvar & Hatam, 2014; Kumar & Engwerda, 2014; Alcolea *et al.*, 2016; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2017; Santos *et al.*, 2017), sin embargo, muy pocos hacen énfasis en el valor diagnóstico de los antígenos reconocidos por el sistema inmune durante la infección.

Una de las proteínas más importantes de *Leishmania* y más ampliamente estudiada es la gp63, que participa en la invasión de los promastigotes en los macrófagos, es altamente inmunogénica en perros y en humanos y está involucrada en la protección frente a *L.infantum* (Rhalem *et al.*, 1999). Se ha tratado de emplear en el diagnóstico de la leishmaniosis visceral en humanos (Gicheru & Olobo, 1994), aunque con poco éxito.

En la leishmaniosis canina, además, se ha encontrado una respuesta temprana frente a los antígenos de 29 y 50-57 KDa, detectándose las bandas de 34-35.4 y 26 KDa solo durante la fase aguda de la enfermedad (Carrera *et al.*, 1996).

La banda de 26 KDa podría estar relacionada con la eficacia del tratamiento ya que desaparece después del tratamiento, apareciendo en ese momento dos proteínas de 85 y 110 KDa (Fernández-Pérez *et al.*, 1999; Lasri *et al.*, 2003). Por otro lado, en

perros tratados con antimonio de meglumine se ha visto un descenso en la intensidad de las bandas en la región de 12-30 KDa (Riera *et al.*, 1999).

Más recientemente, en un estudio en el que se trató a los perros con miltefosina, se determinó mediante western-blot, un grupo de proteínas antigénicas entre 116 y 29 kDa, este perfil fue modificándose a lo largo de los 300 días que duró el estudio, tanto de forma cuali- como cuantitativa. Así, se observó que algunas proteínas se dejaban de reconocer tras el tratamiento, mientras que aparecían otras bandas más intensas, especialmente las correspondientes a proteínas de 116, 97, 66 y 46 kDa (Andrade *et al.*, 2011).

Tal como se ha indicado previamente, en el perro se han descrito dos grupos de animales, aquellos que desarrollan una respuesta inmune celular eficaz y que presentan bajos niveles de anticuerpos y por tanto control de la infección y otro grupo de animales que presentan una producción anormalmente alta de anticuerpos, con generación de IgG e IgE no protectoras que se correlacionan con sintomatología clínica y progresión de la enfermedad (Reis *et al.*, 2006).

Los subtipos de inmunoglobulinas IgG1 e IgG2 han sido propuestos como indicadores de la dicotomía en la respuesta por anticuerpos frente a la infección canina por *L. infantum* ya que existe una relación entre los niveles de IgG1 e IgG2 y la progresión de la enfermedad. Se ha observado una correlación directa entre los altos niveles de IgG1 y la aparición de síntomas clínicos en perros infectados, mientras que las IgG2 estarían asociadas con las formas asintomáticas. (Desplazes *et al.*, 1995; Nieto *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2001). Aunque otros autores encuentran un aumento de IgG2 en perros sintomáticos (Cavaliere *et al.*, 1999; Boceta *et al.*, 2000; Solano-Gallego *et al.*, 2000; Leandro *et al.*, 2001; Cardoso *et al.*, 2007; de Freitas *et al.*, 2012). Si bien, se ha sugerido una revisión de los anti-anticuerpos comerciales usados, ya que ha habido cierta controversia en el correcto reconocimiento de los isotipos caninos (Day, 2007).

En cualquier caso, parece que, en los animales sintomáticos, los anticuerpos prevalentes son IgG1 e IgG2, pero que tras la administración del tratamiento, se observa una disminución de los niveles de IgG1, aunque los niveles de IgG2 se mantienen de forma constante (Day, 2007; Coura-Vital *et al.*, 2011).

Además, se ha determinado que en el inicio de la enfermedad, cuando hay baja parasitemia, aparecen niveles elevados de IgG, pero de baja avidéz, y que al progresar hacia la forma clínica con alta parasitemia, aparecerían altos niveles de anticuerpos (especialmente IgG2) pero con una elevada avidéz (Teixeira Neto *et al.*, 2010).

## **TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO EN PERROS**

Los compuestos más ampliamente usados en el tratamiento de la leishmaniosis canina y que están comercializados específicamente en Europa para uso veterinario son el antimonio de meglumine (Glucantime<sup>®</sup>), Aminosidina/paromomicina (Gabbriomycin<sup>®</sup>) y la miltefosina (Milteforan<sup>®</sup>).

### **FÁRMACOS DE PRIMERA LÍNEA**

#### **1. Antimoniales pentavalentes**

Los más habituales son el antimonio de meglumine y el estiboglucanto sódico. El mecanismo de acción de los antimoniales pentavalentes no está descrito completamente, pero la hipótesis más aceptada es la óxido-reducción de los SbV a SbIII, estando involucrados muy posiblemente los grupos tiol de las moléculas de cisteína en esta conversión (Croft & Yardley, 2002). Esta conversión es favorecida por la presencia de trypanotona, enzima de los trypanosomatidos encargada de los procesos de detoxificación. Parece ser que la forma SbIII, no solo causa la inhibición enzimática de procesos metabólicos esenciales (Balaña-Fouce *et al.*, 1998), además

altera el balance redox del sulfuro, responsable de la prevención de los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) en el parásito (Wyllie *et al.*, 2004).

Otros autores consideran que tienen capacidad de formar complejos con los nucleótidos, interfiriendo en el metabolismo e inhibiendo la topoisomerasa del parásito, hipótesis sustentada por el hecho de que los nucleótidos y polinucleótidos presentan elevado número de funciones oxigenadas y nitrogenadas, que los convierte en potenciales ligandos de iones metálicos. Estos protozoos son incapaces de sintetizar purinas y utilizan rutas alternativas que tienen como punto de partida la translocación de purinas pre-formadas. Esta estrategia de elevar la producción de purinas en *Leishmania* puede contribuir a la formación de complejos SbV-purina, que inhibirían la síntesis de ADN (Ferreira Cdos *et al.*, 2003).

Los antimoniales son fármacos parenterales, lo que hace que deban ser administrados lentamente por vía subcutánea, intravenosa o intramuscular.

En el perro la pauta posológica más frecuentemente aplicada es 75-100 mg/Kg de peso durante 4-8 semanas por vía subcutánea (Valladares *et al.*, 1996; Valladares *et al.*, 1998; Guarga *et al.*, 2002; Noli & Saridomichelakis, 2014). Sin embargo, se han descrito otros protocolos de administración, en los que hay periodos de descanso en el tratamiento: 100 mg/Kg/día, vía intramuscular durante 3 ciclos de 15 días de tratamiento con un intervalo de 7-10 días de descanso entre ellos (Arboix & Valladares, 1997).

Entre los efectos secundarios de los antimoniales se incluye la nefrotoxicidad, especialmente importante ya que una de las manifestaciones clínicas más frecuentes en perros es la glomerulonefritis y que habría que tener en cuenta para determinar el riesgo de toxicidad (Koutinas *et al.*, 1999).

En el tratamiento con los antimoniales pueden aparecer signos de “estibointolerancia” (que se manifiestan tras las primeras administraciones y remiten al suspender la terapia) o “estibotoxicidad” (que aparecen al final del tratamiento). Estos signos pueden manifestarse con la aparición de fiebre, tos persistente, apatía, inapetencia,

problemas en el sistema musculoesquelético y trastornos gastrointestinales (Moritz *et al.*, 1998). Al contrario que en los humanos, en los perros no aparecen como efectos adversos alteraciones electrocardiográficas, ni alteración de los niveles de troponina cardíaca (Luciani *et al.*, 2013)

A pesar de que numerosos estudios indican unas marcadas mejorías de la sintomatología clínica, los antimoniales tienen una baja eficacia en cuanto a alcanzar la cura parasitológica (Desplazes *et al.*, 1992; Riera *et al.*, 1999).

Además, en los últimos años el uso de los antimoniales se ha visto reducido por la aparición de resistencias a gran escala tanto en humanos como en perros (Faraut-Gambarelli *et al.*, 1997; Gramiccia *et al.*, 1992), posiblemente debido a una disminución de la concentración del principio activo dentro del parásito, bien por una disminución de la entrada, un incremento de la salida o por la inhibición de la activación del mismo (Ashutosh *et al.*, 2007).

Por otro lado, se han ensayado formulaciones de SbV en liposomas, que presentan una serie de ventajas en relación a las formas convencionales: una mayor eficacia leishmanicida, ya que los liposomas son capturados inmediatamente por los macrófagos y una menor toxicidad por su diferente comportamiento farmacocinético (Valladares *et al.*, 2001). Se ha observado además que el compuesto alcanza elevadas concentraciones en órganos diana como hígado, bazo o médula ósea, cuando se administra en pequeños liposomas (Schettini *et al.*, 2006).

## 2. Alopurinol

El alopurinol (4-hidroxipirazol 3,4-d pirimidina) es un análogo de purinas, usado habitualmente para el tratamiento de la hiperuricemia. Fue utilizado por primera vez frente a la leishmaniosis en los años 80. Este compuesto es metabolizado por *Leishmania* y produce análogos inactivos de inosina, que es incorporado al ARN del parásito, causando alteraciones en la transducción de proteínas (Berman, 1988; Manna *et al.*, 2009)

El alopurinol se comporta como un leishmanioestático, de forma que consigue buenos resultados en la remisión de los signos clínicos (Liste & Gascon, 1995; Vercammen *et al.*, 1995) pero no consigue la cura parasitológica (Koutinas *et al.*, 2001). Se suele utilizar en el tratamiento de la leishmaniosis canina ya sea solo (monoterapia) o en combinación con antimoniales pentavalentes debido a su baja toxicidad, su eficacia en la mejora de la sintomatología clínica, el bajo costo y a que se puede administrar por vía oral. Actualmente las dosis recomendadas son 10 mg/kg durante al menos 6-12 meses por vía oral, tanto en los tratamientos combinados con antimoniales como en monoterapia. (Cavaliero *et al.*, 1999; Koutinas *et al.*, 2001; Plevraki *et al.*, 2006)

### **3. Antimoniales pentavalentes en combinación con alopurinol**

El tratamiento de primera línea en la leishmaniosis canina es la combinación de antimoniales pentavalentes y alopurinol. Esta combinación permite disminuir la duración del tratamiento con antimoniales, consiguiéndose una mayor tolerabilidad, a la vez que reduce el costo de dicho tratamiento y retarda la aparición de recidivas (Denerolle & Bourdoiseau, 1999; Baneth & Shaw, 2002).

Aunque existen diferentes protocolos terapéuticos en cuanto a la dosis, el intervalo de dosis y la duración del tratamiento (Noli & Auxilia, 2005), el protocolo más frecuentemente usado es 75-100 mg/kg vía subcutánea (en 2 dosis diarias) durante 4-8 semanas y alopurinol (10 mg/Kg vía oral durante 6-12 meses)

A pesar de conseguirse una buena tasa de remisión clínica, esta combinación no consigue la cura parasitológica, aunque si reduce la infectividad de los perros positivos para los vectores (Alvar *et al.*, 1994).

#### 4. Alquilfosfocolina (Miltefosina)

Es un hexadecilfosfocolina, que fue desarrollada inicialmente como un anticancerígeno, pero estudios posteriores han demostrado su eficacia frente a *Leishmania* (Croft *et al.*, 1996). Interfiere con la membrana celular sin interactuar con el ADN y modula la permeabilidad y fluidez de la membrana, la composición de los lípidos de membrana, el metabolismo de los lípidos y las señales de transducción (Sundar *et al.*, 2002).

Por si misma no es tóxica frente a *Leishmania*, pero aumenta la activación de macrófagos y células T y la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno con actividad microbicida (Croft & Coombs, 2003). Parece ser que la miltefosina promueve una respuesta Th1-dependiente de IL-12 en perros (Manna *et al.*, 2008b) que induce un aumento de  $\gamma$ -IFN en sangre (Andrade *et al.*, 2011). Esto va a estimular la producción de especies reactivas de oxígeno y NO por parte de los macrófagos dentro de las vacuolas parasitóforas (Balaña-Fouce *et al.*, 2012), lo que mata a los parásitos y contribuye a los efectos leishmanicidas de este compuesto.

La naturaleza de zwitterion de la miltefosina es debida a una amina cuaternaria cargada positivamente y a un grupo fosforil cargado negativamente, lo que le permite disolverse en agua. Esto es enormemente ventajoso en relación a otros fármacos frente a *Leishmania*, ya que puede ser administrado por vía oral (Reguera *et al.*, 2016).

Aunque está recomendado en el tratamiento de las formas viscerales en humanos se han observado graves complicaciones como trombocitopenia (Singh *et al.*, 2006). En el perro su uso en monoterapia, consigue una disminución de la carga parasitaria en los tejidos, pero aparecen relapsos con un brusco incremento de dicha carga (Manna *et al.*, 2008; Mateo *et al.*, 2009). Las dosis recomienda actualmente es de 2mg/kg/día durante 30 días (Noli & Saridomichelakis, 2014). En cuanto a su farmacocinética en el perro se ha observado que el proceso de absorción a nivel intestinal tras su

administración oral es muy lento y presenta una biodisponibilidad muy elevada (94%), además la vida media de eliminación se estima que es de 159 h, con un bajo aclaramiento plasmático. Como consecuencia, el nivel de acumulación en sangre es 5 a 6 veces más tras administraciones repetidas. La miltefosina se acumula en riñón, mucosa intestinal, hígado y bazo (Sindermann & Engel, 2006).

Como efectos adversos, en los perros, se ha observado dolor intestinal, vómitos, diarrea, anorexia, disminución del hematocrito y del recuento de globulos blancos (Mateo *et al.*, 2009), así como efectos teratogénicos (Sindermann & Engel, 2006).

Debido a que en los perros no se consigue el aclaramiento parasitario de la médula ósea (Mateo *et al.*, 2009), en la práctica veterinaria se está recomendando su uso combinado con otros fármacos.

El uso combinado con alopurinol, por el contrario, si parece reducir la carga parasitaria (Manna *et al.*, 2009; Miro *et al.*, 2009).

Se ha descrito la aparición de resistencias *in vitro* mediante “presión farmacológica”, aunque no está bien descrita *in vivo*. Su larga vida media puede contribuir a la selección de cepas en el hospedador, lo que se vería favorecido por la administración de dosis sub-óptimas o una insuficiente duración del tratamiento (Manna *et al.*, 2009).

## **FÁRMACOS DE SEGUNDA ELECCIÓN**

### **1. Domperidona**

La solución oral de domperidona para uso veterinario se ha incluido recientemente en la prevención de la leishmaniosis canina (Sabaté *et al.*, 2014). La domperidona es un benzimidazol antiemético usado en humanos para paliar los vómitos que aparecen en los tratamientos oncológicos. La domperidona promueve la liberación de prolactina desde la hipófisis, lo que aumenta la respuesta inmune innata, contribuyendo a la activación de la respuesta Th1 con producción de  $\gamma$ -IFN, IL-2, IL-12 y TNF- $\alpha$  (Majumder *et al.*, 2002), esto provoca la desactivación de la respuesta Th2.

Se administra oralmente para prevenir la leishmaniosis canina a dosis de 0,5 mg/kg/día durante 4 semanas (Gómez-Ochoa *et al.*, 2012), se consigue reducir los síntomas y los títulos de anticuerpos pero no la cura parasitológica. El uso de tratamientos más prolongados parece reducir el riesgo de desarrollar la enfermedad (Sabaté *et al.*, 2014)

No parece presentar efectos adversos importantes, raramente apatía y desórdenes digestivos (dolor abdominal, diarreas, pérdida de apetito), cambios en la glándula mamaria. Además, no presentan alteraciones cardiacas como en los humanos (Rossi & Giorgi, 2010)

## 2. Paramomicina/aminosidina

Es un antibiótico aminoglucósido producido por *Streptomyces rimosus* que se ha utilizado para el tratamiento de la leishmaniosis visceral en humanos en África y Europa (Chunge *et al.*, 1990; Scott *et al.*, 1992). Ha demostrado ser un fármaco efectivo, barato y seguro en el tratamiento de la leishmaniosis visceral humana en combinación con miltefosina (Croft & Olliaro, 2011).

Su acción farmacológica se basa en inhibir la síntesis de proteínas en el parásito al actuar sobre varias proteínas ribosomales del parásito (Jhingran *et al.*, 2009). Además, parece actuar sobre el sistema inmune del hospedador (Chawla *et al.*, 2011).

Debido a su farmacodinamia y farmacocinética, se recomienda una administración diaria a una dosis de 15-20 mg/kg de peso durante tres semanas (Vexenat *et al.*, 1998; Athanasiou *et al.*, 2013).

Con la paramomicina se consigue la remisión clínica de la mayoría de los signos clínicos más relevantes, se restauran los parámetros hematológicos y bioquímicos de forma similar a los antimoniales o al alopurinol, pero no los niveles de albúmina. Sin embargo, mantiene bajo control la carga parasitaria y reduce los títulos de anticuerpos. Como inconveniente se pueden producir relapsos tras 50-100 días tras el tratamiento y

además es extremadamente nefrotóxica y no se podría administrar a perros con alteraciones renales (Poli *et al.*, 1997).

### 3. Anfotericina B

El agente antifúngico anfotericina B ha sido ampliamente reconocido como fármaco leishmanicida. Es un macrólido poliénico producido por el actinomiceto *Streptomyces nodosus*. Actúa principalmente uniéndose al ergosterol en las membranas celulares, alterando así la permeabilidad del potasio intracelular. Los lípidos representan hasta el 15% del peso de *Leishmania* y, de ellos, los lípidos neutros como los esteroides y ésteres de esteroles, son muy abundantes. La anfotericina B tiene fuerte actividad leishmanicida al unirse a ellos, provocando pérdida de potasio, aminoácidos y purinas (Berman, 1988). Además, potencia la cascada de iones del oxígeno del macrófago, con lo que aumenta el efecto leishmanicida (Sokol-Anderson *et al.*, 1986). Tiene menos afinidad por el colesterol, el principal esteroles en las células de mamíferos, pero induce nefrotoxicidad a través de vasoconstricción renal, y posiblemente también por acción directa en las células epiteliales renales. A pesar de la nefrotoxicidad, la anfotericina B está siendo cada vez más usada como fármaco de elección tanto en la leishmaniosis humana asociada al VIH, como en los casos de resistencia a los antimoniales pentavalentes (Walker *et al.*, 1998), pasando a ser de primera elección en los casos de leishmaniosis visceral en zonas altamente endémicas con aparición de resistencias (Chappuis *et al.*, 2007).

La anfotericina B ha sido empleada en la terapia de la leishmaniosis canina tanto en su forma libre como en formulaciones lipídicas. La dosis total acumulada efectiva en perros va desde 8 a 26 mg/Kg, administrada tanto subcutánea como intravenosamente en dosis de 0.5 mg/Kg 2-3 veces, semanalmente. Sin embargo, la dosis total de anfotericina B administrada a perros con leishmaniosis esta frecuentemente limitada por la toxicidad renal.

Tabla 3. Protocolos actuales en el tratamiento de la leishmaniosis canina (Solano-Gállego et al., 2009).

Protocolo	Fármaco y pauta posológica	Efectos principales	Referencia
Primera línea	Antimoniato de N-metil glucamina (75-100 mg / kg / DIM) durante 4-8 semanas, S.C. + alopurinol (10 mg / kg / BID) durante al menos 6-12 meses P.O.	Nefrotoxicidad potencial y abscesos cutáneos / celulitis (Antimoniato de N-metilglucamina)  Urolitiasis (Alopurinol)	Denerolle & Bourdoiseau (1999), Ikeda-García y col. (2007) Manna y col (2008) Cavaliero y col. (1999), Koutinas y col (2001), Pennisi y col. (2005) Plevraki y col. (2006)
2 <sup>a</sup> línea	Miltefosina (2 mg / kg / DIM) durante 4 semanas P.O. + Alopurinol (10 mg / kg / BID) durante al menos 6-12 meses, P.O.  Alopurinol (10 mg / kg / BID) al menos 6-12 meses, P.O.	Vómitos, diarrea (miltefosina)  Urolitiasis  Urolitiasis	Manna y col. (2008) y Miró y col. (2009)  Cavaliero y col. (1999), Koutinas y col. (2001), Pennisi y col (2005b) y col. Plevraki y col. (2006)
3 <sup>a</sup> línea	Anfotericina B (0,5-0,8 mg / kg, IV / SID / dos veces por semana) durante 2 meses  Anfotericina liposomal* (3 mg / kg / SID) durante 5 días consecutivos, I.V.  Metronidazol (25 mg / kg / SID) + espiramicina (150.000 U / SID) durante 3 meses P.O.  Marbofloxacina (2 mg / kg / SID, 1 mes, P.O.	Nefrotoxicidad  Nefrotoxicidad transitoria  No se han descrito  No se han descrito	Lamothe (2001) y Cortadellas (2003)  Oliva et al. (1995)  Pennisi y col. (2005)  Rougier y col. (2008)

PO: vía oral; SC: subcutánea; IV: intravenosa.

SID: Una vez al día; BID: Dos veces al día

\*No recomendados por la OMS para uso veterinario, para evitar farmacorresistencias

## ANFOTERICINA B: ESTADOS DE AGREGACIÓN Y FORMULACIONES

La anfotericina B (AmB) es un antibiótico de color amarillo-anaranjado, obtenido a nivel industrial a partir de determinadas cepas de *Streptomyces nodosus* (Villa, 2012; Lemke *et al.*, 2005). En 1956, se describe por primera vez, la utilización de la AmB en humanos para el tratamiento de candidiasis cutáneas (Kozinn, 1956). Sin embargo, su uso en humanos se generaliza en 1957 para el tratamiento de otras enfermedades como la blastomicosis (Harrell & Curtis, 1957), coccidiomicosis (Fiese, 1957) así como otras infecciones fúngicas sistémicas y parasitarias (Utz *et al.*, 1957). La nistatina (Mycostatin<sup>®</sup>) fue el primer antifúngico utilizado en la práctica clínica, pero debido a su toxicidad por vía parenteral, su uso quedó limitado a infecciones fúngicas cutáneas (Landau *et al.*, 1999). El inicio de la terapia antifúngica por vía parenteral viene marcado por el desarrollo de la Fungizona<sup>®</sup>, comercializado por Bristol-MyersSquibb en 1958 (Landau *et al.*, 1999). Durante varias décadas, se usó como fármaco de referencia en el tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas (Sheehan *et al.*, 1999; Kleinberg, 2006). Sin embargo, su administración por vía intravenosa (IV), asociada con graves problemas de nefrotoxicidad, limitan considerablemente su uso en la práctica clínica (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003; Kleinberg, 2006).

Tuvieron que transcurrir más de tres décadas hasta que se desarrollaron nuevas formulaciones lipídicas comerciales de AmB, AmBisome<sup>®</sup>, Abelcet<sup>®</sup> y Amphocil<sup>®</sup> (también denominado Amphotec<sup>®</sup>) con mejores perfiles de seguridad que la Fungizona<sup>®</sup>. Una gran parte de los estudios han demostrado que las nuevas formulaciones lipídicas tienen una eficacia clínica mayor o igual y menor nefrotoxicidad que la Fungizona<sup>®</sup> (Ostrosky-Zeichner *et al.*, 2003; Kleinberg, 2006; Torrado *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2009). Sin embargo, son mucho más costosas que la Fungizona<sup>®</sup> (Kleinberg, 2006; Torrado *et al.*, 2008). Teniendo en cuenta los costes sanitarios indirectos generados por problemas renales graves (que ocasionan un aumento de la

tasa de morbimortalidad y prolongación del tiempo de hospitalización), las formulaciones lipídicas son más costo-efectivas (Kleinberg, 2006; Torrado *et al.*, 2008). La Fungizona<sup>®</sup> sigue siendo ampliamente utilizada en los países en vías de desarrollo debido a su menor coste a pesar de sus efectos adversos. Sin embargo, en la mayoría de los países desarrollados, las nuevas formulaciones lipídicas ocupan la primera línea de tratamiento de infecciones fúngicas sistémicas, quedando el uso de la Fungizona<sup>®</sup> relegado a un segundo plano (Barratt & Legrand, 2005; Villa, 2012)

Además de la actividad antifúngica, la AmB presenta actividad frente a protozoos tales como *Leishmania* (Furtado, 1959). En la actualidad, la AmB liposomal (AmBisome<sup>®</sup>) además de los fármacos antimoniales (Glucantime<sup>®</sup>), son los tratamientos de elección frente a la leishmaniasis visceral en humanos en España (Villa, 2012).

### **Estructura química y solubilidad**

La estructura química se caracteriza por presentar un anillo macrocíclico con un grupo lactónico interno y un grupo cromóforo constituido por siete dobles enlaces conjugados (Figura 12) (Asher, 1977). Las propiedades fisico-químicas de la AmB se deben a su carácter tanto anfotérico como anfifílico. El carácter anfifílico (o también denominado anfipático) se debe a que posee una cara lipofílica (hidrófoba) constituida por una cadena heptaénica que alarga la estructura del anillo macrocíclico y da rigidez a la molécula, y una cara hidrofílica (polar) compuesta por siete grupos hidroxilo y un grupo éster (Asher, 1977).

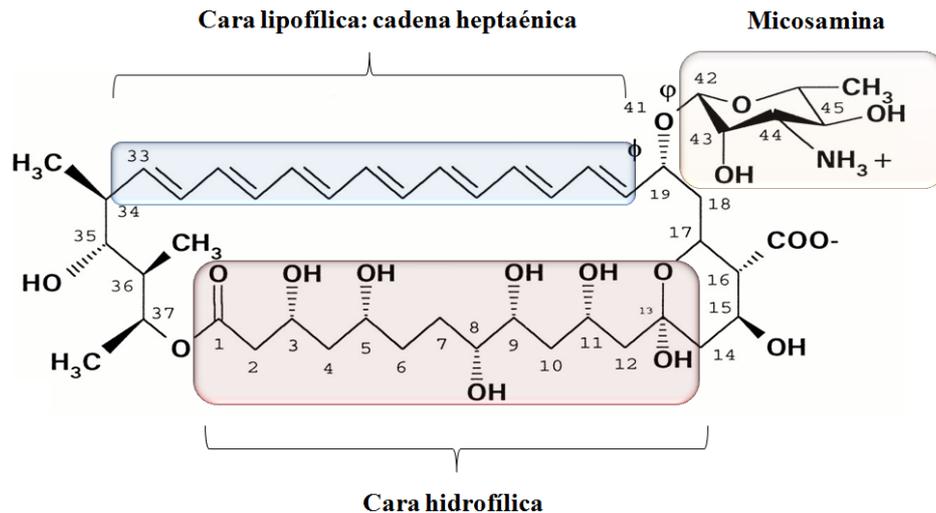


Fig 12. Estructura química de la AmB

El carácter anfótero (o también denominado zwitterónico) hace que sea capaz de comportarse tanto como ácido o como base en función del pH del medio en el que se encuentre (Asher, 1977). En el anillo macrocíclico presenta un ácido carboxílico y una cadena lateral de micosamina (aminodesoxihexosa) con un grupo amino primario. Tanto el grupo amino como el grupo carboxílico están ionizados a pH fisiológico, con valores de pKa de 10.0 y de 5.5 respectivamente (Moffat *et al.*, 1986). Ambos grupos juegan un papel importante en la actividad biológica que tiene la AmB (Volmer *et al.*, 2010).

Debido a su naturaleza anfífilica y zwitteriónica y a la distribución asimétrica de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, la AmB es una molécula muy poco soluble no solamente en solventes acuosos, sino también en la mayoría de los disolventes orgánicos (Torrado *et al.*, 2008; Asher, 1977) En agua, a pH fisiológico (pH 6 – 7), esta molécula presenta una solubilidad inferior a 0.001 mg/mL (Torrado *et al.*, 2008) por lo que tiende a formar agregados siendo una de las principales razones por las que la absorción oral de la AmB es mínima y por tanto, se tiene que administrar por vía parenteral. Sin embargo, la solubilidad aumenta considerablemente ( $\approx 0.1$  mg/mL) cuando la AmB se encuentra en medios acuosos alcalinos (pH > 12) o ácidos (pH < 2), debido a la formación de

sales, pero sin embargo, su acción antimicótica se ve reducida (Lemke *et al.*, 2005; Carstensen & Rhodes, 2000).

**Estados de agregación de la AmB**

El estado de agregación de la AmB es un parámetro complejo ya que condiciona no solo la toxicidad sino también la actividad y la farmacocinética del fármaco (Torrado *et al.*, 2008). Es un parámetro difícil de controlar, ya que en solución existe un complejo equilibrio entre las diferentes especies (monómero, dímero y poliagregado), el cual puede alterarse cuando la formulación se diluye (Brajtburg & Bolard, 1996).

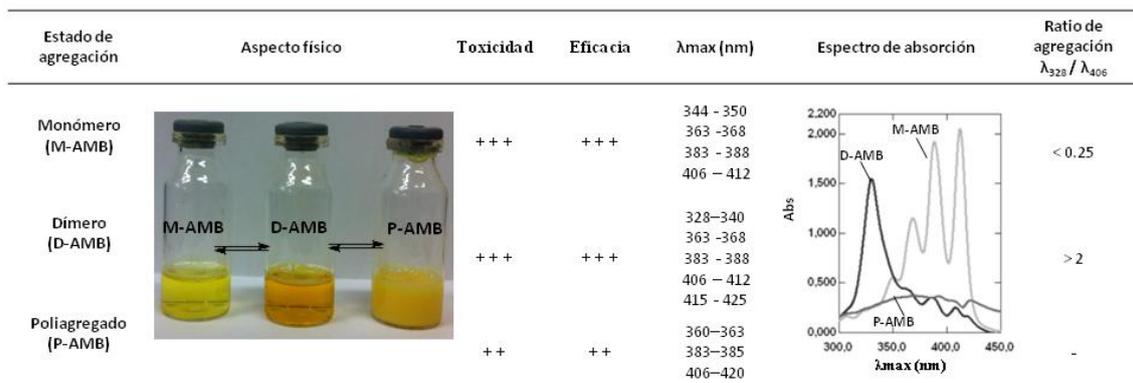


Fig 13. Espectro de absorción, apariencia física, toxicidad y eficacia relativa de los diferentes estados de agregación de la AmB en medio acuoso.

En medios acuosos y a concentraciones muy bajas, la AmB se encuentra en estado monomérico. En este estado, la AmB se encuentra en forma de disolución siendo completamente transparente y de color amarillo (Figura 13) (Torrado *et al.*, 2008) A medida que la concentración de moléculas de AmB en el medio acuoso se incrementa, empiezan a formarse agregados debido a su naturaleza anfipática, también denominados dímeros u oligómeros, que dan lugar a una dispersión coloidal traslúcida de color amarillo anaranjado (Torrado *et al.*, 2008). Si se sigue incrementando la concentración de AmB, el grado de agregación de los oligómeros es mayor,

formándose lo que comúnmente se denomina poliagregados y se obtienen suspensiones opacas amarillentas (Figura 13).

El espectro de absorción de la AmB en estado monomérico se caracteriza por presentar cuatro picos de máxima absorción a las longitudes de onda siguientes: (i) 406 – 412 nm; (ii) 383 – 388 nm; (iii) 363 – 368 nm; (iv) 344 – 350 nm (Figura 13) (Torrado *et al.*, 2008; Vandermeulen *et al.*, 2006; Darole *et al.*, 2008). Cuando la AmB empieza a agregarse y pasa de estado monomérico a estado dimérico, se observa un profundo cambio en su espectro de absorción. Por un lado, tiene lugar un desplazamiento hipsocrómico de la banda situada a los 344 – 350 nm hacia longitudes de onda menores, apareciendo un banda de máxima absorción muy intensa (efecto hipercrómico) entre los 328 – 340 nm (Barwicz *et al.*, 1993); además se puede apreciar un efecto hipocrómico (disminución de la absorbancia) en las bandas localizadas a los 363-368, 383–388 y 406–412 nm así como un efecto batocrómico debido a la nueva banda de absorción entre los 415 – 425 nm (Barwicz *et al.*, 1993) Cuando se forman agregados de mayor tamaño (poliagregados), la interacción hidrofóbica entre los grupos cromóforos es aún mayor y trae consigo un efecto hipocrómico notable en las bandas de máxima absorción localizadas a los 360-363, 383-385 y 406-420 nm (Torrado *et al.*, 2008).

Se puede comparar el estado de agregación entre unas formulaciones y otras calculando el ratio entre los valores de absorbancia del primer pico (menor longitud de onda) y los valores de absorbancia del último pico (mayor longitud de onda) (Barwicz *et al.*, 1992) De manera que, cuando predomina la AmB en forma monomérica, el ratio entre las absorbancias ( $\lambda_{344-350} / \lambda_{406-412}$ ) tiene un valor inferior a 0.25, mientras que cuando predomina la AmB en estado dimérico, el ratio de absorbancias ( $\lambda_{328-340} / \lambda_{415-425}$ ) presenta un valor muy alto igual o superior a 2 (Barwicz y col., 1992). Sin embargo, este método para evaluar el estado de agregación tiene ciertas limitaciones cuando se trata de formas poliagregadas.

## Control del estado de agregación

Existen una gran cantidad de parámetros que condicionan el estado de agregación de la AmB. Como se ha comentado anteriormente, un factor clave es la concentración de fármaco (Legrand *et al.*, 1992; Egito *et al.*, 2004) pero además de la concentración, existen otra serie de parámetros críticos tales como el empleo de agentes surfactantes u otros excipientes (Tancrede *et al.*, 1990; Aramwit *et al.*, 2000; Torrado *et al.*, 2008). El empleo de desoxicolato sódico como agente tensioactivo da lugar a formas agregadas, mientras que la utilización de gamma-ciclodextrina siempre que se mantenga una cierta proporción AmB: excipiente es capaz de formar complejos con la AmB en estado monomérico (Tancrede *et al.*, 2004; Espada *et al.*, 2008a; Espada *et al.*, 2008b; Ruiz, 2010).

Además de los excipientes, la temperatura puede originar un cambio en el estado de agregación de la AmB (Lambing *et al.*, 1993; Gaboriau *et al.*, 1997). Por ejemplo, someter la Fungizona<sup>®</sup> durante una hora a 70°C de temperatura da lugar a la formación de agregados con un tamaño de partícula 13 veces superior al de la Fungizona<sup>®</sup> pero una con menor toxicidad hemolítica (Espada *et al.*, 2008a).

Controlar el estado de agregación de la AmB es difícil, aunque es de suma importancia ya que condiciona la interacción con los esteroides de las membranas biológicas y por tanto la toxicidad y la actividad del fármaco (Torrado *et al.*, 2008). La toxicidad de la AmB se debe a su interacción con el colesterol de las membranas biológicas de las células de mamíferos en vez de con el ergosterol de las células fúngicas y de los parásitos.

Aunque existe controversia, parece ser que la AmB en estado monomérico presenta mayor selectividad por el ergosterol en comparación con las formas agregadas (Brajtburg & Bolard, 1996; Barwicz & Tancrede, 1997); sin embargo, cuando la concentración se incrementa y empiezan a formarse dímeros de AmB, se produce

además, la interacción con el colesterol de las membranas de células de mamíferos que da lugar a problemas de toxicidad (Bolard *et al.*, 1991; Legrand *et al.*, 2000). No obstante, si el proceso de agregación continúa, existen menos moléculas disponibles solubles en el medio lo que generalmente se traduce en una menor toxicidad, pero también una menor eficacia.

El estado de agregación también juega un papel clave en la distribución del fármaco en el organismo tras su administración IV. Cuando se inyectan sistemas particulados por vía IV, pueden ser reconocidos como agentes extraños siendo opsonizados por componentes plasmáticos (Figura 14) (Davis *et al.*, 1997). Las partículas opsonizadas, son fácilmente reconocibles por el sistema del retículo endotelial (SRE), de manera que los macrófagos (principalmente los del hígado, pero también los macrófagos alveolares y del bazo y otros macrófagos circulantes) son capaces de fagocitar las partículas opsonizadas, retirándolas así de la circulación plasmática pasando a ser acumuladas en tejidos (Davis *et al.*, 1997; Hillaireau & Couvreur, 2009). Este proceso de opsonización-fagocitosis está condicionado por las características que presentan las partículas; en general, a mayor tamaño de partícula, más eficiente es el proceso de opsonización, de manera que las partículas con un tamaño inferior a los 200 nm suelen circular en plasma durante más tiempo (Hillaireau & Couvreur, 2009). Además, las partículas con una superficie hidrofóbica son más eficientemente opsonizadas (Chonn *et al.*, 1991; Hillaireau & Couvreur, 2009).

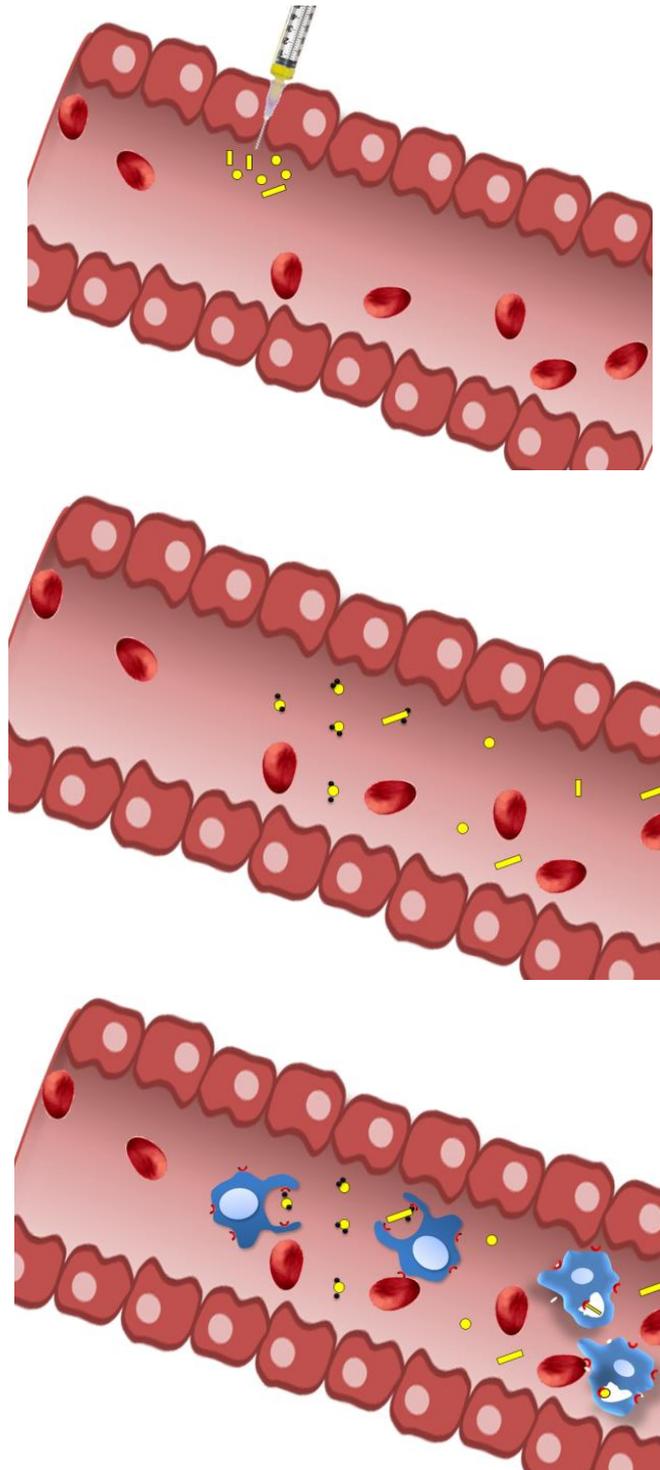


Fig 14. Representación del proceso de opsonización y fagocitosis de un sistema particulado administrado por vía intravenosa.

La AmB en estado poliagregado puede tener una serie de ventajas respecto a los otros estados de agregación en cierto tipo de enfermedades como la leishmaniasis visceral (Carter *et al.*, 1989; Kaye *et al.*, 2004). La AmB en estado poliagregado al presentar un tamaño de partícula mayor, puede ser más fácilmente opsonizada y

fagocitada siendo así vectorizada hasta los órganos diana (hígado, bazo y médula ósea) (Owens & Peppas, 2006).

### **Mecanismo de acción**

La acción de la AmB tiene lugar a dos niveles diferentes (Figura 15):

1. Uniéndose al ergosterol dando lugar a la formación de poros o bien “secuestrando” el ergosterol de la membrana celular
2. Induciendo estrés oxidativo celular.

La AmB ejerce su actividad a dos niveles: uno sobre la membrana celular y otro a nivel intracelular. A nivel de la membrana celular, la AmB tiene la capacidad de unirse al ergosterol (1) y formar poros, o bien directamente “secuestrar” el ergosterol (2) desestabilizando la membrana celular, de tal forma que se produce la pérdida de electrolitos dentro de la célula que trae consigo la apoptosis o muerte celular. El ergosterol se encuentra en las membranas de células fúngicas y también en ciertos parásitos como *Leishmania*, de ahí su actividad. Los problemas de toxicidad se derivan de la unión al colesterol que se encuentra en la membrana de las células de mamíferos.

A nivel intracelular, la AmB puede producir estrés oxidativo. El mecanismo exacto es desconocido, aunque se han propuesto diversas hipótesis tales como que la AmB puede comportarse como un agente pro-oxidante (3) generando especies de oxígeno altamente reactivas (ROS). Sin embargo, probablemente, para que pueda tener lugar este efecto, se requiere una previa unión al ergosterol de la membrana (4). Por otro lado, las ROS son productos que se forman en la cadena respiratoria y por lo tanto, no podría descartarse el hecho de que la AmB además tenga cierto efecto sobre la actividad mitocondrial de la célula (5), produciendo estrés oxidativo en los principales componentes celulares (ADN, proteínas y mitocondrias) ocasionando muerte celular.

Además del efecto directo sobre las células fúngicas y parasitarias, la AmB tiene propiedades inmunomoduladoras sobre las células del hospedador, lo que constituye un arma de doble filo, ya que por un lado puede mejorar la respuesta inmunitaria del hospedador, y por otro puede acentuar la toxicidad del fármaco (Mesa-Arango *et al.*, 2012).

## 1. Desestabilización de la membrana

## 2. Estrés oxidativo

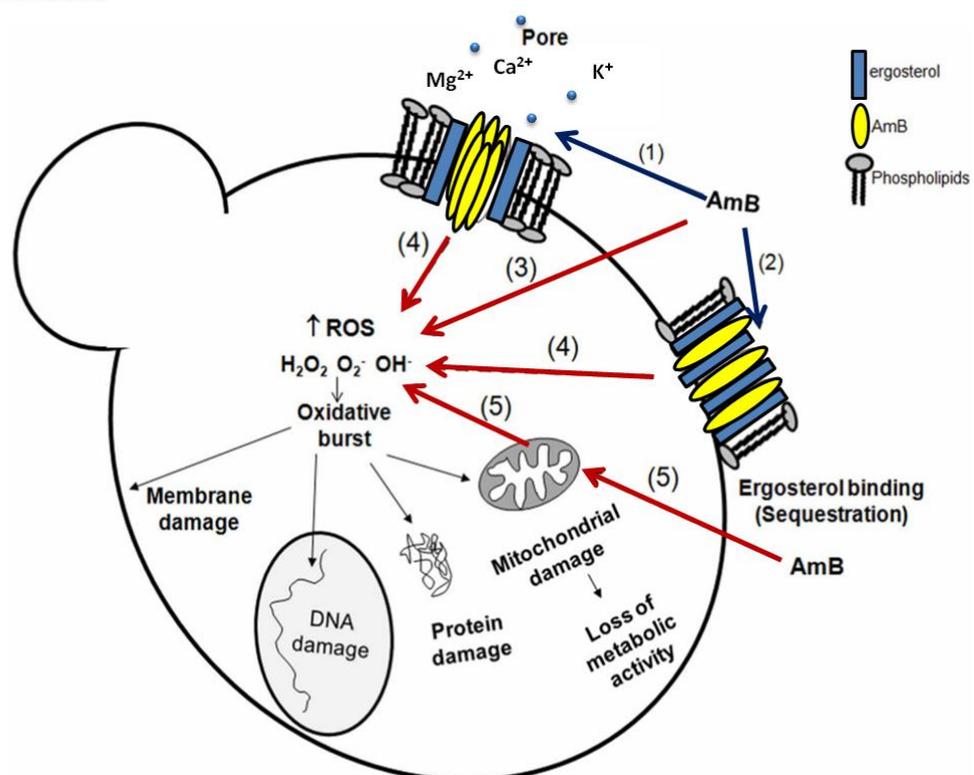


Fig 15. Mecanismo de acción de la AmB (adaptado de Mesa-Arango *et al.*, 2012).

El mecanismo por el cual la AmB tiene propiedades inmunomoduladoras no está totalmente elucidado. Parece ser que es capaz de interactuar con receptores tipo toll (TLR) y CD14 (Mesa-Arango *et al.*, 2012). Los TLR pertenecen a una familia de proteínas transmembrana que forman parte del sistema inmunitario innato capaces de reconocer patrones moleculares expresados por un amplio espectro de agentes infecciosos (Shoham *et al.*, 2001; Mesa-Villanueva *et al.*, 2006; Mesa-Arango *et al.*, 2012). La AmB se puede unir bien a los TLR-2 produciendo la liberación de citoquinas

proinflamatorias (tales como interleucinas 6 y 8, factor de necrosis tumoral alfa, proteína quimiotáctica de monocitos 1, proteínas inflamatorias de macrófagos) o bien a los receptores TLR-4 relacionados con la producción de citoquinas antiinflamatorias (interleucina 10) (Bellocchio *et al.*, 2005).

Por otro lado, la anfotericina tiene un efecto sobre las células del sistema inmune, fenómeno que se conoce desde hace muchos años (Yamaguchi *et al.*, 1993). La mayor parte de los estudios demuestran que la anfotericina tiene un efecto inmunoadyuvante sobre los linfocitos (Nair & Schwartz, 1982; Sarthou *et al.*, 1986) y un efecto inmunoestimulador en términos de favorecer las funciones de macrófagos y polimorfos nucleares, como la quimiotaxis, la fagocitosis o la actividad microbicida (Perfect *et al.*, 1987; Wolf & Massof, 1990).

Sin embargo, este efecto inmunomodulador parece depender de la dosis y de la formulación en la que se vehiculiza el compuesto. (Brajtburg & Bolard, 1996; Ramañíguez *et al.*, 2006).

Hay que tener en cuenta que en algunas ocasiones también se ha descrito un efecto inmunosupresor por parte de la AmB (Choi *et al.*, 2010) y que alteraciones en la respuesta inmunitaria pueden originar profundos cambios en el hospedador dando lugar a efectos secundarios importantes como la toxicidad derivada del incremento de citoquinas proinflamatorias (Shadkchan *et al.*, 2004; Yano *et al.*, 2009).

El tipo de respuesta T helper que se active en el hospedador es clave en la evolución de la leishmaniasis. En general, la producción de citoquinas pro-inflamatorias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1, IL-6, etc) activan una respuesta Th1, caracterizada por la activación de macrófagos y la producción de óxido nítrico (NO) y superóxido, lo cual se asocia con una protección del hospedador frente a la infección. Por el contrario, la respuesta Th2 (IL10, IL-4, etc) se asocia con una mayor susceptibilidad a la infección y con mayor capacidad del microorganismo de evadir la respuesta inmunitaria del hospedador (Romani & Howard, 1995; Mesa-Arango *et al.*, 2012).

### Espectro de acción frente a *Leishmania*

En la práctica clínica, la AmB es un fármaco ampliamente utilizado para el tratamiento de la leishmaniasis visceral y cutánea humana. En comparación con otros fármacos, tales como la miltefosina, la paramomicina o el estibogluconato de sodio, la aparición de resistencias es bastante rara y por lo general, la AmB presenta una actividad leishmanicida superior. El principal factor limitante sin embargo es su toxicidad (Tabla 4). Además, existen diferencias según el tipo de formulación de AmB que se utilice, lo cual puede atribuirse en cierta medida al diferente perfil farmacocinético.

Tabla 4. Comparación de la actividad leishmanicida de diferentes fármacos usados en la práctica clínica y actividad anti-leishmania de diferentes formulaciones de AmB *in vitro* e *in vivo*. Clave: La actividad de los estudios *in vitro* viene expresada como la concentración ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) necesaria para inhibir el 50% del crecimiento parasitario y en los estudios *in vivo* se expresa como la dosis (mg/kg) necesaria para reducir el 50% de la carga parasitaria en el hígado de ratones BALB/c.

Especie/forma parasitaria (experimento <i>in vivo</i> o <i>in vitro</i> )	Fungizona®	Miltefosina	Paramomicina	Estibogluconato de sodio	AmBisome®	Abelcet®	Amphocil®	Ref.
<i>L. donovani</i> / amastigotes ( <i>in vitro</i> )	0.06	3.1	46.4	29.8	-	-	-	Seifert, Escobar <i>et al.</i> 2010
<i>L. donovani</i> / amastigotes ( <i>in vitro</i> )	0.013	-	-	-	1.5	2.6	0.02	Yardley & Croft 2000
<i>L. major</i> / amastigotes ( <i>in vitro</i> )	0.2	-	-	-	1.8	2.9	0.6	Yardley & Croft 1997, Yardley & Croft 2000
<i>L. donovani</i> / (modelo <i>in vivo</i> de leishmaniasis visceral)	0.21	-	-	-	0.73	2.7	0.32	Yardley & Croft 2000

### Perfil farmacocinético

La administración IV de AmB sigue siendo la ruta de administración preferente para el tratamiento de la leishmaniasis visceral. El perfil farmacocinético de la AmB viene caracterizado por: (i) una alta unión (95 - 99%) a proteínas plasmáticas (Bekersky *et al.*, 2002); (ii) amplia acumulación en tejidos (Torrado *et al.*, 2008); (iii) un patrón bifásico de eliminación plasmática, caracterizado por una semivida inicial de 24-48 h y

una fase de eliminación más lenta (aproximadamente durante 15 días) (Daneshmend & Warnock, 1983; Bellmann, 2007) y (iv) eliminación de forma inalterada de la mayor parte del fármaco (Bellmann, 2007). En la tabla 5, se recogen las principales diferencias farmacocinéticas entre la AmB convencional y las nuevas formulaciones de AmB comercializadas.

Tabla 5. Datos comparativos del tamaño de partícula, estructura y parámetros farmacocinéticos en humanos de las distintas formulaciones comercializadas de AmB tras administración IV. Clave:  $C_{max}$ , concentración máxima plasmática, AUC, área bajo la curva,  $V_d$ , volumen de distribución,  $T_{1/2}$ , semivida de eliminación.

Formulación	Tamaño de partícula ( $\mu\text{m}$ )	Estructura	Dosis ( $\text{mg kg}^{-1}$ )	$C_{max}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	AUC ( $\mu\text{g x h mL}^{-1}$ )	$V_d$ ( $\text{L kg}^{-1}$ )	$t_{1/2}$ (h)	Ref.
Fungizona <sup>®</sup>	0.035	Micelas	0.6	1.1	17.1	5.1	-	(Dupont 2002)
			0.8	1.46	17.2	-	-	(Ayestaran, Lopez <i>et al.</i> 1996)
			1	1.7	18.7	2.4	26.8	(Heinemann, Bosse <i>et al.</i> 1997)
Abelcet <sup>®</sup>	1.6 - 11	Complejo lipídico (Forma de cinta)	2.5	1.09	8.9	-	-	(Walsh, Whitcomb <i>et al.</i> 1997)
			5	1.7	9.5	131	173.4	(Dupont 2002, AEMPS 2013)
			5	2.39	19.17	132.8	393	(Adedoyin, Swenson <i>et al.</i> 2000)
Amphocil <sup>®</sup>	0.11 – 0.14	Dispersión coloidal (Forma de disco)	0.25	0.8	9.4	3.4	86	(Sanders, Buchi <i>et al.</i> 1991)
			0.5	0.84	21.0	5.5	157	(Sanders, Buchi <i>et al.</i> 1991)
			1	2.2	46.3	7.6	244	(Sanders, Buchi <i>et al.</i> 1991)
			1.5	2.5	57.3	8.9	235	(Sanders, Buchi <i>et al.</i> 1991)
			5	3.1	43	4.3	-	(Dupont 2002)
AmBisome <sup>®</sup>	0.06 - 0.08	Liposomas unilame lares	1	8	27	0.58	10.7	(Walsh, Yeldandi <i>et al.</i> 1998)
			2.5	19	65	0.69	8.1	(Walsh, Yeldandi <i>et al.</i> 1998)
			5	58	269	0.22	6.4	(Walsh, Yeldandi <i>et al.</i> 1998)
			5	83	555	0.11	-	(Dupont 2002)
			7.5	90	476	0.26	8.5	(Walsh, Yeldandi <i>et al.</i> 1998)
Fungisome <sup>™</sup>	2.7 – 3.5	Liposomas Multilame lares	1	1.01	11.43	2.28	17.2	(Romero & Morilla 2008)

Dentro de las formulaciones lipídicas existen dos grupos con características bien diferenciadas. Por un lado, el Abelcet® y Amphocil® están caracterizados por presentar una rápida desaparición del torrente sanguíneo tras la administración IV, lo cual se relaciona con una rápida distribución en tejidos (posiblemente tras ser fagocitados por los macrófagos del SRE una vez que han sido opsonizados por los componentes del plasma). Esto justifica los bajos valores de AUC y de Cmax plasmática, así como los altos valores de semivida de eliminación y volumen de distribución. Por otro lado, el AmBisome® presenta unas características totalmente diferentes. Tras la administración IV, el fármaco permanece en plasma, que en este caso actuaría como reservorio para después ser distribuido a los diferentes tejidos (Torrado *et al.*, 2008). Su perfil farmacocinético viene marcado por altos valores de AUC y Cmax plasmáticos y un menor volumen de distribución y semivida de eliminación. Esto se debe a que el AmBisome® está constituido por pequeños liposomas unilamelares que pasan desapercibidos más fácilmente frente al SER (Torrado *et al.*, 2008). El Fungisome™ es también una formulación liposomal pero al tratarse de liposomas multilamelares de gran tamaño su perfil farmacocinético es similar al del el Abelcet® y Amphocil®. La Fungizona® al presentar un tamaño micelar tan pequeño hace que se excrete por la orina más fácilmente, siendo la causa de su mayor toxicidad a nivel renal.

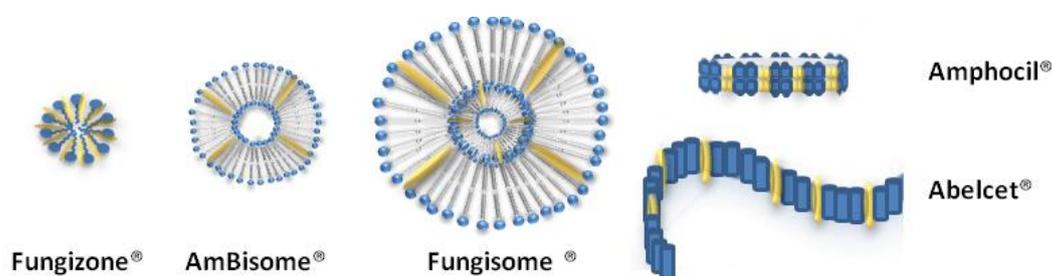


Fig 16. Representación de la estructura de las diferentes formulaciones comercializadas de AmB adaptado de Storm & Crommelin, 1998; Williamson, 2002; Vyas & Gupta, 2006; Romero & Morilla, 2008.

## Toxicidad

Los principales efectos adversos relacionados con la administración IV de AmB son: la nefrotoxicidad y las reacciones adversas relacionadas con la perfusión. La aparición de efectos adversos es uno de los principales problemas que limita el uso en la práctica clínica de la AmB. Con las nuevas formulaciones lipídicas se ha conseguido reducir parte de la toxicidad asociada a la administración IV de la AmB convencional; aún así los efectos adversos de la AmB son muy numerosos.

La toxicidad aguda aparece durante o tras la administración IV del fármaco y viene asociada con la producción de citoquinas proinflamatorias. Entre los efectos adversos agudos más comunes se encuentran los siguientes: fiebre, escalofríos y rigidez, cefaleas, náuseas, vómitos, diarrea, dolor en el lugar de la inyección con o sin flebitis, etc. Algunos de estos efectos, se pueden mitigar con la administración de analgésicos, heparina, antihistamínicos y/o antieméticos.

La principal toxicidad crónica se manifiesta a nivel renal (Laniado-Laborin & Cabrales-Vargas, 2009). El daño renal se manifiesta como insuficiencia renal, hipocalcemia, hipomagnesemia, acidosis metabólica y poliuria secundaria a diabetes insípida (Laniado-Laborin & Cabrales-Vargas, 2009). Generalmente, la función renal mejora con la interrupción de la terapia. Sin embargo, pueden aparecer frecuentemente algunos trastornos permanentes, especialmente cuando se administra una dosis acumulada superior a 5 g (AEMPS, 2013). Estudios en humanos han demostrado que la administración de solución salina, ya sea por vía oral o parenteral, reduce considerablemente la incidencia y severidad del daño renal secundario a AmB. Otro efecto adverso que aparece frecuentemente hasta en un 70% de los pacientes es la anemia (Laniado-Laborin & Cabrales-Vargas, 2009).

Las formulaciones lipídicas al presentar una menor toxicidad, pueden ser administradas en dosis superiores (5 mg/kg en vez de 1 mg/kg) que la Fungizona<sup>®</sup>, lo que puede traducirse en mayor eficacia. Sin embargo, hay que tener en cuenta el

coste del tratamiento en donde a excepción del Amphocil<sup>®</sup>, todas las formulaciones lipídicas presentan un coste muy superior al de la Fungizona<sup>®</sup> (Tabla 6). En el tratamiento humano, no obstante, es más preciso considerar el gasto global por paciente teniendo en cuenta los costes derivados de la hospitalización y el tratamiento de los efectos adversos. En ese sentido, el perfil fármaco-económico del AmBisome<sup>®</sup> es más favorable cuando se compara al de la Fungizona<sup>®</sup>, resultando un coste global en torno a 3000 € menos cuando el paciente es tratado con la especialidad liposómica (Carnero, 2005).

Tabla 6. Comparación del coste diario del tratamiento con diferentes formulaciones de AmB para un paciente de 70 kg.

Tratamiento	Dosis recomendada (mg/kg)	Precio/contenido del vial	Coste diario del tratamiento para un paciente de 70 kg
Fungizona <sup>®</sup>	0.6 – 1	5.8 €/ 50 mg	5.8 – 11.2 €
AmBisome <sup>®</sup>	1 - 3	141 € / 50 mg	282 – 705 €
Abelcet <sup>®</sup>	3 - 5	65.3 € / 50 mg	326.5 – 457.1 €
Amphocil <sup>®</sup>	3 - 4	3.12 € / 50 mg	15.6 – 18.7 €
Fungisome <sup>™</sup>	1 - 3	85 / 50 mg	170 – 425 €

En los animales, el tratamiento con AMB en sus formas lipídicas se ve muy limitado debido a su alto precio, por lo que solo se emplea en forma de Fungizona<sup>®</sup> en casos en los que no se consigue respuesta con los tratamientos de primera línea.

### Formulaciones de carácter no comercial

Actualmente se están desarrollando diversas formulaciones de anfotericina B que actúan como sistemas de liberación sostenida, que permitirían administrar dosis más elevadas, modificar la farmacocinética y reducir la toxicidad de la anfotericina (Torrado *et al.*, 2008; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015).

- Liposomas pegilados
- Niosomas
- Cocleatos (“Multi-lamellar cylindrical micelles”)

- Complejos con polyvinylpirrolidona
- Microesferas de albumina y PLGA
- Nanosuspensiones
- Nanoparticulas
- Neoglicoproteínas
- Copolimeros
- Poli-agregados
- Super-agregados inducidos por calor

## **DIAGNÓSTICO DE LABORATORIO**

El diagnóstico en la leishmaniosis visceral sigue siendo un reto, a pesar de los avances realizados en el desarrollo de varios estudios parasitológicos, técnicas serológicas y moleculares. Debemos tener en cuenta que una técnica estándar adecuada debe tener una alta sensibilidad y especificidad, ser reproducible, fácil de realizar y adaptable para su uso en laboratorios locales sin sofisticados equipos, y debe detectar todos los perros infectados en cualquier etapa de la enfermedad usando preferentemente métodos no invasivos. También es fundamental que el precio de la técnica no sea excesivamente costoso (Maia & Campino, 2008).

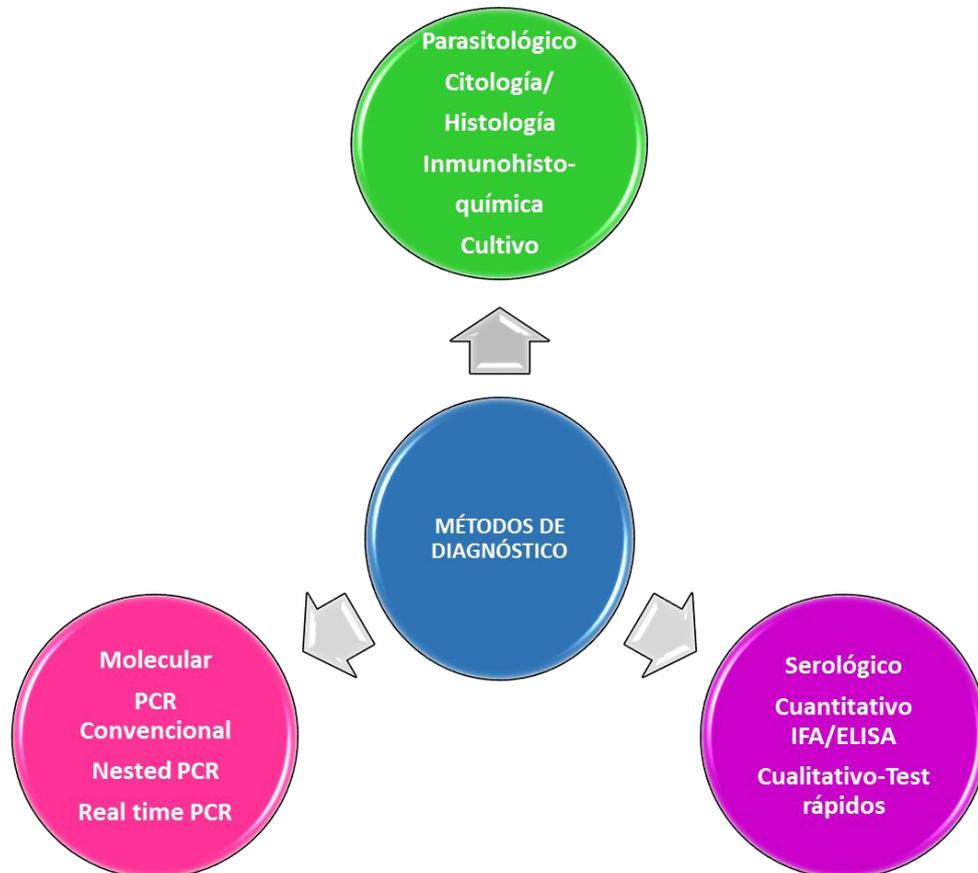


Fig 17. Métodos de diagnóstico más comunes en la leishmaniosis canina.

Modificado de Solana-Gallego *et al.*, 2011.

## 1. DIAGNÓSTICO PARASITOLÓGICO

Es el diagnóstico de elección y el más fiable. Consiste en la evidenciación del parásito por: visualización directa (centesis de ganglios o médula ósea y biopsia cutánea), técnicas de biopsia molecular (PCR) y xenodiagnóstico (infección de *Phlebotomus*) (Alvar, 2001).

### 1.1. Punción de ganglios/medula ósea y biopsia cutánea

El método más asequible es la punción de ganglio y/o médula ósea (en la 5<sup>o</sup>-6<sup>o</sup> unión costocondral, preferentemente) y realización posterior de frotis y tinción con los métodos de tinción convencionales. Los amastigotes de *Leishmania* aparecen en el interior del citoplasma de los macrófagos o circulantes, como cuerpos ovalados basófilos de menos de cuatro micrómetros. La aparición de una sola célula parasitada se considera un resultado positivo.

La punción ganglionar es menos útil ya que el porcentaje de falsos negativos es mayor que en las muestras obtenidas a partir de la médula ósea.

Una desventaja de este método, es que el número de parásitos presentes en estos tejidos puede ser baja, y por lo tanto una punción negativa que por tanto no es excluyente. Por lo que hay que realizar varias muestras y apoyar el diagnóstico en otras pruebas complementarias.

Pero la desventaja más importante es que es un método cruento para el animal, que además debe ser anestesiado.

El diagnóstico parasitológico puede realizarse también por biopsia de lesiones cutáneas erosivas cuando estas están presentes.

### 1.2. Cultivo

Es un método que facilita la detección del parásito. Se pueden emplear métodos difásicos de agar-sangre (NNN -Novy-MacNeal-Nicolle- y Tobie) o medios líquidos (Schneider, Grace, RPMI, C-199), enriquecidos con suero bovino fetal al 10-20%. Los cultivos se mantienen a 24-26-28°C, haciéndose estudios al microscopio para la búsqueda de promastigotes un par de veces en semana, y realizando sub-cultivos periódicamente hasta al menos 3 meses. Las muestras empleadas son las mismas que las que se utilizan en la observación directa/tinción.

### 1.3. PCR

A partir de muestras de piel o de médula ósea obtenidas mediante biopsia o centesis, o a partir de muestras de sangre periférica, aunque esta última es considerada la muestra menos útil. Esta técnica molecular se considera una prueba de elevada sensibilidad y especificidad puesto que permite obtener un resultado positivo con la presencia de un solo amastigote en la muestra problema (Roura *et al.*, 1999). Sin embargo, es de difícil aplicabilidad en las clínicas veterinarias.

### 1.4. Xenodiagnóstico

Se suele utilizar para determinar la capacidad de transmisión de la enfermedad en animales asintomáticos o en aquellos que se han sometido a tratamiento o a vacunación a nivel experimental (Miró *et al.*, 2011; Dantas-Torres *et al.*, 2014)

## 2. INMUNODIAGNÓSTICO.

Los métodos inmunológicos de diagnóstico permiten evaluar la respuesta inmunitaria celular y humoral.

### 2.1. Respuesta celular.

La técnica de elección es la prueba de hipersensibilidad retardada o test de Montenegro, empleada hasta el momento en estudios epidemiológicos. Tras la inoculación de promastigotes fenolizados por vía intradérmica se valora a las 48-72 la posible induración que se forme (Baleeiro *et al.*, 2006). La respuesta positiva indica una respuesta celular eficaz.

### 2.2. Respuesta humoral específica

Está ampliamente difundida en la leishmaniosis canina. La detección de anticuerpos específicos es especialmente útil en la primera fase de la enfermedad. Sin embargo, la detección de seropositividad no implica necesariamente que el animal esté desarrollando la enfermedad (Nieto *et al.*, 1999). Parece ser que un 10% de los perros con anticuerpos no desarrollarán la patología gracias a una respuesta celular eficaz.

Aunque tradicionalmente se evaluaba la IgG, numerosos autores recomiendan el estudio de los diferentes isotipos y subclases (Desplazes *et al.*, 1995; Bourdoiseau *et al.*, 1997; Nieto *et al.*, 1999; Iniesta *et al.*, 2005)

Con este fin se utilizan básicamente la inmunofluorescencia indirecta, considerada el método serológico de referencia, el test de aglutinación directa, la técnica de enzimoimmunoensayo, dot-ELISA, Western Blot y la inmunocromatografía o dipsticks.

- Inmunofluorescencia indirecta (IFI)

Es la técnica más utilizada en el diagnóstico de la leishmaniosis canina (Rachamim *et al.*, 1991) y se la considera la técnica de referencia para otras técnicas debido a su elevada sensibilidad y especificidad. La metodología y los criterios de interpretación son bastante homogéneos por lo que permite comparar resultados obtenidos en diferentes laboratorios.

Se considera como el umbral de positividad la dilución 1/100 (Tesouro, 1984).

Se suele utilizar la seroconversión de la titulación de los niveles de anticuerpos con posterioridad al tratamiento como indicio de eficacia terapéutica (Vercammen *et al.*, 1996; Poli *et al.*, 1997).

- ELISA

Son técnicas de gran fiabilidad comparables al IFI, aunque con la ventaja de que puede ser automatizable y que es fácilmente aplicable, rápido y de bajo costo y por tanto muy útil en condiciones de campo (Cardoso *et al.*, 2004).

- Inmunoblot

Tiene como ventaja el que permite detectar además de anticuerpos específicos, antígenos también específicos y detecta positivos en las fases tempranas de la enfermedad (Aisa *et al.*, 1998). Aunque es laboriosa y compleja, aporta una mayor información en la evolución diagnóstica del animal que el ELISA.

Tabla 7. Ventajas e inconvenientes de los métodos ordinarios de diagnóstico en la detección de la infección de *L. infantum* en perros. Modificado de Solano-Gallego *et al.*, 2011.

TÉCNICAS DIAGNÓSTICAS	VENTAJAS	INCONVENIENTES
SEROLOGÍA	-La determinación de los niveles de anticuerpos es esencial para el diagnóstico y el establecimiento de un pronóstico	-No detecta la presencia real del parásito <i>Leishmania</i> -Reacciones serológicas cruzadas con <i>Trypanosoma</i>
CUALITATIVO	-Test clínico rápido	-Proporciona solo resultados positivo o negativo -Diferentes sensibilidades y funcionamiento con el riesgo de falsos negativos -Un resultado positivo necesita ser mejor evaluado por una serología cuantitativa
CUANTITATIVO (IFAT, ELISA)	-Determina el nivel de anticuerpos  -Un nivel alto de anticuerpos en la presencia de signos clínicos compatibles y/o anormalidades clinicopatológicas son un diagnóstico concluyente de leishmaniosis clínica	-La exactitud depende del laboratorio -Diferencias entre laboratorios y técnicas de estandarización inadecuadas -Niveles bajos de anticuerpos necesitan un estudio más profundo
CITOLOGÍA/ HISTOPATOLOGÍA	Permite la detección directa del parásito -Hallazgos patológicos son sospechosos de infección -Permite la exclusión de otros diagnósticos diferenciales -La citología es rápida y no invasiva	-Baja sensibilidad para la detección de amastigotes de <i>Leishmania</i> en tejidos o fluidos corporales -Requiere la realización de otras pruebas diagnósticas como la inmunohistoquímica y/o PCR cuando no se visualizan parásitos -No muestra el estado inmunológico del perro -Necesita experiencia
PCR	-Permite la detección del ADN de <i>Leishmania</i> -Alta sensibilidad (kADN) y especificidad -Cuantificación de la carga parasitaria (si PCR en tiempo real)	-Posible resultados de falsos positivos si hay contaminación del ADN -Diferentes estandarizaciones y técnicas usadas por los diferentes laboratorios de diagnóstico -No muestra el estado inmunológico -No se puede realizar como única técnica diagnóstica para la confirmación de la enfermedad porque un resultado positivo confirma la infección por <i>Leishmania</i> pero no la enfermedad
CULTIVO PARASITARIO	-Permite aislar <i>Leishmania</i> -Facilita la identificación isoenzimática del parásito	-Mucha inversión de tiempo y laboriosas técnicas de laboratorio -Puede necesitar un mes para que se proporcione un resultado -Solo se realiza en laboratorios de investigación



Fig 18. Algoritmo de trabajo en el diagnóstico de perros con sospecha clínica o anomalías clinicopatológicas compatibles con leishmaniosis canina. Tomado de Solano-Gallego *et al.*, 2011.

**CAPÍTULO I. ESTUDIO  
FARMACOCINÉTICO DE  
ANFOTERICINA B POLIAGREGADA  
Y ENCAPSULADA EN  
MICROESFERAS DE ALBÚMINA**

---



## ANTECEDENTES

Un parámetro crítico para las formulaciones de administración intravenosas es su biodistribución por el organismo con el fin de llegar al órgano diana. Cuando se administran partículas por vía intravenosa, en muchas ocasiones son rápidamente recubiertas (opsonizadas) por los componentes de la circulación como son los factores del complemento (Davis, 1997) Este proceso hace que las partículas opsonizadas sean fácilmente reconocibles por el sistema del retículo endotelial (RES) como los macrófagos principalmente localizados en el hígado, bazo, pulmón y también por los macrófagos circulantes, los cuales son capaces de eliminar las partículas opsonizadas de la circulación mediante fagocitosis (Blunk *et al.*, 1996). La hidrofobicidad superficial de las partículas está directamente relacionada con la cinética de depuración plasmática por el RES, de manera que cuanto más hidrofóbicas son las partículas más facilidad tienen de ser opsonizadas (Berry & Curtis, 2003). Además, otro factor clave es el tamaño de partícula, de manera que cuanto más pequeño es el tamaño se evita la eliminación por parte del RES favoreciendo una semivida plasmática más larga (Gref, 1994).

En enfermedades infecciosas como la leishmaniasis, los parásitos se acumulan preferentemente en los macrófagos. En este tipo de enfermedad es interesante vectorizar el fármaco hacia el lugar donde se localizan los parásitos y por lo tanto favorecer la opsonización y fagocitosis lo cual puede realizarse por medio de cambios en el estado de agregación, tamaño de partícula y hidrofobicidad de las partículas que se vayan a administrar por vía intravenosa.

Las formulaciones lipídicas comercializadas de anfotericina B (AmBiome<sup>®</sup>, Amphocil<sup>®</sup> y Abelcet<sup>®</sup>) en el momento actual son las que presentan un mejor perfil de seguridad en comparación con la anfotericina B convencional (Fungizona<sup>®</sup> o anfotericina B dimérica); sin embargo, el coste del tratamiento es bastante elevado, limitando el uso de anfotericina B en los países con menos recursos económicos en donde hay una

mayor prevalencia de enfermedades potencialmente tratables con anfotericina B. Por esta razón, el desarrollo de una formulación de anfotericina B por vía parenteral que sea segura y al mismo tiempo coste-efectiva permitiría facilitar el acceso al tratamiento con anfotericina B en muchos países y además podría ser utilizada a nivel veterinario (teniendo en cuenta la alta prevalencia de leishmaniasis canina en la cuenca del mar Mediterráneo), donde el alto coste de las formulaciones lipídicas de anfotericina B es también una de las razones que limita su uso.

## **OBJETIVOS E HIPÓTESIS**

En estudios anteriores llevados a cabo por nuestro grupo de investigación se obtuvieron resultados prometedores en modelos de ratón y hámster con anfotericina B en forma poliagregada (Sánchez-Brunete *et al.*, 2004; Espada *et al.*, 2008b); por este motivo es interesante poder evaluar si en especies de mayor tamaño como el perro, la anfotericina B poliagregada presenta el mismo perfil farmacocinético (el cual está estrechamente relacionado con su eficacia), con el fin último de poder elegir una dosis terapéutica que sea efectiva y poco tóxica para llevar a cabo estudios de eficacia. Para ello, el objetivo de este capítulo ha sido preparar anfotericina B poliagregada libre y encapsulada en microsferas de albúmina y evaluar su perfil farmacocinético en perros Beagle para decidir que dosis son las más convenientes para utilizar *a posteriori* en ensayos de farmacodinamia en perros infectados. Se han estudiado diferentes variables tales como, el efecto de la formulación, la dosis administrada, el efecto de anestesia, la administración de dosis múltiples y el estado de enfermedad o salud del perro.

De manera esquemática se recoge en la Figura 19, los objetivos e hipótesis de este capítulo.

## OBJETIVOS &amp; HIPÓTESIS:

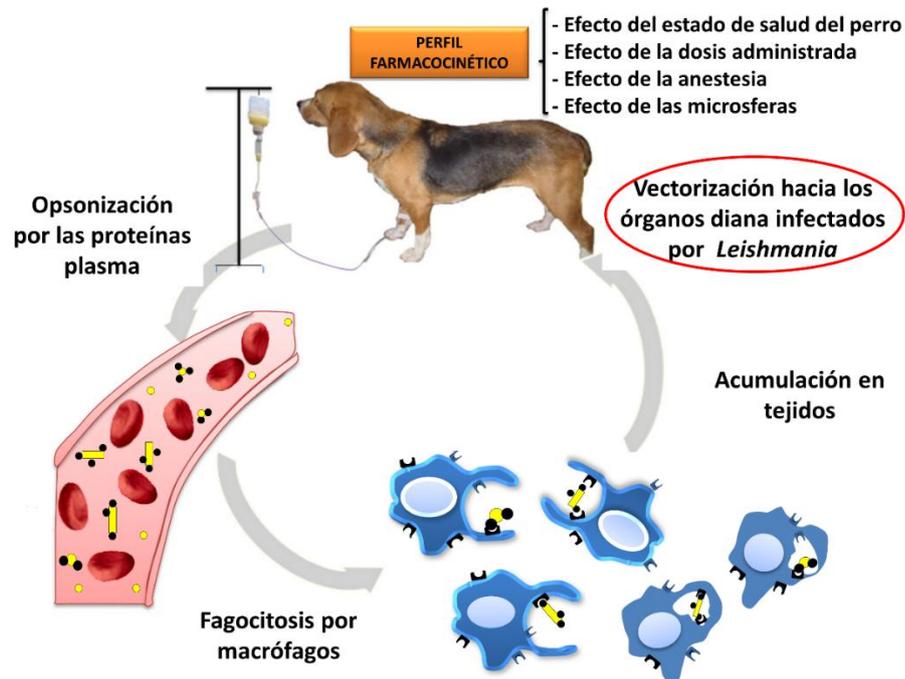


Fig 19. Representación esquemática de los objetivos e hipótesis del capítulo.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### Materiales

La anfotericina B con una riqueza del 95% se compró de Azelis (Barcelona, España). El desoxicolato de sodio fue adquirido de Fluka Chemie A.G. (Buchs, Suiza). Las diferentes sales fosfato se compraron en Panreac S.A. (Barcelona, España). El Ambisome fue comprado de Gilead Sciences, S.L. (Madrid, España). La albúmina sérica humana (20%) se adquirió en el Instituto Grifols SA (Barcelona, España). El resto de productos químicos y solventes empleados fueron de calidad farmacopea y se compraron en Sigma-Aldrich (Madrid, España) o Panreac S.A. (Barcelona, España).

## Preparación de las formulaciones

### Anfotericina B poliagregada

El modo de preparación de la anfotericina B poliagregada es el siguiente el cual también está recogido en la Figura 20.

Inicialmente se preparó una dispersión micelar acuosa con desoxicolato de sodio (0.41 mg) a la cual se incorporaron dos sales fosfato (fosfato dibásico de sodio – 10 mg y fosfato monobásico de sodio – 0.9 mg) como estabilizadores de pH. A continuación, se añadió la anfotericina B (50 mg) y se mantuvo en agitación hasta que la formulación presentó un aspecto opaco amarillo homogéneo. Finalmente, se diluyó con agua desionizada esterilizada por filtración, para obtener una concentración de 5 mg/mL de anfotericina B (Sánchez-Brunete *et al.*, 2004). Para incrementar la estabilidad física de la formulación, ésta puede ser congelada a  $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$  y posteriormente liofilizada (Telstar, Barcelona, España) durante 48 h.

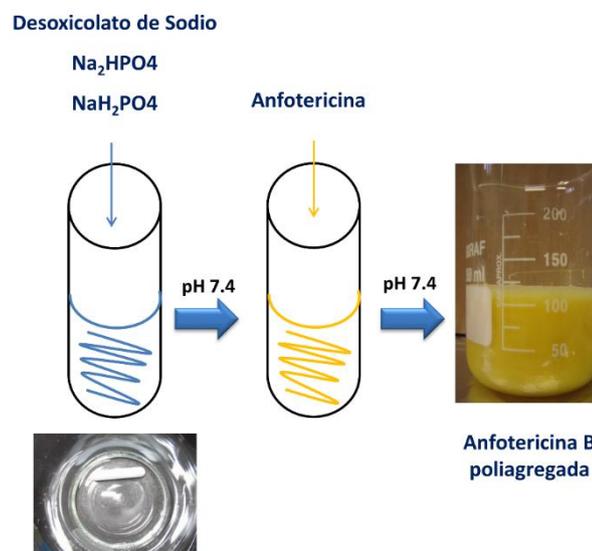


Fig 20. Esquema de la preparación de anfotericina B poliagregada.

### Microsfemas cargadas de anfotericina B poliagregada

De forma esquemáticamente el modo de preparación de las microsfemas de albúmina con anfotericina B poliagregada es el siguiente el cual también está recogido en la Figura 21:

- Una vez preparada la formulación de anfotericina B poliagregada (213 mg), gota a gota se añadieron 100 ml de una solución de albúmina sérica humana.
- A continuación, la mezcla se atomizó utilizando un atomizador Büchi B 191 (Flawil, Suiza) acoplado con una boquilla atomizadora de 0.7 mm.
- Los parámetros optimizados para la atomización fueron los siguientes: flujo de aire 463 L/h, una temperatura inlet (de entrada al equipo) de 120 °C, aspiración al 100% y bombeo de la solución a atomizar a una velocidad de 3 ml/min. La temperatura outlet (a la salida del equipo) se mantuvo constante entre 70-75 °C (Sánchez-Brunete *et al.*, 2004).
- Tras el proceso de atomización, el polvo amarillento depositado en el vaso colector fue recogido

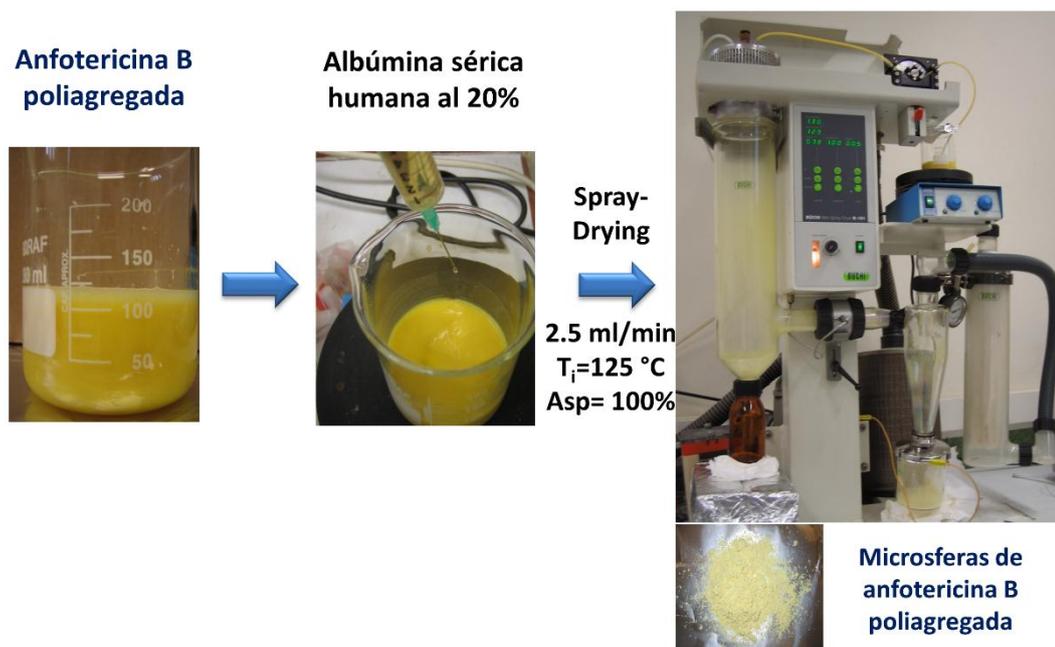


Fig 21. Esquema de la preparación de microsfemas cargadas de anfotericina B poliagregada.

### Símil de Fungizona o anfotericina B dimérica

Con el fin de comparar los diferentes estados de agregación y tamaño de partícula de la anfotericina B poli agregada con la anfotericina B dimérica, se preparó este estado de agregación de manera equivalente al producto comercializado de Fungizona® de la siguiente manera:

- Se disolvieron con agitación 41 mg de desoxicolato de sodio en 5 ml de agua desionizada.
- Una vez disuelto, se adicionaron 10 mg de fosfato dibásico de sodio y posteriormente 0,9 mg de fosfato monobásico de sodio.
- A continuación, se llevó a pH 12 añadiendo gota a gota hidróxido de sodio 2M.
- Una vez que se ha alcanzado este pH, se adicionaron 50 mg de anfotericina B. Tras una agitación intensa, la formulación adquiere un aspecto amarillo-anaranjado transparente, ya que a pH 12 va a predominar la anfotericina B en forma dimérica que es mucho más soluble que la anfotericina B poliagregada facilitando así la interacción con el desoxicolato de sodio.
- Finalmente, se ajustó el pH a 7,4 con ácido ortofosfórico 2M y se enrasó con agua destilada en un matraz de 10 ml. Aunque se neutralice el pH, se mantiene la forma dimérica de la anfotericina B sin agregarse ya que se encuentra encapsulada en sistemas micelares.

El procedimiento seguido se representa en la figura 22:

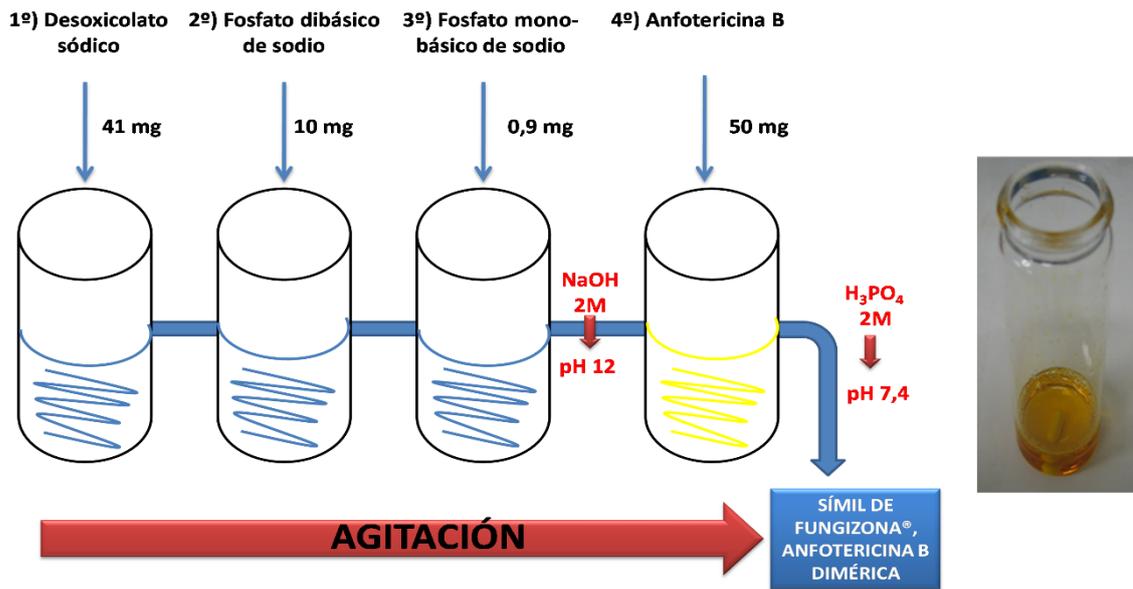


Fig 22. Esquema de la preparación de símil de Fungizona (anfotericina B dimérica).

## Caracterización de las formulaciones

### Estado de agregación

Todas las formulaciones se diluyeron con agua desionizada hasta una concentración de 5 µg/ml. Las muestras diluidas se analizaron entre 300 y 450 nm usando un espectrofotómetro UV (espectrofotómetro Shimadzu UV-1700) (Serrano *et al.*, 2013)

### Tamaño de partícula y potencial zeta

Las formulaciones se diluyeron (1 a 10 v/v) con agua desionizada (pH 6,5). Las formulaciones una vez diluidas se dejaron durante 15 minutos a temperatura ambiente antes de medir el tamaño de partícula o el potencial zeta. El tamaño de partícula y las mediciones del potencial zeta se realizaron mediante espectroscopía de correlación fotónica (Zetatrac, Microtrac, USA) a 25 °C a una longitud de onda de 633 nm. La exactitud del instrumento se evaluó utilizando una gota de perlas de látex (poliestireno, tamaño medio 0,1 µm adquirido en Sigma Aldrich, Madrid, España) en cloruro de sodio 50 mM (utilizado como fase dispersa), verificando así que los resultados del tamaño estaban de acuerdo con el tamaño nominal de las mismas.

Todas las medidas ( $n = 5$ ) se realizaron por triplicado y se calculó el tamaño medio expresado en volumen así como la desviación estándar (Serrano *et al.*, 2013).

### **Eficiencia de encapsulación**

Con el fin de cuantificar la cantidad de anfotericina cargada en las microsferas, una cierta cantidad de microsferas se dispersó en dimetilsulfóxido por triplicado, se agitó con el vórtex durante 15 minutos y se centrifugó durante 20 min. Posteriormente, se mezcló 1 parte del sobrenadante con 19 partes de metanol y se cuantificó la anfotericina en la mezcla resultante por espectrofotometría a 405 nm. El sedimento se redispersó nuevamente en dimetilsulfóxido y se sometió al mismo procedimiento (Sánchez-Bruente *et al.*, 2004).

### **Morfología**

Las muestras se diluyeron en agua desionizada (a una concentración de 1 mg/ml) antes del análisis. Se colocó una pequeña gota de la muestra sobre una rejilla Formvar © / Carbon Coated (F196 / 100 3,05 mm, Mesh 300, TabLabs Ltd, Inglaterra), eliminando el exceso de muestra con papel de filtro Whatman nº 1 (Serrano *et al.*, 2015). Las muestras se tiñieron negativamente con una solución acuosa de acetato de uranilo al 1% p / v. La microscopía electrónica de transmisión (TEM) se realizó en un equipo JEOL (JEM 1010, USA, UCM, Madrid, España) utilizando un voltaje de aceleración de 80 kV. Así mismo, se realizó microscopía electrónica de barrido (SEM) utilizando un equipo JEOL (JSM 6335F, UCM, Madrid, España) a un voltaje de aceleración de 5,0 kV. Las muestras en estado sólido (bien liofilizadas en el caso del poliagregado o atomizadas sin diluir en el caso de las microsferas) se montaron en una cinta adhesiva de doble cara y se recubrieron con una película delgada de una mezcla de oro 103/paladio previo a su análisis.

### **Velocidad de liberación de la anfotericina B a partir de las microsferas**

Los estudios de liberación se llevaron a cabo en condiciones sink en tubos de 50 ml que contenían tampón fosfato con desoxicolato sódico al 1% (50 mM, 45 ml, pH 7,4 ± 0,1), mantenido a 37 ± 0,5°C, con agitación a 50 rpm (Al-Quadeib y col., 2015). Se disolvió, bien la anfotericina B o las microsferas cargadas con anfotericina B poliagregada (equivalente a 5,0 mg de anfotericina) en 5 ml de solución fisiológica estéril al 0,9% de solución salina y 5% de glucosa (1: 9 v / v) y se añadió al tampón preparado. A diferentes intervalos de tiempo (5, 15, 30, 60, 120, 240, 300, 360 y 1440 min), se retiraron muestras (2 ml) y se filtraron a través de un filtro de membrana Millipore de 0,45 µm y se analizaron usando un método de HPLC validado (Espada *et al.*, 2008c). El volumen se reemplazó cada vez con medio precalentado para mantener así las condiciones sink.

## **Estudios de farmacocinética**

### **Características de los perros Beagles**

El primer grupo de animales (sano) consistió en cuatro machos (peso entre 15 a 19,4 kg) y dos hembras (peso entre 13,1 a 17 kg) saludables aproximadamente 4 años de edad. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética correspondiente de la Universidad CEU Cardenal Herrera (Valencia) y se llevaron a cabo en las instalaciones de la granja de la universidad.

El segundo grupo de animales (infectados con *Leishmania*) estaba formado por cinco hembras (peso entre 10,1 a 18,5 kg) aproximadamente de 2 años de edad. Los perros del segundo grupo fueron infectados por vía intravenosa con una dosis de  $5 \times 10^7$  promastigotes en fase estacionaria de *L. infantum* (M/CAN/ES/96/BCN150). El diagnóstico de la infección fue confirmada por inmunofluorescencia, frotis y cultivo en medio NNN de aspirados de médula ósea. Un año después de la infección, todos los

animales mostraron títulos de anticuerpos  $\geq 1/3200$  y cultivo de médula ósea positivo. Los animales se alojaron según las normas del comité de bienestar animal, siendo alimentados diariamente y con libre acceso a agua a lo largo del experimento. Los experimentos fueron aprobados por el Comité de Ética correspondiente de la Universidad Complutense de Madrid y se realizaron en colaboración con el grupo de Investigación de la Prof. Dra Guadalupe Miró del departamento de Sanidad Animal, y del Prof Dr. Francisco Bolás del departamento de Parasitología de la misma universidad.

### **Estudios de farmacocinética en Beagles sanos**

Los perros del primer grupo fueron asignados aleatoriamente para recibir anfotericina B poliagregada libre (N = 3) o AmBisome<sup>®</sup> (N = 3) a la dosis de 5 mg/kg de peso corporal. Previo a la administración de anfotericina B, se administró durante 20 min suero salino fisiológico para prevenir la aparición de arritmias. La anfotericina B poliagregada (5 mg/ml) se diluyó con glucosa al 5% y solución salina 0.9 % (Braun Medical S.A., Madrid, España) en un ratio 1: 1: 2, de manera que la concentración final de anfotericina fue de 1,25 mg/ml. El AmBisome<sup>®</sup> fue reconstituido utilizando agua para inyección obteniendo anfotericina B a la concentración de 4 mg/ml siendo posteriormente diluida a 1.25 mg/ml con glucosa al 5%. Ambas formulaciones se administraron por vía intravenosa (iv) lenta utilizando la vena cefálica durante un período de 20 min en un volumen total de 60 ml.

### **Estudios de farmacocinética en Beagles con *Leishmania***

Los perros del segundo grupo fueron asignados aleatoriamente para recibir bien anfotericina B poliagregada libre (n = 3) o microsferas cargadas de albúmina (n = 2) a la dosis de 5 mg/kg de peso corporal. Posteriormente, los perros recibieron dos dosis más de 5 mg/kg cada 15 días.

Igual que con los perros sanos, previo a la administración de anfotericina B, se administró durante 20 min suero salino fisiológico para prevenir la aparición de arritmias. En la primera parte de este estudio, fue administrada intravenosamente medetomidina (Domtor<sup>®</sup>, Esteve Veterinaria, España) a una concentración de 0,3-0,5 mg/kg como tranquilizante antes de la administración de las formulaciones. Después de la infusión de anfotericina B, se utilizó Atipamezol para neutralizar el estado de sedación (Antisedan<sup>®</sup>, Esteve Veterinaria, España)

La anfotericina B poliagregada se preparó de la misma manera que ha sido descrita en el apartado anterior y las microsferas se reconstituyeron usando agua para inyección hasta una concentración de 5 mg/ml que fue posteriormente diluida hasta 1,25 mg/ml con glucosa al 5% y solución salina fisiológica al 0,9% (1: 1: 2, v/v/v). Ambas formulaciones se administraron por vía intravenosa (por la vena cefálica) durante un período de 20 min en un volumen total de 60 ml.

Uno año más tarde, se realizó una segunda serie de estudios farmacocinéticos realizados con los mismos beagles cuyo diagnóstico de leishmaniasis seguía siendo positivo. Los perros fueron asignados al azar para recibir formulación poliagregada a dosis de 5 mg/kg (n = 3) o 10 mg/kg (n = 2) de peso corporal. En este caso, no se administró ningún anestésico antes de la infusión de anfotericina.

### **Recogida de muestras de plasma y análisis de anfotericina B**

Después de la administración de las diferentes formulaciones, se extrajeron diferentes muestras de sangre (2 ml) a distintos tiempos para el análisis farmacocinético y se recogieron en tubos de litio / heparina (Aquisel SL, Barcelona, España). Los tiempos de muestreo fueron los siguientes: tiempo cero (predosis), 0,25, 0,5, 1, 2, 5, 8, 24 h en Beagles infectados y a 0, 0,25, 0,5, 1, 2, 4, 6, 8, 24 y 168 h en Beagles sanos (Tabla 8). El plasma se separó por centrifugación y se almacenó a -20 °C.

Tabla 8. Tiempos de muestreo llevados a cabo durante los estudios de farmacocinética.

Tiempos de la toma de sangre	Nº de extracción	Volumen de sangre extraído (ml)
ADMINISTRACIÓN DE SUERO SALINO ANTES DE EMPEZAR CON EL TRATAMIENTO		
<b>Blanco</b> (antes de la administración de la anfotericina)	1ª	2 ml
ADMINISTRACIÓN POR VÍA INTRAVENOSA EN PERFUSIÓN DE LA AMB		
<b>T=0</b> (justo después de terminar la administración del fármaco, sacada de la extremidad opuesta de la vía por la que se administra la anfotericina)	2ª	2 ml
<b>T=15 min</b> (después de terminar el tratamiento, sacada de la vía por donde se administra el fármaco)	3ª	2 ml
<b>T= 30 min</b>	4ª	2 ml
<b>T= 60 min</b>	5ª	2 ml
<b>T= 2 horas</b>	6ª	2 ml
<b>T= 5 horas</b> (4h y 6h en las Beagle sanos)	7ª	2 ml
<b>T= 8 horas</b>	8ª	2 ml
<b>T= 24 horas</b>	9ª	2 ml
<b>T= 7 días</b>	10ª	2 ml
<b>T= 15 días</b>	11ª	2 ml

A las muestras de plasma (250 µl) se les añadió meloxicam (Fagrón SL., Madrid, España) como estándar interno (SI) a una concentración final de 10 µg/ml. Se realizaron dos extracciones con metanol (750 µl x 2) y una tercera con acetonitrilo (750 µl). En cada extracción, la mezcla se agitó en vórtex y después se centrifugó (9000 rpm, 10 min). El sobrenadante (300 µl x 3) se recogió y los disolventes se evaporaron en un concentrador (Savant, SpeedVac®) durante 6 h a 30°C. Las muestras fueron reconstituidas con metanol: fase móvil (1: 1, v/v) y luego se centrifugaron (9000 rpm, 5 min). El sobrenadante se analizó por un método de HPLC

previamente validado (Espada *et al.*, 2008c). El HPLC consistía en una bomba Jasco PU-1580, un inyector Jasco AS-2050 Plus y un detector Jasco UV-1575 UV visible. La integración de los picos se realizó con el programa Borwin 1.5 para PC (JMBS Developments). Los compuestos fueron separados con una columna con un tamaño de partícula de 200 x 4,6 mm x 5 µm marca ThermoHypersil BDS C18 de fase inversa. La elución se llevó a cabo de forma isocrática con una fase móvil que consistía en una mezcla de acetonitrilo-ácido acético-agua (52: 4,3: 43,7, v/v/v), filtrada a través de una membrana de 0,45 µm de polipropileno (GH polypro, Pall Corp., USA). El flujo fue de 1 ml/min y el efluente se monitorizó a 406nm. Bajo estas condiciones, el tiempo de retención relativo de la anfotericina B y del IS fue de 5,8 y 4,9 min respectivamente. Las concentraciones plasmáticas de anfotericina B fueron calculadas a partir de curvas de calibración de regresión lineal utilizando la relación de las alturas entre la anfotericina B y el IS. El rango lineal en plasma fue de 0,01 a 40 µg/ml ( $R^2 > 0,9995$ ). La recuperación de anfotericina del plasma fue 76,7%.

### **Análisis de datos**

El análisis farmacocinético de los datos se llevó a cabo utilizando el modelo no compartimental (Bekersky *et al.*, 1999; Serrano *et al.*, 2013; Serrano *et al.*, 2015). El área bajo la curva de concentración plasmática versus tiempo (AUC) se calculó utilizando la regla de los trapecios. La concentración en el tiempo = 0 ( $C_{max}$ ) se calculó por extrapolación en el eje de las Y de la concentración expresada en forma de ln de los dos primeros puntos de concentración en plasma. La constante de velocidad de eliminación de fase terminal ( $\lambda$ ) se calculó a partir de la pendiente negativa de la porción terminal ln-lineal de la curva de concentración plasmática versus tiempo.

La semivida de eliminación terminal ( $t_{1/2}$ ) se calculó como  $0,693 / \lambda$ . El volumen de distribución se calculó como:

$$V_{area} = Dosis / (\lambda \times AUC_{0-\infty}) \quad (Eq. 1)$$

El análisis estadístico (ANOVA) se realizó con Statgraphics Centurión XVI (versión 16.1.15) considerando valores  $p < 0.05$  como diferencias estadísticamente significativas.

## RESULTADOS

### Preparación y caracterización de las formulaciones

Las principales características (tamaño de partícula, estado de agregación, potencial zeta y eficiencia de encapsulación) y composición de todas las formulaciones ensayadas se encuentran resumidas en la Tabla 9. El estado de agregación de la anfotericina B se correlaciona con los espectros UV y con los picos de absorción máxima. Según lo descrito por Torrado *et al.*, 2008, la forma dimérica se caracteriza por presentar una banda intensa entre 328-340 nm mientras que las formas poliagregadas se caracterizan por bandas de menor intensidad a las siguientes longitudes de onda 360 - 363, 383-385 y 406-420 nm. Tanto la anfotericina B poliagregada libre como la encapsulada en microsferas de albúmina presentaron el mismo espectro UV correspondiente con el estado de agregación poliagregado (Figura 23).

Tabla 9. Principales características de las formulaciones preparadas: composición, excipientes empleados, estado de agregación (EA) junto con las longitudes de onda máxima en el UV, tamaño medio de partícula, potencial zeta (ZP) y eficiencia de encapsulación (EE).

Formulación (Ratio Anfotericina: Excipientes en peso)	Excipientes	EA ( $\lambda_{max}$ )	Tamaño medio de partícula ( $\mu\text{m}$ )	ZP (mV)	EE (%)
<b>Anfotericina B dimérica (49:51)</b>	Desoxicolato de sodio Fosfato dibásico de sodio Fosfato monobásico de sodio Hidróxido de sodio Ácido ortofosfórico	Dímero (328–340 nm)	0.03 ± 0.01	-16.5 ± 2.3	99.8 ± 0.2
<b>Anfotericina B poliagregada (49:51)</b>	Desoxicolato de sodio Fosfato dibásico de sodio Fosfato monobásico de sodio	Poliagregado (360–363, 383– 385, 406–420 nm)	0.38 ± 0.12	-39.7 ± 1.2	-
<b>Microsfemas de albúmina cargadas con anfotericina B poliagregada (5:95)</b>	Desoxicolato de sodio Fosfato dibásico de sodio Fosfato monobásico de sodio Álbumina sérica humana al 20%	Poliagregado (360–363, 383– 385, 406–420 nm)	3.1 ± 1.4	+35.1 ± 1.8	82.1 ± 6.5

Las formulaciones con anfotericina B en forma dimérica tienen un color transparente anaranjado, mientras que las formas poliagregadas son suspensiones amarillentas. Por esta razón, la eficiencia de encapsulación es muy alta en el caso de la anfotericinadimérica cerca al 100% con un tamaño de partícula en torno a las 30 nm y un potencial zeta de -16 mV (no siendo tan estable como la formulación poliagregada con tendencia a precipitar a lo largo del tiempo). Sin embargo, la anfotericina B poliagregada tiene un tamaño medio casi 10 veces superior que la dimérica con un potencial zeta aún más negativo de -39 mv lo que implica que es una sistema más estable. Como se observa en la Figura 23, la anfotericina B poliagregada se encuentra en forma de agujas que tras ser liofilizadas se agrupan entre sí con forma de roseta. En cuanto a las microsferas, se caracterizan por presentar una eficiencia de encapsulación alta por encima del 80% siendo el rendimiento del proceso de la atomización superior al 75%. Presentan forma redondeada con un tamaño de partícula

en torno a las 3  $\mu\text{m}$  en forma de donut en algunos casos debido a alta energía que se genera a la salida de la boquilla atomizadora.

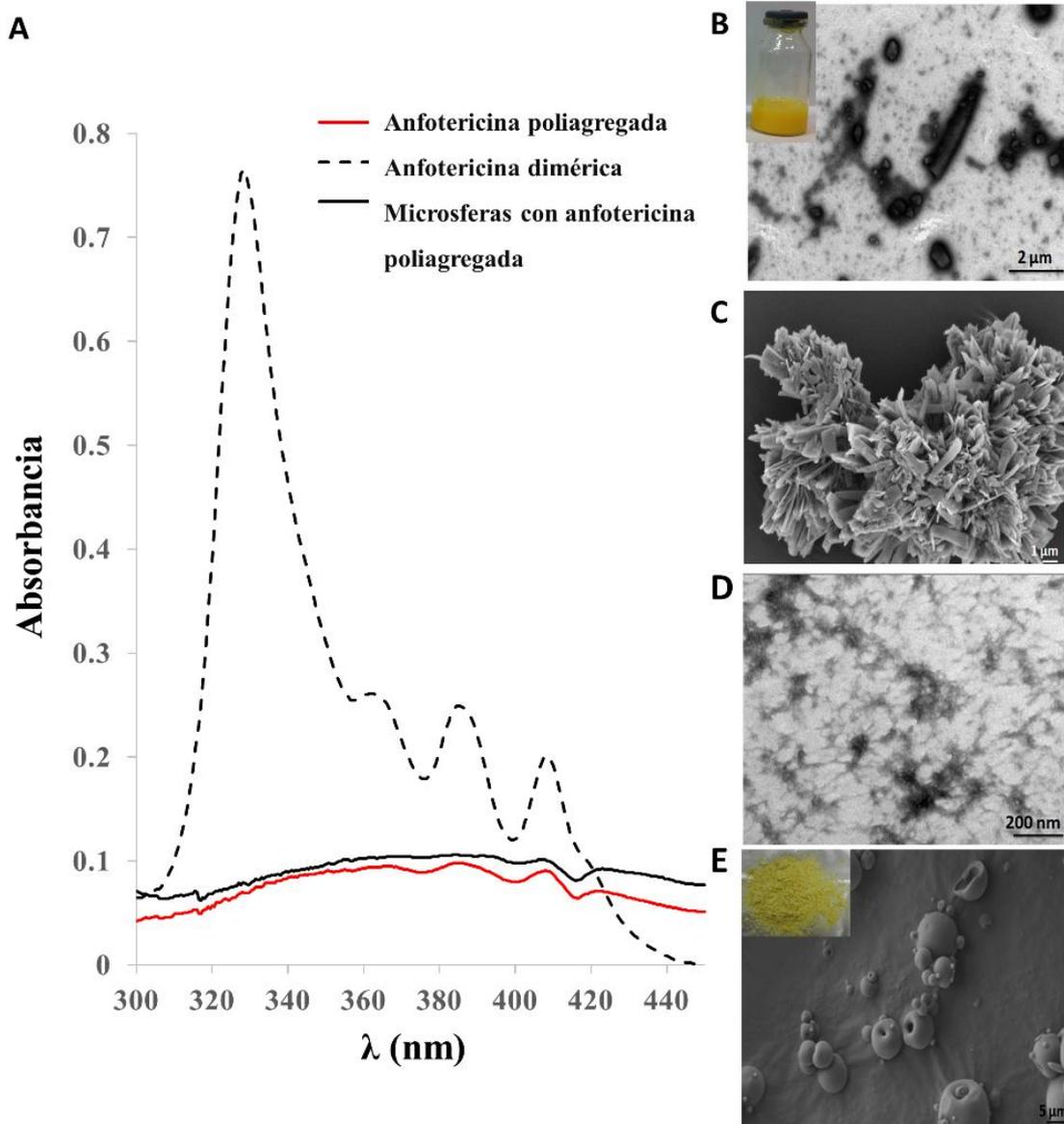


Figura 23. Estado de agregación y morfología de las formulaciones. A) Estado de agregación de la anfotericina dimérica en comparación con la anfotericina poliagregada y las microsferas cargadas con anfotericina poliagregada. B) TEM de anfotericina poliagregada; Barra: 2  $\mu\text{m}$ ; C) SEM de anfotericina poliagregada liofilizada; Barra: 1  $\mu\text{m}$ ; D) TEM de microsferas de albúmina cargadas con anfotericina B poliagregada reconstituidas en agua desionizada; Barra: 200 nm; E) SEM de microsferas de albúmina cargadas con anfotericina B poliagregada atomizadas, Barra: 5  $\mu\text{m}$ .

### Velocidad de liberación de las microsferas

La suspensión acuosa de anfotericina B mostró una liberación limitada en PBS (pH 7,4) debido a la baja solubilidad acuosa a pH fisiológico ( $<50 \mu\text{g/ml}$ ). Por el contrario, las microsferas de anfotericina B poliagregada (AmB-AME) mostraron un efecto *burst* durante los primeros 15 min en PBS a pH 7,4 equivalente a una liberación del 25% del principio activo; sin embargo, posteriormente los niveles permanecieron estables a lo largo del experimento indicando un equilibrio entre el fármaco unido a albúmina y el fármaco libre en solución-agregado (Figura 24). A las 24 h se observó una disminución en los niveles de anfotericina B, lo que probablemente podría explicarse por la degradación del fármaco en medio acuoso a  $37^\circ\text{C}$ .

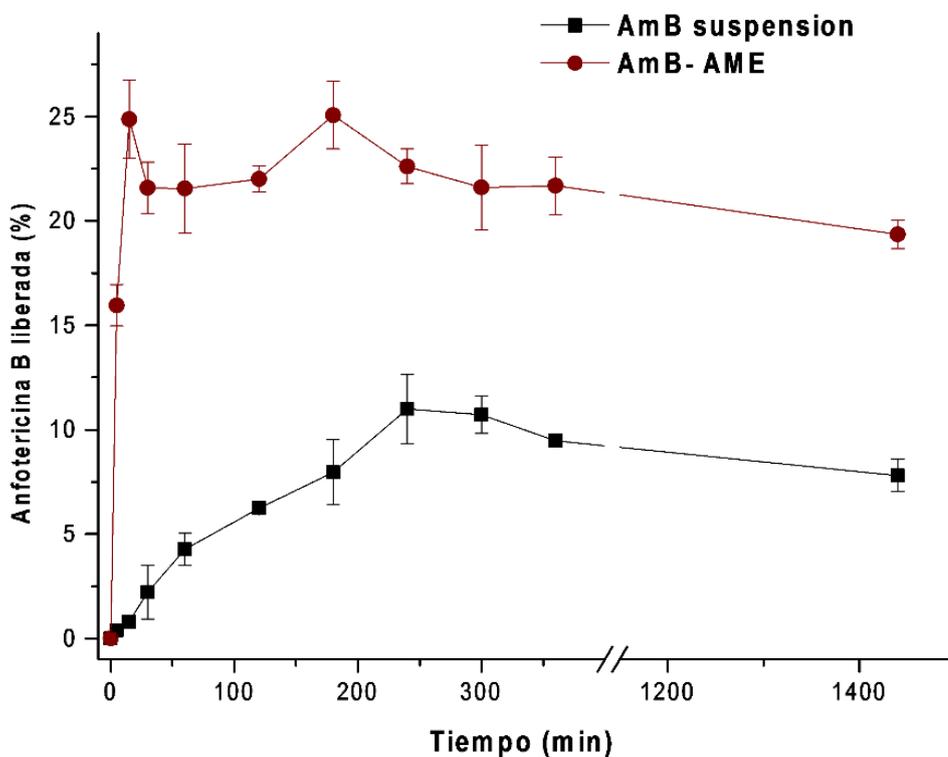


Figura 24. Velocidad de liberación *in vitro* (%) de microfeseras cargadas con anfotericina B poliagregada. Clave: AME, microfeseras de albúmina.

## Perfil farmacocinético

### Perfil farmacocinético en perros sanos

En primer lugar, queríamos comparar las diferencias a nivel farmacocinético existentes entre el Ambisome® que es la formulación más utilizada en la práctica clínica en humanos en Europa, frente a la nueva formulación de anfotericina B poliagregada. Administrando la misma dosis de 5 mg/kg en perros Beagle sanos, las concentraciones plasmáticas que se obtuvieron con el Ambisome® o con el poliagregado son totalmente diferentes (Tabla 10 y Figura 24).

Tabla 10. Perfil farmacocinético en plasma tras la administración de una dosis de 5 mg/kg de anfotericina B poliagregada versus AmBisome® en perros Beagle sanos.

FORMULACIÓN	T <sub>1/2</sub> (H)	C <sub>0</sub> (µG/ML)	V <sub>AREA</sub> (L/KG)	AUC <sub>0-∞</sub> (µG·H/ML)
Anfotericina B poliagregada	56.1 ± 3.5	2.1 ± 0.3	19.9 ± 2.7	20.4 ± 1.6
Ambisome®	23.4 ± 0.5	110.2 ± 13.4	0.1 ± 0.01	1539.7 ± 82.5

La C<sub>0</sub> tras ser extrapolada con los dos primeros valores de concentraciones plasmáticas fueron 2.1 y 110 µg/ml para el poliagregado y el Ambisome® respectivamente, lo que da lugar a un AUC mucho más elevado (77 veces superior) para el Ambisome®. Sin embargo, a la hora de tratar la leishmaniasis es importante que el fármaco sea capaz de alcanzar el órgano diana durante el tiempo suficiente y por eso son críticos otros dos parámetros farmacocinéticos: el volumen de distribución por el organismo y la semivida plasmática. En este caso, la anfotericina B poliagregada presenta valores muy superiores al AmBisome® siendo el volumen de distribución casi 200 veces superior y la semivida plasmática el doble. Esto significa que el poliagregado es capaz de mantenerse en el organismo durante periodos más

prolongados y por lo tanto sería posible utilizar regímenes de administración más espaciados.

En resumen, mientras que el Ambisome<sup>®</sup> se caracteriza por presentar altas concentraciones en plasma y lenta distribución a tejidos, el poliagregado es rápidamente eliminado del plasma pero no del organismo ya que a los 7 días todavía existe fármaco en el organismo (Figura 24). Esta rápida eliminación de plasma posiblemente se relacione con la morfología (tamaño de partícula y carga) del poliagregado que facilite su opsonización seguida de fagocitosis por el RES. Mientras que los liposomas al tener un tamaño de partícula próximo a los 70-80 nm pasa desapercibido por el RES y se mantiene en sangre desde donde se va distribuyendo lentamente a tejidos (Olson *et al.*, 2008). Una distribución similar también se ha observado tras la administración del Abelcet<sup>®</sup>, que es otra formulación lipídica con anfotericina B con un tamaño de partícula en torno a las 3  $\mu\text{m}$  (Vanneaux *et al.*, 2014). Un aspecto relevante en la curva de concentraciones plasmáticas versus tiempo en el poliagregado es que existe un incremento en las concentraciones plasmáticas entre las 4 y 8 h posteriores a la administración. Parece estar relacionado con varios factores. Por un lado, puede ser el resultado de una entrada cíclica del fármaco en la circulación ya sea por excreción en bilis, seguida de circulación enterohepática (teniendo en cuenta que un alto porcentaje del fármaco se elimina inalterado por las heces) o bien debido a una redistribución en otros tejidos como el hígado que secreta lipoproteínas a las cuales se podría encontrar unida la anfotericina B. Por otra parte, podría estar relacionado con el incremento diario y/o postprandial de lípidos circulantes que podrían desencadenar un aumento en la capacidad de unión de la anfotericina B a estas lipoproteínas en plasma (Olivier & Tanner, 1987; Gershkovich *et al.*, 2010; Serrano *et al.*, 2013)

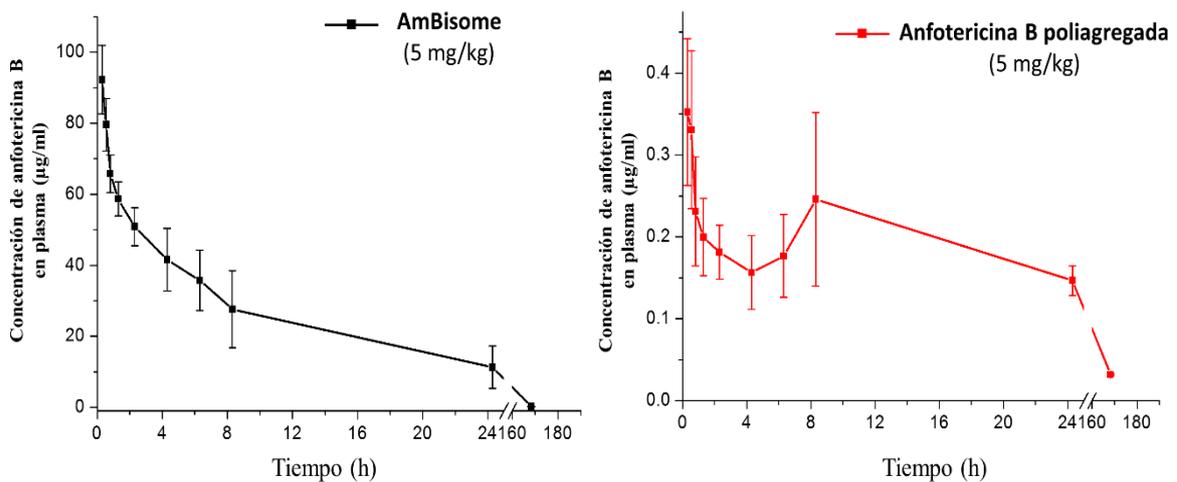


Figura 24. Perfil farmacocinético de anfotericina B poliagregada y AmBisome tras la administración intravenosa de una dosis de 5 mg/kg en Beagle sanos.

Por último, cabe destacar, que de los tres Beagles a los que se les administró el AmBisome<sup>®</sup>, uno de ellos sufrió una reacción adversa grave durante los 10 min posteriores a la perfusión del tratamiento, acompañada por taquicardia, broncoespasmo, vómito amarillento y diarrea, que se resolvió 20 minutos después con la administración de suero fisiológico por vía intravenosa, ya que ayudó a diluir el fármaco en sangre. Podríamos pensar que el AmBisome<sup>®</sup> al alcanzar una  $C_{max}$  plasmática muy superior a la del poliagregado, el riesgo de toxicidad aguda es mayor.

### Efecto de la dosis administrada y del estado de salud del Beagle

En los beagles infectados, se produjo un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de 1,5 veces en el AUC cuando se administró una dosis de 10 en vez de 5 mg/kg de anfotericina B poliagregada. Sin embargo, la relación no fue lineal, es decir, aunque se dobló la dosis, los valores encontrados en plasma sólo fueron 1.5 veces superiores (teniendo en cuenta el AUC). Por otro lado, cuando la misma formulación de anfotericina B poliagregada se administró a la dosis de 5 mg/kg en beagles sanos, los valores de AUC y las concentraciones plasmáticas fueron significativamente ( $p < 0,05$ ) menores que en los perros infectados (Figura 25).

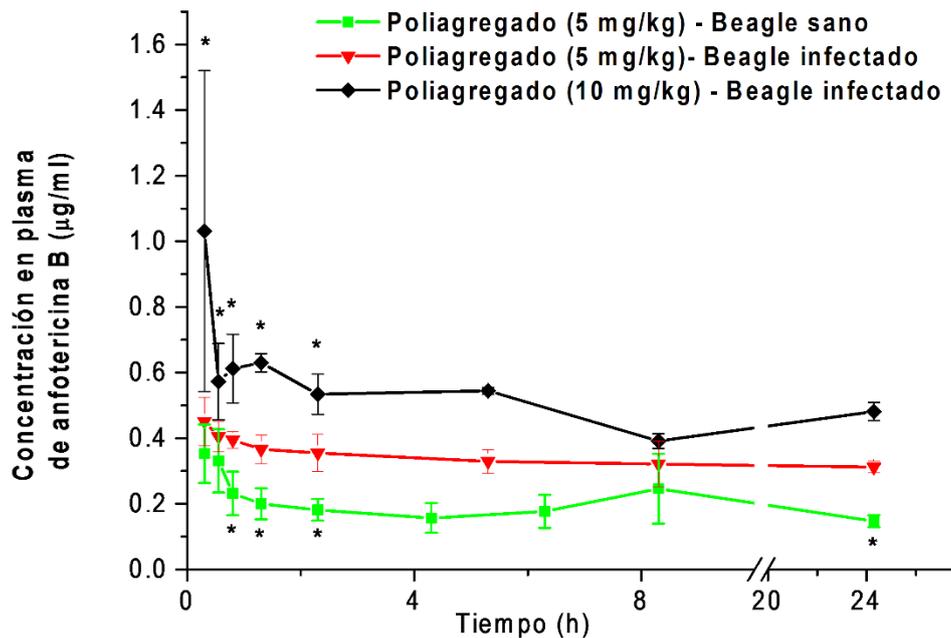


Figura 25. Perfil farmacocinético de la anfotericina B poliagregada a diferentes dosis (5 y 10 mg/kg) y la influencia del estado de salud del beagle sano o con leishmaniasis. \*P< 0.05 en comparación con la formulación poliagregada en beagles con leishmaniasis.

La anfotericina B presenta una alta unión a proteínas plasmáticas superior al 95-99%, de forma que cuando las proteínas se han saturado aunque se administre una dosis mayor de fármaco, éste no puede quedarse en plasma sino que es rápidamente retirado de la circulación por el RES. Por este motivo, se podría explicar porqué al doblar la dosis de anfotericina B poliagregada, los valores de AUC y de concentración plasmática no son el doble sino solamente 1.5 veces superiores.

Por otro lado, hay que tener en cuenta que en los casos de leishmaniasis, el proteínograma puede verse alterado, lo que podría repercutir en la interacción entre la anfotericina B y las proteínas del plasma. Además, también hay que tener en cuenta que la actividad fagocítica de los macrófagos infectados por *Leishmania* está disminuida (Olivier & Tanner, 1987), y por lo tanto, la captación de partículas opsonizadas de la circulación podría ser inferior. Esto puede explicar por qué la concentración plasmática de anfotericina B en los Beagles sanos es inferior a la de los Beagles infectados. Este hecho también podría explicarse debido a que existe una

mayor eliminación de anfotericina B desde tejidos que se encuentran inflamados, como puede ser el hígado o bazo en perros con leishmaniasis dando lugar a mayores concentraciones plasmáticas o incluso a la unión de la anfotericina B al ergosterol de la membrana de los parásitos que se encuentren en circulación sistémica en ese momento (Gershkovich *et al.*, 2010).

### **Efecto de la anestesia**

La administración de anestesia antes de la infusión del poliagregado a la dosis de 5 mg/kg dio lugar a valores de concentraciones plasmáticas significativamente inferiores ( $p < 0.05$ ) en comparación con aquellos animales que no recibieron ningún tipo de anestesia (Figura 26). Esto podría deberse a que el anestésico se puede unir a proteínas plasmáticas en un alto porcentaje, y al administrar la anfotericina B, las proteínas se saturarían mucho más rápido y por lo tanto, se desplazaría a la anfotericina B de su lugar de unión, de manera que se redistribuiría a los tejidos en mayor medida.

Otro problema añadido de la anestesia es que agrava ciertos efectos adversos de la anfotericina B tales como la hipotensión, haciendo que el tiempo de recuperación tras la administración del fármaco se prolongue de 1- 2h a 5-6 h, en los que el perro yace tumbado prácticamente sin moverse de manera atípica a su estado habitual.

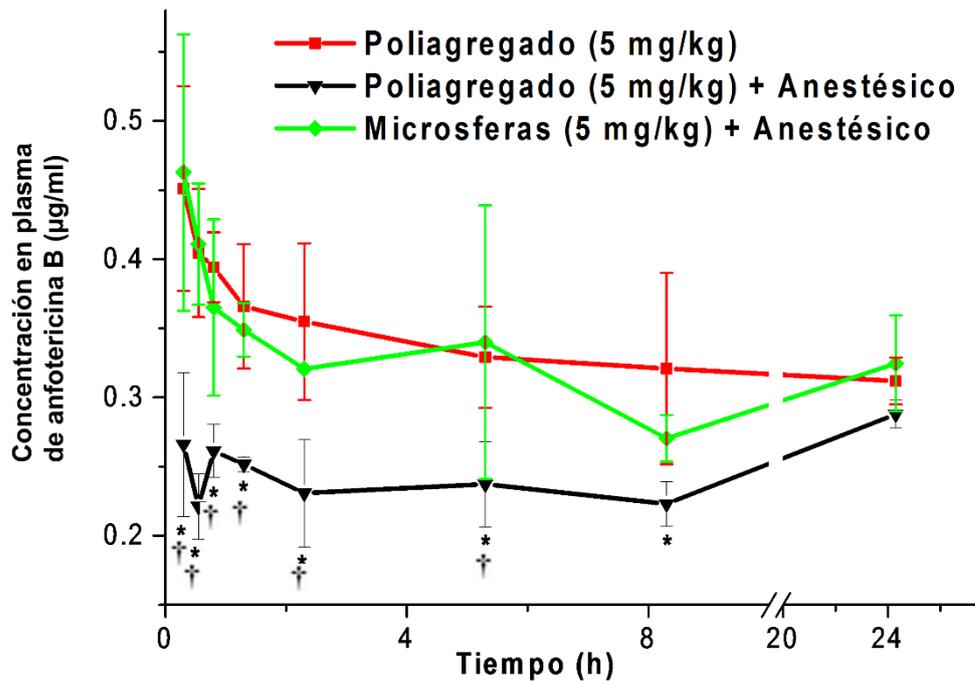


Figura 26. Perfil farmacocinético en perros con leishmaniasis de la anfotericina B poliagregada libre y encapsulada en microsferas de albúmina e influencia de la anestesia. \*  $p < 0.05$  entre la formulación poliagregada con o sin administración previa de anestesia. †  $p < 0.05$  entre la formulación poliagregada libre y las microsferas en presencia del anestésico.

### Efecto de las microsferas

Cuando la formulación poliagregada se administra encapsulada en microsferas de albúmina, el fármaco en sí ya se encuentra unido a la albúmina de las microsferas y por lo tanto el efecto de la anestesia no es tan drástico. Debido al efecto transportador de la albúmina de las microsferas, la anfotericina B puede ligarse a ella y permanecer más tiempo en sangre. Como se puede observar en la Figura 26, existen diferencias significativas entre el poliagregado libre y las microsferas ambos administrados en perros anestesiados. Las concentraciones plasmáticas que se alcanzan con las microsferas en presencia del anestésico son similares a las del poliagregado libre sin previa administración del anestésico. Por lo tanto, cabe pensar que la anfotericina B poliagregada encapsulada en microsferas de albúmina sería una formulación que se vería menos afectada por cualquier alteración que se pudiera producir en el proteínograma del perro y por lo tanto con menor riesgo de interacciones y efectos adversos.

Sin embargo, la realidad fue muy diferente, de las dos perras tratadas con microsferas, una de ellas durante la segunda administración desarrolló un cuadro que se podría asociar a un shock anafiláctico, con broncoespasmo, que casi le produce la muerte. Las microsferas fueron preparadas con albúmina humana, ya que el coste de comprar albúmina de perro era muy alto y se requería mucha sangre para poder conseguir la albúmina necesaria para poder preparar la formulación, esto supone una limitación en el desarrollo de la formulación. El efecto adverso observado podría deberse a una sensibilización a la albumina humana tras la primera administración intravenosa, lo que daría lugar a un shock anafiláctico la segunda vez que el Beagle entrase en contacto con el mismo antígeno. No obstante, el hecho de que el efecto alergizante sea atribuido a la albúmina solamente es discutible, ya que por sí misma la anfotericina puede producir reacciones anafilácticas y de hipersensibilidad. Sin embargo, no se observaron efectos adversos tras la administración de la anfotericina B poliagregada libre en ninguno de los Beagles. Por razones éticas, no se continuó el estudio con las microsferas.

### **Dosis múltiples**

La formulación poliagregada libre se asoció con un mejor perfil de seguridad. Sin embargo, no es conveniente administrar dosis muy elevadas ya que pueden producir efectos de toxicidad severos en los perros. En humanos, se suele administrar una dosis acumulada de 10-15 mg/kg de AmBsiome<sup>®</sup> en función de la gravedad de la enfermedad. Por esta razón se decidieron dar tres dosis de 5 mg/kg con un intervalo de administración de 15 días. Como puede observarse en la Figura 27, a los 15 días posteriores a la primera dosis y antes de administrar la segunda dosis de 5 mg/kg todavía seguían quedando en plasma concentraciones de anfotericina B superiores a 0.03 µg/ml (valor que se ha elegido en base a la ED<sub>50</sub> *in vitro* de anfotericina B frente a amastigotes). Sin embargo, las concentraciones fueron inferiores a este valor a los 15 días posteriores a la segunda dosis.

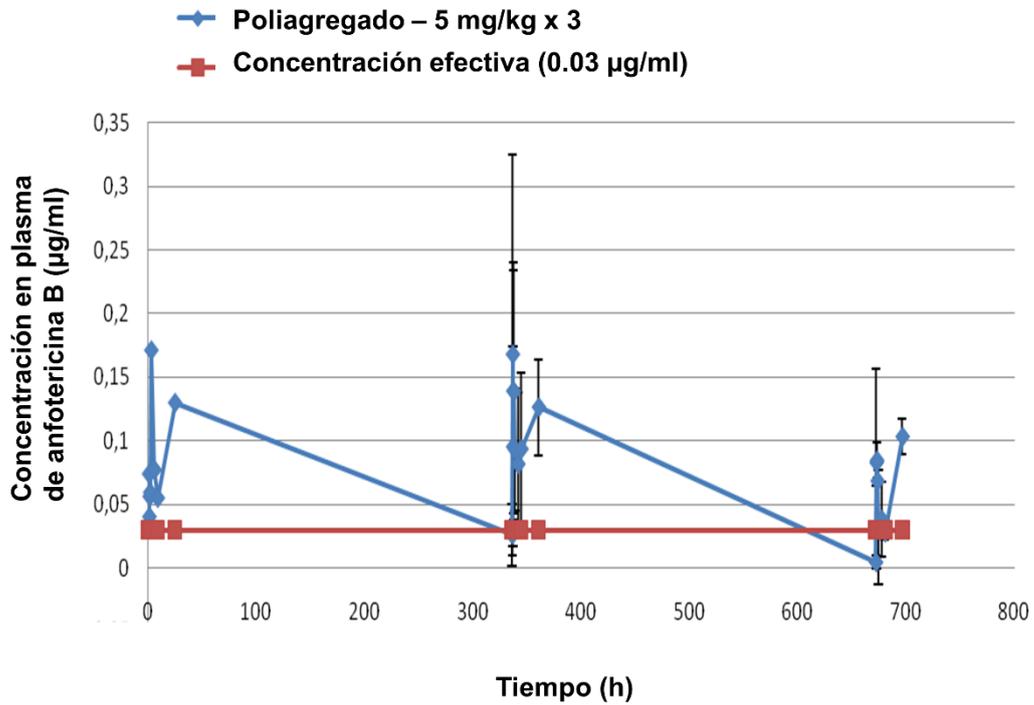


Figura 27. Concentraciones plasmáticas tras la administración consecutiva de 3 dosis de 5 mg/kg de anfotericina B poliagregada cada 15 días. En rojo se ha representado lo que podría definirse como concentración eficaz de anfotericina B frente a *Leishmania*.



## **CAPÍTULO II. ESTUDIO FARMACODINÁMICO DE ANFOTERICINA B POLIAGREGADA**

---



## ANTECEDENTES

La leishmaniosis es además una zoonosis, en la que los principales reservorios son los perros. El elevado porcentaje de perros infectados en las zonas endémicas suponen un grave problema de salud pública, especialmente en el caso de los animales infectados pero asintomáticos, ya que juegan un papel crucial en la transmisión de esta enfermedad. La dificultad de controlar los vectores y la cuestionable eficacia de las vacunas comercializadas para uso veterinario, hacen que la principal forma de control siga siendo el tratamiento de la enfermedad, tanto de los enfermos como de los reservorios. Sin embargo, existen muy pocos fármacos disponibles en el tratamiento de la leishmaniosis y ninguno consigue la eliminación total del parásito y en general presentan graves efectos secundarios.

Aunque se están buscando nuevos compuestos activos frente a esta parasitosis, poder llevarlos desde los laboratorios de investigación hasta las fases de ensayos clínicos y finalmente hasta su comercialización supone mucho esfuerzo, dinero y tiempo. Por ello y mientras tanto es interesante aprovechar los recursos ya disponibles. La anfotericina B se ha usado con grandes reservas en el tratamiento de la leishmaniosis porque la forma en la que se emplea produce toxicidad renal, sin embargo, es un compuesto bastante eficaz y además no se han descrito resistencias al mismo. Entre las estrategias para mejorar el índice terapéutico de la anfotericina, está la preparación de diversas formulaciones que reduzcan su toxicidad. Hasta el momento, existen varias formulaciones comercializadas, bien en sistemas lípicos o en dispersión coloidal, que se usan tanto en la candidiasis como en leishmaniosis humana, con una mejor tolerancia y menor toxicidad que la formulación en deoxicolato, pero con un elevado costo económico. Sin embargo, en el ámbito veterinario, el uso de anfotericina es muy limitada, y se prefiere el uso de glucantime o la miltefosina por su más fácil manejo, a pesar de que existen resistencias y/o fallos terapéuticos a ambos compuestos.

## OBJETIVOS E HIPÓTESIS

Estudios previos realizados por nuestro grupo en un modelo de leishmaniosis en criceto (*Mesocricetus auratus*) habían demostrado que la formulación en microesferas de albúmina era altamente eficaz, consiguiéndose el aclaramiento de los parásitos en los órganos diana con la remisión de los síntomas y además mostraba una mejor tolerabilidad a dosis elevadas que la formulación poliagregada libre (Sánchez-Brunete *et al.*, 2005; Rama Iñiguez *et al.*, 2006; Espada *et al.*, 2008).

El modelo de criceto resulta ser el de elección como modelo experimental de la leishmaniosis ya que el desarrollo de la enfermedad presenta elevadas similitudes con lo que sucede en el perro y en el humano. Partiendo por tanto de los datos obtenidos en este modelo se eligieron estas dos formulaciones, microesferas en albúmina sérica y en forma poliagregada libre para evaluar su eficacia en un modelo canino. Por otro lado, debemos tener en cuenta que el proceso de absorción, distribución, metabolismo y eliminación de los fármacos varía de unos animales a otros, y por tanto puede afectar a su eficacia, por lo que la elección definitiva de la formulación a ensayar en perros naturalmente infectados se realizó en función de los resultados de farmacocinética realizados en el capítulo anterior.

Los objetivos concretos de este capítulo son:

1. Valoración de la eficacia de una nueva formulación de anfotericina B preparada como poliagregado libre frente a la leishmaniosis visceral en un modelo de leishmaniosis canina en animales naturalmente infectados, mediante métodos no invasivos.
2. La formulación de poliagregado libre se caracteriza por una mayor acumulación en órganos diana y una lenta eliminación, por lo que se además se pretende seleccionar una pauta posológica que mejore la tolerabilidad del principio activo, evitando la aparición de efectos adversos.

## MATERIAL Y MÉTODOS

### REACTIVOS GENERALES

#### SOLUCIÓN SALINA

-Cloruro sódico	9 g
-Agua destilada c.s.p.	1000 ml

#### PBS 10x

-NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> • H <sub>2</sub> O	2.5 g
-Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	22.4 g

Disolver en aproximadamente 700 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7,2

-ClNa	87.6 g
-------	--------

Completar hasta un litro de agua destilada.

Diluir a 1/10 antes de usar, con lo que al final se obtiene un tampón hasta concentración final 0.01 M fosfato y 0.15 M cloruro sódico.

#### ALBÚMINA SÉRICA BOVINA (BSA) Sigma

#### MEDIOS DE CULTIVO

**MEDIO DE CULTIVO C-199 (SIGMA):** adicionado de 1% de adenina (Sigma), 10 mM en HEPES (Sigma) 50 mM; 0.2% de hemina (Sigma) 0.25% (p/v) en trietanolamina (Sigma) 50%; bicarbonato (Panreac) 0.348 g/L, hepes 25 mM, penicilina (Penilevel) 100 UI/ml, estreptomycin (Cepa) 100 µg/ml y SBF (Quimigen) 20%, ajustándose el pH a 7.2 y posterior esterilización mediante filtración por membrana de 0.22 µm.

**MEDIO DE CULTIVO SCHNEIDER'S (SIGMA):** adicionado de hepes 4 g/L, bicarbonato 0.4 g/L, penicilina 100 UI/ml, estreptomina 100 µg/ml y SBF 10%, ajustándose el pH a 6.7 y posterior esterilización mediante filtración por membrana de 0.22 µm.

#### **OBTENCION DEL ANTÍGENO (Extracto bruto salino)**

Se emplearon promastigotes en fase estacionaria (día 7 post-inóculo) de *L. infantum* de las cepas M/CAN/ES/92/BCN83 y M/CAN/ES/96/BCN150 obtenidos a partir de cultivos en masa en medio Schneider's o en medio C-199 respectivamente. Dichos promastigotes se sometieron a varios lavados por centrifugación en PBS a 2500 r.p.m. durante 10 minutos y posteriormente se dispusieron en tubos Eppendorff de base cónica inmersos en baño de hielo y se sonicaron, mediante pulsos de 10 segundos, en un sonicador (Hielscher GmbH) al 100% de potencia. El proceso finalizó cuando microscópicamente no se observaba ningún promastigote entero. La extracción de las proteínas se realizó en PBS pH 7.2-7.4, durante 24 horas a 4° C. Al día siguiente, se centrifugó a 15.000 r.p.m. durante 1 hora a 4° C, recogiendo el sobrenadante, que fue dializado frente a PBS pH 7.2-7.4. La concentración de proteínas fue valorada mediante el método de Bradford. Una vez fraccionadas, las muestras fueron congeladas a -80° C hasta su uso.

#### **VALORACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO BRADFORD**

La concentración proteica, en todos los casos, se determinó mediante el método de Bradford (1976), empleando una solución colorante de Bio-Rad (Bio-Rad) y siguiendo el procedimiento de microensayo que permite detectar concentraciones entre 5-25 µg/ml. Para ello, se realizó una curva patrón proteica (con BSA) a partir de una solución madre de concentración 1 mg/ml. Se realizaron distintas diluciones de la muestra problema en las mismas condiciones y a continuación se añadieron 200 µl del reactivo de Bradford y se incubaron durante 5-10 minutos a temperatura ambiente.

Posteriormente se midieron las absorbancias a 595 nm en un espectrómetro (Ultrospec III Pharmacia LKB).

### **PORTA-OBJETOS ANTIGENADOS PARA INMUFLUORESCENCIA INDIRECTA (IFI)**

Se preparó una suspensión de promastigotes en fase estacionaria de *L. infantum* (M/CAN/ES/92/BCN83) que fueron lavados con tampón PBS y posteriormente se resuspendieron en tampón PBS-formol 4% a una concentración de  $4 \times 10^6$ . Se dispusieron 20  $\mu$ l de la suspensión en cada uno de los pocillos de los portaobjetos para IFI (BioMeriex). Una vez secos, la fijación se realizó con acetona durante 15 minutos.

### **REACTIVOS DE ELECTROFORESIS**

#### ➤ **Acrilamida/Bisacrilamida (30 : 0,8)**

-Acrilamida (BioRad)	30 g
-Bisacrilamida (BioRad)	0,8 g

Se lleva hasta un volumen de 100 ml de agua destilada, la solución final se filtra con papel Whatman nº1, y se almacena en oscuridad y a 4° hasta su uso.

#### ➤ **Tampón 3 M Tris-ClH, pH 8,8 (“Resolving”)**

-Tris (Merck)	36.3 g
-Agua destilada c.s.p.	100 ml

Se disuelve la totalidad del Tris en aproximadamente 75 ml de agua destilada, ajustándose a continuación el pH a 8.8 con HCl 1N, y enrasándose finalmente el volumen hasta 100 ml de agua destilada. Se filtra con papel Whatman nº1 y se almacena a 4°C hasta su uso.

➤ **Tampón 0.5 M Tris-ClH, pH 6.8 ("Stacking")**

-Tris (Merck)	6.0 g
-Agua destilada c.s.p.	100 ml

Se disuelve la totalidad del Tris en aproximadamente 75 ml de agua destilada, ajustándose el pH a 6.8 con HCl, y enrasándose finalmente el volumen a 100 ml con agua destilada. se filtra con papel Whatman nº 1 y se almacena a 4°C.

➤ **Tampón de electroforesis 10X, pH 8.3 ("Reservoir buffer")**

- Tris (0.25 M)	30.3 g
- Glicina (1.92 M) (Amresco)	144 g
- SDS (1%) (Sigma)	10 g
- Agua destilada c.s.p.	1000 ml

Almacenar a 4°C. Reconstituir en el momento de su uso.

➤ **Amonio persulfato**

-Amonio persulfato (Merck)	0,05 g
-Agua destilada	3 ml

La disolución se prepara justo en el momento de su uso.

➤ **SDS 10%**

-SDS (Sigma)	10 g
-Agua destilada	100 ml

➤ **Tampón de muestra**

-Agua destilada	3 ml
-0.5 M Tris-ClH, pH 6.8	1 ml
-Glicerol (Merck)	2.6 ml
-SDS 10%	0.8 ml
-Azul de bromofenol 0.05% (p/v)(Merck)	0.2 ml

En el caso de que se requieran condiciones reductoras se añadirá a la mezcla un 10% de  $\beta$ -mercaptoetanol.

## **TÉCNICA DE TINCIÓN DE PROTEÍNAS**

➤ **Tinción con azul de Coomasie**

-Azul de Coomasie R-250 (Merck)	0,25 g
-Metanol	125 ml
-Acido acético	25 ml
-Agua destilada	100 ml

➤ **Decoloración**

-Metanol	10 ml
-Acido acético	10 ml
-Agua destilada	80 ml

➤ **Marcadores de peso molecular**

-Preteñidos de amplio rango (6.500-205.000 Da, Bio-Rad).

**REACTIVOS DE WESTERN-BLOT**➤ **Tampón de electrotransferencia**

- Glicina (39mM)	2,93 g
- Tris (48 mM)	5,81 g
- SDS (0,0375% p/v)	0,375 g
- Metanol (20% v/v)	200 ml
- Agua destilada c.s.p.	1000 ml

➤ **Solución de bloqueo**

- Leche desnatada Sveltesse Nestlé	5 g
- PBS	100 ml

➤ **Solución de revelado**

- DAB (Sigma)	0.03 g
- PBS	10 ml

Preparar la solución en el momento de su uso y añadir 5  $\mu$ l H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en oscuridad.

**INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA**

Se prepararon diluciones seriadas por duplicado de los sueros de los animales obtenidos antes y después del tratamiento en PBS desde 1/100 hasta la dilución hasta 1/25600. A continuación, se depositaron 20  $\mu$ l de cada dilución en cada uno de los pocillos de los portas previamente antigenados. Como controles negativos se utilizaron sueros de perros sanos (valorados por un laboratorio externo) y PBS. Los sueros se incubaron en cámara

húmeda, durante 1 h a 37°C después de 3 lavados con PBS se dejaron secar los portaobjetos, se añadieron 10 µl del conjugado anti-IgG de perro marcado con isotiocianato de fluoresceína (SIGMA) diluido 1/200 en PBS, junto con azul de Evans (1/1000) y se incubó 1h 37°C en cámara húmeda. Finalmente, los portaobjetos se lavaron 3 veces con PBS. Una vez secos se procedió al montaje con líquido de montaje (Fluoprep) y se procedió a la observación en un microscopio de fluoresceína. Se consideraron positivos los sueros cuya titulación fue superior o igual a 1/100, punto de corte elegido teniendo en cuenta los valores recogidos en nuestro área endémica (Solano-Gallego *et al.*, 2009; Paltrinieri *et al.*, 2010).

### **ELECTROFORESIS DE PROTEINAS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON DODECIL SULFATO SODICO (SDS-PAGE)**

Se llevó a cabo una electroforesis vertical en placa, en una cubeta Mini-Protean Tetra de Bio-Rad y con una fuente de alimentación de Bio-Rad, manteniendo un voltaje constante de 125 V. El análisis de las muestras se realizó en geles de poliacrilamida en sistema discontinuo, empleando dos geles de concentración diferente y dos sistemas de buffer también distintos. El primer gel se llamaba gel "Stacking" o concentrador con un tamaño de poro grande, que se polimerizó por encima del gel separador "Resolving", homogéneo al 12,5 %. La composición de los geles era la siguiente:

➤ **Gel de separación o "Resolving" homogéneo 12,5 % (por gel)**

<b>Componentes</b>	<b>12,5%</b>
<b>Bis-acrilamida</b>	<b>1,662 ml</b>
<b>Resolving</b>	<b>0,500ml</b>
<b>SDS 10%</b>	<b>0,04 ml</b>
<b>Agua destilada</b>	<b>1,598 ml</b>
<b>Amonio persulfato</b>	<b>0,200 ml</b>
<b>Temed*</b>	<b>4,2 µl</b>

## ➤ Gel de concentración o "Stacking" al 4%

Componentes	4%
Bis-acrilamida	0,280 ml
Resolving	0,500ml
SDS 10%	0,02 ml
Agua destilada	1,130 ml
Amonio persulfato*	0,100 ml
Temed	2,8 $\mu$ l

\* Amonio persulfato: 0,05 g en 3 ml de agua destilada, se prepara en el momento de su uso.

El proceso se llevó a cabo en condiciones reductoras, utilizando en este último caso, el  $\beta$ -mercapto-etanol como agente reductor, que se añadió a la mezcla de la muestra proteica y el tampón de muestra, calentándose a 100° C durante 5 minutos.

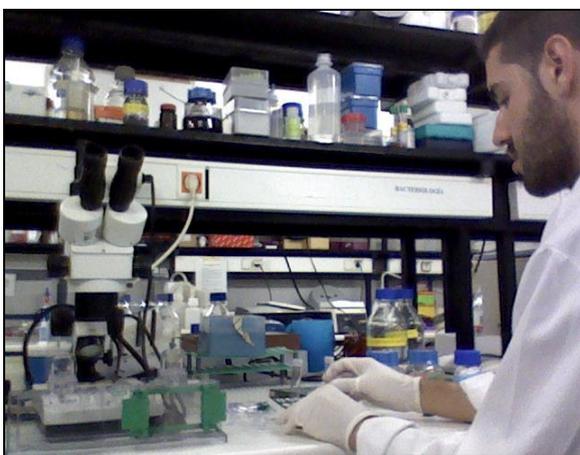


Figura 28. Electroforesis en geles SDS-PAGE

## DETECCION DE ANTIGENOS POR WESTERN-BLOT

Las muestras de antígeno (200 µg) se sometieron a electroforesis en geles SDS-PAGE al 12,5%, en condiciones reductoras. A continuación, se transfirieron electroforéticamente a papel de nitrocelulosa de 0.2 µm de poro (GE Healthcare) en sistema semiseco.

Para la transferencia se colocaron varias capas de papel Whatman, embebido en tampón de electrotransferencia sobre la plataforma de la fuente, a continuación, se dispuso la membrana de nitrocelulosa, directamente sobre ésta el gel de poliacrilamida, y ya por último varias capas de papel Whatman embebidas en el tampón anterior, eliminando cuidadosamente las posibles burbujas que se hubieran formado. La transferencia se efectuó aplicando una corriente constante de 45 mA durante toda la noche en un aparato de electrotransferencia Multiphor II 2117 (Amersham Bioscience).

Una vez finalizada ésta, las membranas fueron incubadas a 37° C durante 2 horas en solución de bloqueo (leche en polvo descremada al 5% en PBS pH 7.2). Los sueros se añadieron en la dilución correspondiente en PBS-Tween 20 y leche descremada al 1%, incubándose durante tres horas a temperatura ambiente en agitación, tras lo cual se procedió a lavar las membranas con PBS-Tween 20 (3 x 5 minutos, en agitación). Posteriormente, se añadió el conjugado marcado con peroxidasa a la dilución indicada por la casa comercial (anti-IgG, anti-IgG1, anti-IgG2, Serotec) en PBS-Tween 20 y leche descremada al 1% con el que se volvió a incubar durante tres horas, en agitación y a temperatura ambiente. Finalmente, se procedió al revelado mediante adición del sustrato. La incubación tuvo lugar en oscuridad, a temperatura ambiente y sin agitación hasta la aparición de las bandas, tras lo cual se frenó la reacción, mediante lavados en agua destilada y secado en papel de filtro, guardándose las membranas en oscuridad.

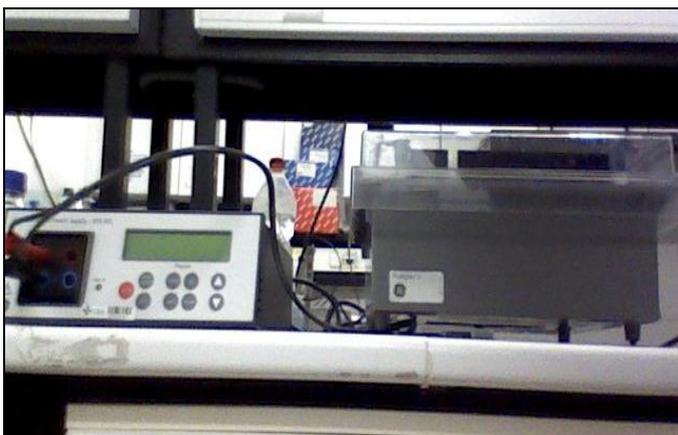


Figura 29. Equipo de electrotransferencia Multiphor II 2117.

## POBLACIÓN DE ESTUDIO

Los animales objeto de inclusión en este estudio fueron perros con edades comprendidas entre los 6 meses y los 14 años, de diversas razas y sexo, procedentes de un alberge de animales de la provincia de Valencia con leishmaniosis manifiesta, cuyos anticuerpos habían sido evaluados previamente en una clínica externa a través de la propia proectora, seleccionándose aquellos que presentabas títulos superiores a 1/400 (por tanto, difícilmente recuperables). Los animales fueron identificados con 3 dígitos y fotografiados en cada una de las visitas al centro.

Para confirmar su *status* clínico se les realizó un hemograma, bioquímica sanguínea (proteínas, GPT, urea y creatinina) y proteinograma en el Laboratorio de Analisis Clinicos APG -Animales Pequeños y Grandes (Madrid).

Finalmente, se evaluó la sintomatología en cada una de las visitas y se procedió a la toma de muestra de sangre, para la realización de los correspondientes análisis.

Los animales no recibieron ningún otro tratamiento a lo largo del estudio.

## VALORACIÓN DE LA EFICACIA FARMACOLÓGICA

El albergue que nos proporcionó los animales pidió expresamente que no se realizaran técnicas de carácter invasivo, por lo que no fue posible realizar extracciones de médula ósea, bazo o ganglio y el seguimiento se realizó utilizando los criterios empleados habitualmente en la práctica clínica veterinaria, es decir se hizo un seguimiento de la evolución de la sintomatología clínica y de la serología a lo largo del tratamiento.

### Exploración clínica

Los exámenes clínicos se realizaron en cada una de las visitas, y consistieron en una exploración de los ganglios palpables (poplíteos, preescapulares y submaxilares), estado general (mucosas, temperatura, pulso), palpación de hígado y bazo, exploración de la piel, articulaciones, ojos, clasificando los signos de 0 a 3 según la gravedad e importancia. La suma de todos los síntomas nos permitía obtener un valor clínico máximo de 80 puntos, que servirían posteriormente para cuantificar la evolución clínica de cada perro (Mateo *et al.*, 2009) (ANEXO I).

### Serología

Para la evaluación de los anticuerpos específicos frente a *Leishmania infantum* se emplearon la inmunofluorescencia indirecta IFI (titulación de los sueros) y el western-blot (identificación de proteínas marcadoras de evolución de la enfermedad).

## FORMULACIÓN DE ANFOTERICINA B

La formulación se preparó según está descrito en el capítulo I. El proceso de preparación en el estado poliagregado fue realizado por el Departamento de Farmacia Galénica y Tecnología Farmacéutica de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid, siguiéndose un riguroso proceso de puesta a punto, validación y caracterización.

**Dosis y vías de administración**

Los animales se distribuyeron en 2 grupos a los que se les administró

Grupo 1) Dosis de 4mg/Kg de peso

Grupo 2) Dosis de 5 mg/Kg de peso

En ambos casos se aplicó en pauta triple cada 15 días.

El fármaco fue preparado individualmente para cada uno de los animales teniendo en cuenta su peso. El tratamiento fue administrado por nosotros, por vía endovenosa en perfusión diluyendo el compuesto en un volumen 1:1 en suero glucosado y a continuación en 50 ml de solución salina estéril.

La elección de la dosis y la formulación se realizó en base a estudios previos realizados por nuestro grupo en hámster y perros, según esta descrito en el capítulo I (Dea-Ayuela *et al.*, 2004; Sánchez-Brunete *et al.*, 2004a; Sánchez-Brunete *et al.*, 2004b; Sánchez-Brunete *et al.*, 2005).

**Evaluación de los resultados**

Para evaluar la eficacia se compararon los datos clínicos y la serología en el día 0 y 90 post-tratamiento.

**Estudio estadístico**

El análisis estadístico se realizó mediante una ANOVA con el paquete estadístico StatAdvisor.

**ANEXO I**

**FORMULARIO CLÍNICO**

Fecha:

Nombre:

Sexo: macho hembra

Raza:

Edad:

T<sup>a</sup> °C      Peso

Condición y órganos afectados	Problemas	Puntuación (marcar con un círculo)				
		0	1	2	3	
Condición General	Apetito	0	1	2	3	
	Depresión	0	1	2	3	
	Cansancio	0	1	2	3	
	Polidipsia	0	1	2	3	
Estado de carnes	Atrofia de músculos temporales	0	1	2	3	
	Atrofia muscular general	0	1	2	3	
Sistema mononuclear fagocitario	Adenopatías	0	1	2	3	
	Esplenomegalia	0	2	0	2	
Ojos	Conjuntivitis y/o blefaritis	0	1	2	3	
	Queratitis y/o uveítis	0	1	2	3	
Mucosas	Coloración (palidez)	0	1	2	3	
	Lesiones nasales (epistaxis)	0	1	2	3	
	Lesiones orales (incluida la lengua) (úlceras y nódulos)	0	1	2	3	
	Lesiones gástricas (vómitos)	0	1	2	3	
	Lesiones intestinales (diarrea)	0	1	2	3	
Articulaciones	Artritis	0	1	2	3	
Piel	Prurito	0	1	2	3	
	Eritema	0	1	2	3	
	Úlceras	0	1	2	3	
	Nódulos	0	1	2	3	
	Alopecia	0	1	2	3	
	Despigmentación y/o hiperpigmentación	0	1	2	3	
	Alteraciones Querato-seborreicas	Seborrea grasa	0	1	2	3
		Descamación	0	1	2	3
		Hiperqueratosis nasal y/o plantar	0	1	2	3
		Hiperqueratosis generalizada	0	1	2	3
Onicogriposis	0	1	2	3		
<b>PUNTUACIÓN TOTAL</b>		/80	/80	/80	/80	

Categorización de los síntomas 0 = ninguno ; 1 = bajo ; 2 = moderado ; 3 = grave

## RESULTADOS

### SELECCIÓN DE LOS ANIMALES

En el ensayo se incluyeron 23 perros, de los cuales, 1 por su agresividad fue eliminado del estudio. El resto se dividió en dos grupos, en el Grupo 1, en el que se incluyeron 13 animales que recibieron la dosis de 4 mg/Kg en pauta triple y el Grupo 2 donde se incluyó el resto, que recibió 5 mg/Kg.

En el grupo 1 se tuvo que sacrificar a 2 animales antes de acabar el estudio porque se encontraban en un estado de la enfermedad muy avanzado.

Todos ellos fueron diagnosticados previamente de leishmaniosis por un laboratorio externo mediante IFI, que consideraba valores positivos para leishmania, títulos por encima de 1/80. Siguiendo las normas de la Protectora todos ellos iban a ser sacrificados independientemente de su estado clínico ya que superaban valores de IFI de 1/400 (salvo 1 de los animales). Se les realizó un análisis de sangre para determinar.

En la tabla 11 se indica la fase clínica en la que se encontraban los animales al inicio del estudio siguiendo la Guía LeishVet para el manejo clínico de la LCan (Solano-Gallego *et al.*, 2011).

Los animales se fueron asignando a uno u otro grupo según su llegada a la Protectora. En cuanto a la distribución de animales en relación al sexo, raza o actividad, los resultados se muestran en la tabla 12. El 61,9% eran hembras, el 85% eran perros mestizos y también el 85% eran perros de compañía.

Tabla 11. Asignación del estadio clínico de los animales antes del tratamiento, según la Guía LeishVet, en la que se tiene en cuenta los signos clínicos, serología y los hallazgos de laboratorio (Solano-Gallego *et al.*, 2011)

Perro	Serología	Signos clínicos	Hallazgos laboratorios	Estadio clínico
001	1/800	Alopecia, descamación, hiperqueratosis nasal y/o plantar, onicogriposis	Leucocitosis, trombopenia, microcitosis, hipoalbuminemia con un cociente A/G alterado, hiperglobulinemia	II
002	1/3200	Depresión, cansancio, atrofia temporal, atrofia muscular general, adenopatías, prurito, descamación, eritema, nódulos, alopecia, despigmentación, seborrea grasa, hiperqueratosis, onicogriposis	Anemia microcítica hipocroma, leucocitosis, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II
003	1/1600	Atrofia de músculos temporales y en general, adenopatías, conjuntivitis, queratitis, epistaxis, prurito, eritema, úlceras, alopecia, despigmentación, seborrea grasa, descamación, hiperqueratosis, onicogriposis	Microcitosis con leucocitosis, neutrofilia con desviación izquierda, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II
004	1/1600	Depresión, cansancio, atrofia muscular general, adenopatías, artritis, prurito, eritema, úlceras, alopecia, despigmentación, seborrea grasa, descamación, hiperqueratosis, onicogriposis	Microcitosis, leucocitosis, trombocitopenia, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II
005	1/400	Depresión, cansancio, atrofia muscular, adenopatías, esplenomegalia, conjuntivitis, prurito, eritema, úlceras, despigmentación, seborrea grasa, descamación, hiperqueratosis, onicogriposis	Anemia microcítica hipocroma con leucocitosis con desviación izquierda, trombopenia, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II
006	1/800	Atrofia temporal, adenopatías, esplenomegalia, queratitis, eritema, alopecia, despigmentación, seborrea grasa, hiperqueratosis	Microcitosis, leucocitosis, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II
007	1/800	Depresión, cansancio, atrofia muscular, adenopatías, esplenomegalia, conjuntivitis, queratitis, lesiones nasales, prurito, eritema, úlceras, alopecia, despigmentación, seborrea grasa, descamación, hiperqueratosis, onicogriposis	Anemia microcítica hipocroma, leucocitosis, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II
009	1/400	Atrofia muscular, adenopatías, nódulos, alopecia, descamación, hiperqueratosis	Anemia microcítica hipocroma con leucocitosis, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II

010	1/400	Atrofia temporal, adenopatías, úlceras, nódulos, alopecia, descamación, hiperqueratosis.	Anemia microcítica hipocroma con leucocitosis, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II
011	1/400	Atrofia muscular, adenopatías, descamación, onicogriposis.	Anemia microcítica hipocroma con leucocitosis, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia.	II
012	1/400	Atrofia muscular, esplenomegalia, úlceras, onicogriposis	Microcitosis, hipocromatosis, leucocitosis, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia.	II
013	1/1600	Atrofia muscular, adenopatías, artritis, eritema, úlceras, alopecia, descamación, hiperqueratosis, onicogriposis.	Microcitosis con hipocromatosis, leucocitosis y trombocitosis. Hipoalbuminemia con hiperglobulinemia.	II
014	1/1600	Depresión, cansancio, polidipsia, atrofia muscular, adenopatías, conjuntivitis, prurito, eritema, úlceras, nódulos, alopecia, despigmentación, seborrea grasa, hiperqueratosis, onicogriposis	Anemia microcítica hipocroma con leucocitosis, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II
015	1/1600	Depresión, cansancio, polidipsia, atrofia muscular, adenopatías, conjuntivitis, prurito, eritema, úlceras, nódulos, alopecia, despigmentación, seborrea grasa, hiperqueratosis, onicogriposis.	Anemia microcítica hipocroma con leucocitosis, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II
016	1/1600	Depresión, cansancio, atrofia muscular, adenopatías, conjuntivitis, queratitis, alopecia, seborrea grasa, descamación, onicogriposis.	Anemia microcítica hipocroma con leucocitosis, trombopenia, hipoalbuminemia con hiperglobulinemia. Creatinina 2.04 mg/dl	IV
018	1/1600	Atrofia muscular, adenopatías, alopecia, despigmentación.	Microcitosis hipocroma, leucocitosis. Hipoalbuminemia con hiperglobulinemia.	II
019	1/1600	Atrofia muscular, adenopatías, onicogriposis.	Microcitosis hipocroma con leucocitosis y trombopenia. Hipoalbuminemia con hiperglobulinemia. Creatinina 1,45 mg/dl	III
020	1/200	Depresión	Microcitosis hipocroma, leucocitosis, trombopenia. Hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	I

021	1/800	Atrofia muscular, adenopatías, hiperqueratosis.	Microcitosis hipocroma, trombopenia. Hipoalbuminemia con hiperglobulinemia	II
022	1/800	Adenopatías.	Mirocitosis hipocroma, leucocitosis, trombopenia. Hipoalbuminemia con hiperglobulinemia.	II
023	1/400	Cansancio, adenopatías, onicogriposis.	Microcitosis hipocroma, trombopenia. Hipoalbuminemia con hiperglobulinemia.	I

Tabla 12. Distribución de los animales incluidos en el estudio

		D 4mg	D 5mg	Total
		N (%)	N (%)	N (%)
<b>Sexo</b>	<b>Hembra</b>	<b>8 (66.66)</b>	<b>5 (55.55)</b>	<b>13 (61.90)</b>
	<b>Macho</b>	<b>4 (33.33)</b>	<b>4 (44.44)</b>	<b>8 (38.10)</b>
<b>Raza</b>	<b>Pura</b>	<b>0 (0)</b>	<b>3 (33.33)</b>	<b>3 (14.29)</b>
	<b>Mestizos</b>	<b>12 (100)</b>	<b>6 (66.66)</b>	<b>18 (85.71)</b>
<b>Actividad</b>	<b>Compañía</b>	<b>9 (75)</b>	<b>9 (100)</b>	<b>18 (85.71)</b>
	<b>Caza</b>	<b>3 (25)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>3 (14.29)</b>
	<b>Otras</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0 (0)</b>	<b>0</b>

### ESTADO CLÍNICO DE LOS PERROS ANTES DEL TRATAMIENTO

La sintomatología que presentaban los perros antes del tratamiento se recoge en las tablas 13 y 14.

Tabla 13. Sintomatología antes del tratamiento

Síntomas Pretratamiento		D 4mg (N =12)	D 5mg (N= 9)
Apetito	Normal	8 (67%)	8 (89%)
	Disminuido	3 (25%)	0 (0%)
	Anorexia	1 (8%)	1 (11%)
Estado general	Normal	11 (92%)	8 (89%)
	Apatía	1 (8%)	0 (0%)
	Postración	0 (0%)	1 (11%)
Adelgazamiento Atrofia muscular	Ausencia	8 (67%)	8 (89%)
	Presencia	4 (33%)	1 (11%)
Linfadenomegalía	Ausencia	1 (8%)	1 (11%)
	1 ó 2 ganglios	4 (33%)	3 (33%)
	>2 ganglios	7 (58%)	5 (56%)
Lesiones oculares	Ausencia	8 (67%)	6 (67%)
	Moderadas	4 (33%)	2 (22%)
	Graves	0 (0%)	1 (11%)
Mucosas	Normal	11 (92%)	8 (89%)
	Anormal	1 (8%)	1 (11%)

Tabla14. Sintomatología antes del tratamiento

<b>Síntomas Pretratamiento</b>		<b>D 4mg (N =12)</b>	<b>D 5mg (N= 9)</b>
Epistaxis	Ausencia	12 (100%)	9 (100%)
	Presencia	0 (0%)	0 (0%)
Alteraciones Digestivas	Ausencia	12 (100%)	9 (100%)
	Moderada	0 (0%)	0 (0%)
Poliuria/ Polidipsia	Ausencia	12 (100%)	9 (100%)
	Presencia	0 (0%)	0 (0%)
Forma queratoseborreica	Ausencia	4 (33%)	2 (22%)
	Presencia	8 (67%)	7 (78%)
Forma Ulcerativa	Ausencia	7 (58%)	7 (78%)
	Presencia	5 (42%)	2 (22%)
Forma nodular	Ausencia	9 (75%)	8 (89%)
	Presencia	3 (25%)	1 (11%)

**-Apetito**

El apetito fue normal en un 67% del grupo 1 y en un 89% en el grupo 2. En el grupo 1 se observó un 25% de animales con disminución del apetito.

**-Estado general**

En ambos casos el estado general era normal en ambos grupos (92% y 89%, respectivamente).

**-Adelgazamiento y/o atrofia muscular**

El 33% del grupo 1 y el 11% del grupo 2 mostraron adelgazamiento y/o atrofia muscular

**-Adenopatias**

Se observó linfadenomegalía en la mayoría de los animales del ensayo. El 56 (grupo 1)-58% (grupo 2) de los animales mostró linfadenomegalía generalizada, considerando como tal, aquellos casos en que presentaban dos o más ganglios afectados.

**- Lesiones oculares**

El 33% de los animales presentaron alguna patología ocular moderada o grave (conjuntivitis, uveítis, queratitis, blefaritis).

**-Mucosas**

El estado de las mucosas fue normal en la mayor parte de los animales.

**-Epistaxis**

Ningún animal demostró este síntoma.

**- Alteraciones digestivas**

Ningún animal demostró esta alteración.

**-Poliuria/polidipsia**

Ningún animal demostró este síntoma.

**-Lesiones cutáneas**

El 67% (grupo 1) y 78% (grupo 2) presentaban una forma queratoseborreica. El 42% (grupo 1) y el 22% (grupo 2) presentaban formas ulcerativas especialmente en las patas y puntos de presión. Un pequeño porcentaje presentaban formas nodulares.

### ESTADO CLÍNICO DE LOS PERROS DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

La sintomatología que presentaban los perros después del tratamiento se recoge en las tablas 15 y 16.

Tabla 15. Sintomatología después del tratamiento

<b>Síntomas Postratamiento</b>		<b>D 4mg (N =12)</b>	<b>D 5mg (N= 9)</b>
Apetito	Normal	12 (100%)	9 (100%)
	Disminuido	0 (0%)	0 (0%)
	Anorexia	0 (0%)	0 (0%)
Estado general	Normal	10(83%)	8(89%)
	Apatía	2(17%)	1(1%)
	Postración	0(0%)	0(0%)
Adelgazamiento Atrofia muscular	Ausencia	11(83%)	8 (89%)
	Presencia	4 (17%)	1 (11%)
Linfadenomegalia	Ausencia	4 (33%)	2 (22%)
	1 ó 2 ganglios	7 (58%)	6 (67%)
	>2 ganglios	1 (8%)	1 (11%)
Lesiones oculares	Ausencia	9 (75%)	8 (78%)
	Moderadas	3 (25%)	1 (11%)
	Graves	0 (0%)	1 (11%)
Mucosas	Normal	12 (100%)	9 (100%)
	Anormal	0 (0%)	0 (0%)

Tabla 16. Sintomatología después del tratamiento

<b>Síntomas Postratamiento</b>		<b>D 4mg (N =12)</b>	<b>D 5mg (N= 9)</b>
Epistaxis	Ausencia	12 (100%)	9 (100%)
	Presencia	0 (0%)	0 (0%)
Alteraciones Digestivas	Ausencia	12 (100%)	9 (100%)
	Moderada	0 (0%)	0 (0%)
Poliuria/ Polidipsia	Ausencia	12 (100%)	9 (100%)
	Presencia	0 (0%)	0 (0%)
Forma Queratoseborreica	Ausencia	9 (75%)	6 (67%)
	Presencia	3 (25%)	3 (33%)
Forma Ulcerativa	Ausencia	11 (92%)	8 (89%)
	Presencia	1 (8%)	1 (11%)
Forma Nodular	Ausencia	11 (92%)	8 (89%)
	Presencia	1 (8%)	1 (11%)

**-Apetito**

El apetito pasó a ser normal en el 100% de los animales en ambos grupos

**-Adelgazamiento y/o atrofia muscular**

El 17% del grupo 1 y el 11% del grupo 2 mostraron este síntoma

**-Adenopatias**

Tan solo el 8% (grupo 1) y 11% (grupo 2), mostraron linfadenomegalía generalizada.

**- Lesiones oculares**

Solamente 1 animal (grupo 2) presentó una patología ocular grave.

**-Mucosas**

El estado de las mucosas siguió normal en todos los animales.

**-Epistaxis**

Ningún animal demostró este síntoma.

**- Alteraciones digestivas**

Ningún animal demostró esta alteración.

**-Poliuria/polidipsia**

Ningún animal demostró este síntoma.

**-Lesiones cutáneas**

El 25% (grupo 1) y 33% (grupo 2) seguían manteniendo una forma queratoseborreica.

Las úlceras remitieron parcialmente y solo el 8% (grupo 1) y el 11% (grupo 2) presentaban este tipo de lesiones.

## COMPARACIÓN DEL ESTADO CLÍNICO ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

No hubo diferencias entre las dosis en cuanto a la mejoría del **apetito**. En ambas se recuperó totalmente.

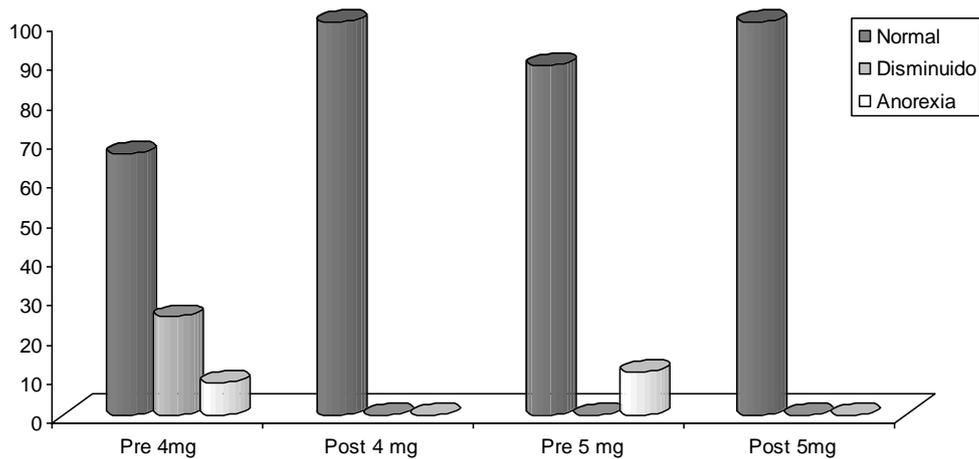


Fig 30. Comparación del **apetito** antes y después del tratamiento a las diferentes dosis.

En cuanto al **estado general**, con la dosis de 5 mg aquellos animales que estaban en estado de postración se recuperaron total o parcialmente.

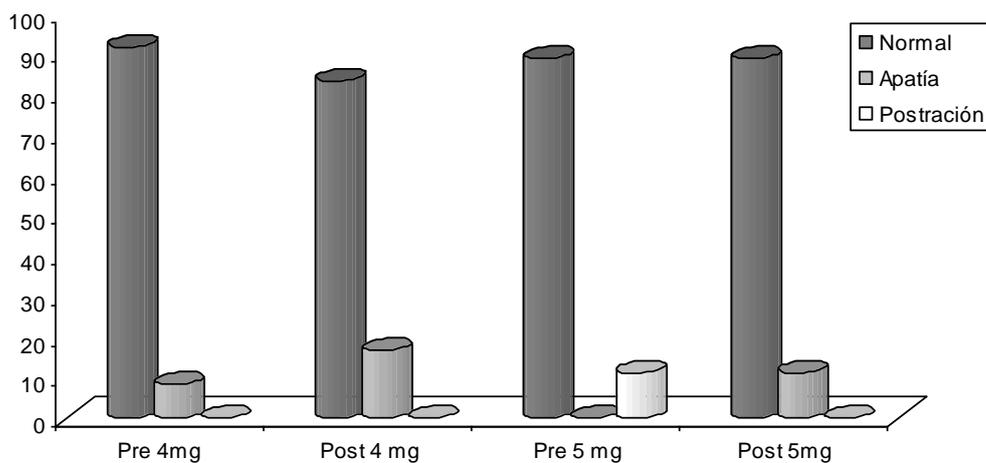


Fig 31. Comparación del **estado general** antes y después del tratamiento a las diferentes dosis.

Con la dosis de 5mg no hubo diferencias antes y después del tratamiento, sin embargo, en el caso de la dosis de 4 mg, hubo una recuperación del 16%

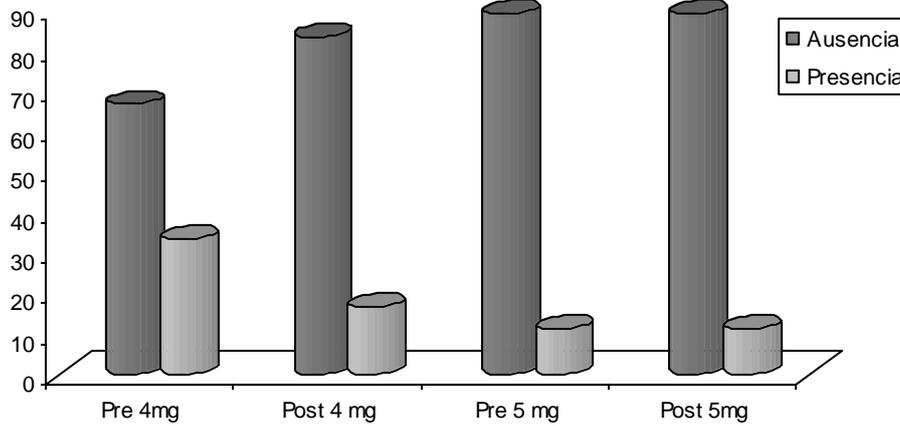


Fig 32. Comparación del **adelgazamiento/atrofia muscular** antes y después del tratamiento a las diferentes dosis.

Las **adenopatías** fueron los síntomas más frecuentes en todos los animales. Tal como se puede apreciar en la gráfica, en el caso de la dosis de 4 mg, al inicio del estudio un 58% de los animales mostraba linfadenomegalia generalizada y tras el tratamiento solo un 8% lo presentaba es decir se había reducido en un 86%. En el caso de la dosis de 5mg los resultados fueron similares, con una reducción del 80,3%.

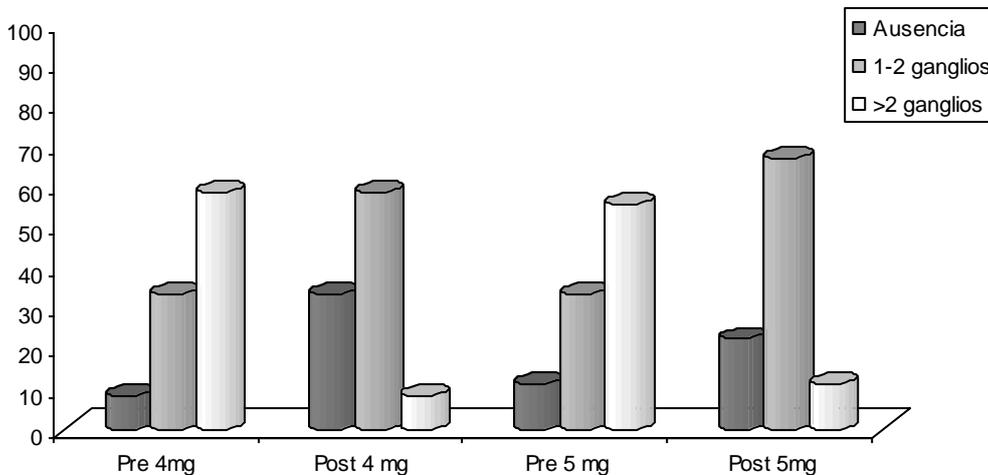


Fig 33. Comparación de las **adenopatías** antes y después del tratamiento a las diferentes dosis.

En cuanto a las **lesiones oculares** se producen por acumulo de inmunocomplejos y son difíciles de recuperar, por eso solo se observa cierta recuperación en los casos en los que inicialmente las lesiones eran moderadas, tanto en la dosis de 4 como de 5 mg.

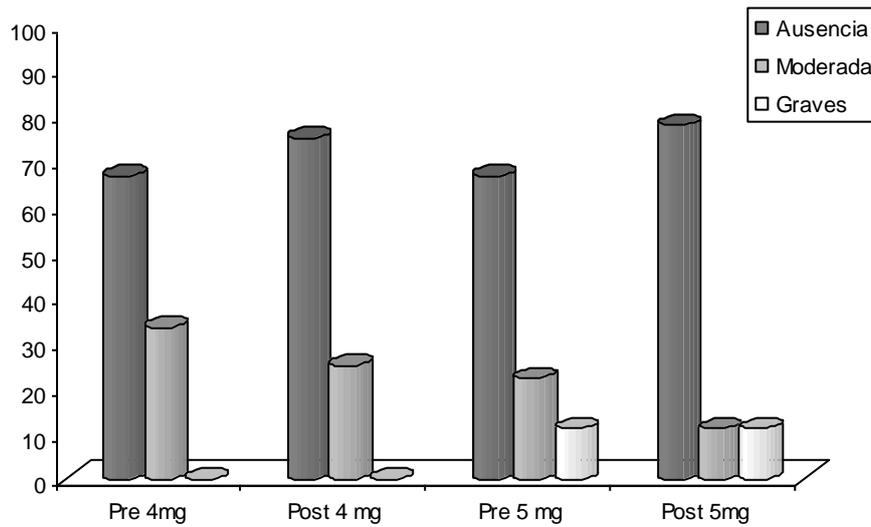


Fig 34. Comparación de las **lesiones oculares** antes y después del tratamiento a las diferentes dosis.

En el caso de las **alteraciones de mucosas** en ambos tratamientos se recuperaron el 100% de los animales.

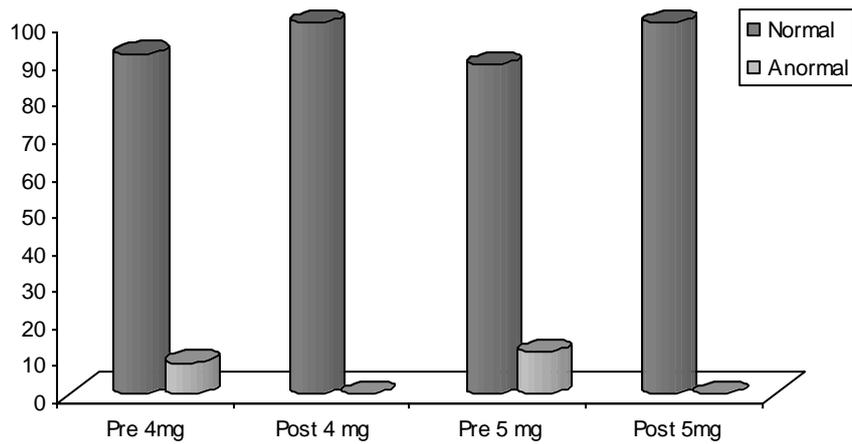


Fig 35. Comparación de las **alteraciones de mucosas** antes y después del tratamiento a las diferentes dosis.

Las lesiones cutáneas son las que más rápida y favorablemente han evolucionado, así en el caso de las **formas queratoseborreicas** se redujeron un 62,6% en el caso de la dosis de 4 mg, y un 57,7% en la dosis de 5 mg.

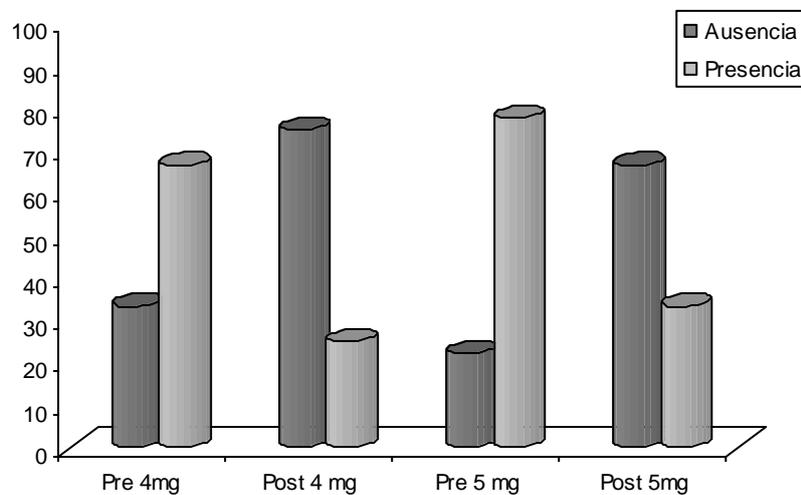


Fig 36. Comparación de las **lesiones cutáneas (forma queratoseborreica)** antes y después del tratamiento a las diferentes dosis.

Las formas ulcerativas, se redujeron un 80,9% con la dosis de 4 mg y un 50% con la dosis de 5 mg. Esta diferencia entre dosis se debe a que en el grupo 1 había más animales que mostraban lesiones ulcerativas.

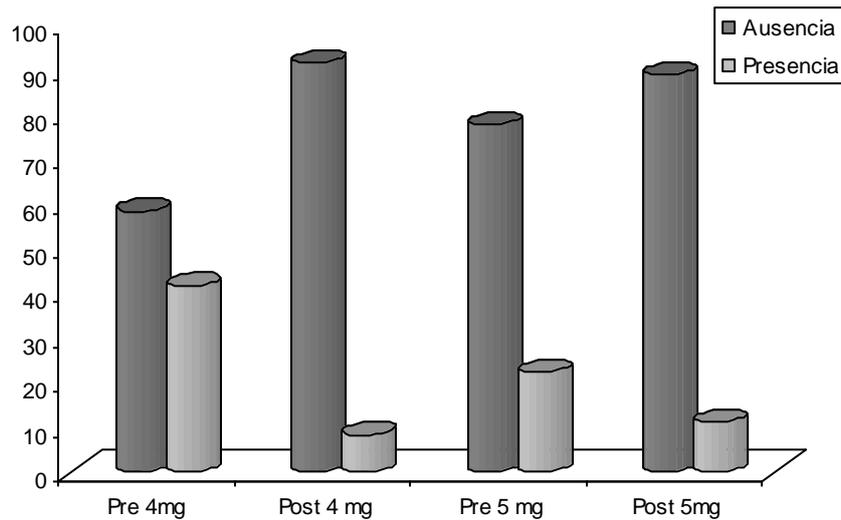


Fig 37. Comparación de las **lesiones cutáneas (forma ulcerativa)** antes y después del tratamiento a las diferentes dosis.

Las **formas nodulares** fueron poco frecuentes, sin embargo, con la dosis de 4 mg se redujeron un 68%, y no mejoró ningún animal con la dosis de 5 mg.

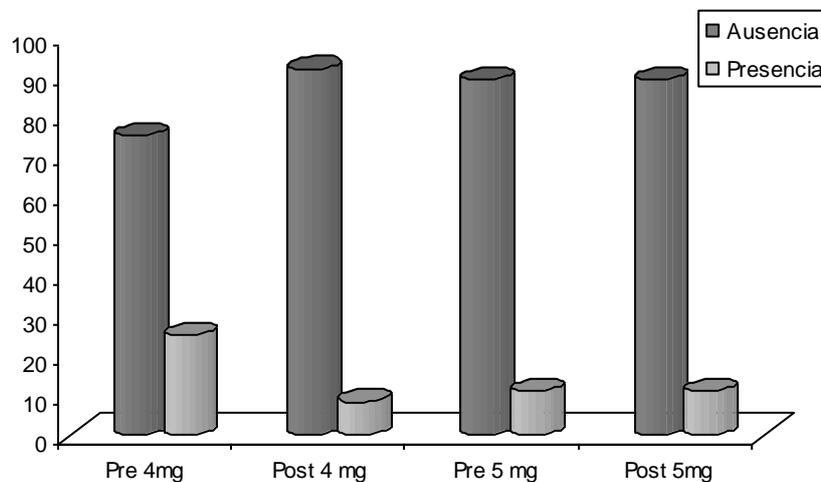


Fig 38. Comparación de las **lesiones cutáneas (forma nodular)** antes y después del tratamiento a las diferentes dosis.

Finalmente, ningún animal había mostrado epistaxis, alteraciones digestivas ni poliuria/polidipsia al inicio del tratamiento

**VALORACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO SEGÚN LA DOSIS: ESTADO CLÍNICO**

Si bien la presencia de un solo síntoma de los indicados anteriormente tiene valor diagnóstico en la leishmaniosis canina, para la valoración de la dosis eficaz se debe tener en cuenta el conjunto de todos los síntomas (Mateo *et al.*, 2009). Tal y como se indicó en el anexo I, a cada síntoma se le asignó un valor numérico en función de la gravedad del mismo, de forma que el “score” total puede ir de 0 a 80 puntos.

En las siguientes gráficas, cada punto representa el “score” clínico de cada animal, antes y después del tratamiento, para las dos dosis estudiadas. El análisis estadístico se realizó mediante una ANOVA con el programa estadístico StatAdvisor.

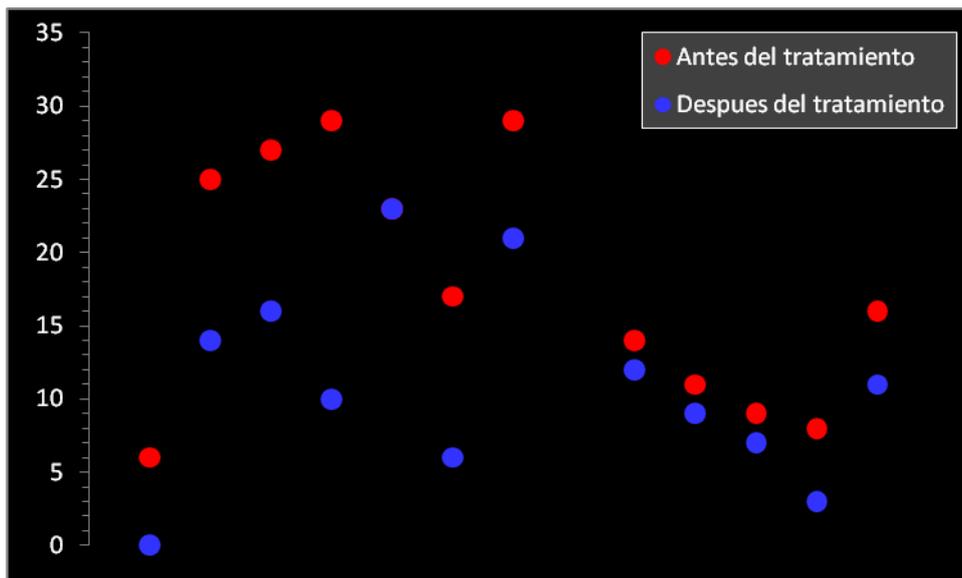


Fig 39. “Score” clínico antes y después del tratamiento a la dosis de 4mg

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	272,222	1	272,222	4,44	0,0512*
Intra grupos	980,889	16	61,3056		
Total (Corr.)	1253,11	17			

\*Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual a 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables con un nivel del 95,0% de confianza.

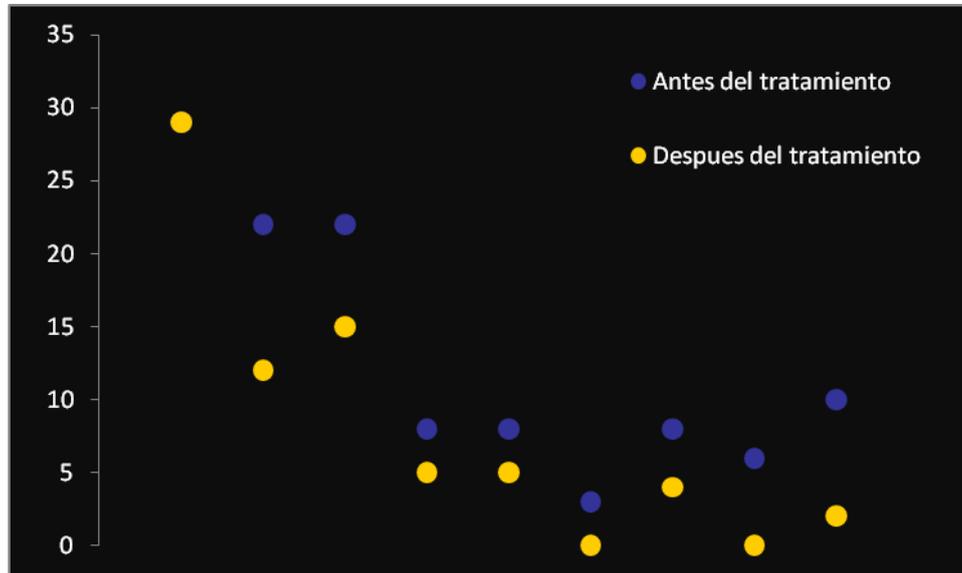


Fig 40. "Score" clínico antes y después del tratamiento a la dosis de 5mg

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	107,556	1	107,556	1,27	0,2764*
Intra grupos	1354,89	16	84,6806		
Total (Corr.)	1462,44	17			

\* Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual a 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables con un nivel del 95,0% de confianza.

## RESULTADOS DE LA SEROLOGÍA ANTES DEL TRATAMIENTO POR LA TÉCNICA IFI

El IFI es considerada como la técnica "gold standard" en la leishmaniosis ya que proporciona información fiable sobre la evolución de la enfermedad.

Los perros que se incluyeron en el estudio, presentaban antes de la administración del tratamiento títulos superiores a 1/400 (con excepción de 1 animal) mediante IFI realizado en un laboratorio de análisis veterinario externo. Debido a que el laboratorio

no precisaba el título, se realizó en nuestro laboratorio una nueva titulación. Los resultados se muestran en la siguiente tabla.

Tabla 17. Titulación de anticuerpos anti-*L.infantum* de los perros de los grupos 1 y 2 antes del tratamiento.

IFI Pretratamiento	D4mg		D5mg	
	n	(%)	n	(%)
< 1/100	0	(0.0)	0	(0.0)
1/100	0	(0.0)	0	(0.0)
1/200	0	(0.0)	2	(28.57)
1/400	5	(41.66)	0	(0.0)
1/800	3	(25)	2	(28.57)
1/1600	3	(25)	3	(42.85)
1/3200	1	(8.33)	0	(0.0)

En el grupo 2, aparecen 2 animales con título 1/200. El título del laboratorio externo en 1 de ellos fue 1/400, sin embargo, en nuestro caso, al repetirlo se consideró que mostraba un título 1/200, ya que el título 1/400 era dudoso.

La mayoría de los animales del grupo 1 mostraba títulos de 1/400 (41,66%), mientras que en el grupo 2, era de 1/1600 (42,85%).

## RESULTADOS DE LA SEROLOGÍA DESPUÉS DEL TRATAMIENTO POR LA TÉCNICA IFI

Los resultados de la tabla 9 muestran que hubo una disminución de los títulos tanto en el grupo 1 como 2. Dos animales (uno de cada grupo) pasaron a tener un título inferior a 1/100. Cuatro animales (dos por grupo) mostraban un título de 1/100.

Cabe destacar que en el grupo 2, ningún animal presentó títulos de 1/1600 (que suponía el 42,85% de los animales al inicio del estudio) y en el grupo 1, un solo animal pasó a tener este título. Finalmente, el único animal que había mostrado los títulos más altos (1/3200) en el grupo 1, redujo el título a 1/800.

Tabla 18. Titulación de anticuerpos anti-*L.infantum* de los perros de los grupos 1 y 2 después del tratamiento.

IFI Postratamiento	D4mg		D5mg	
	N	(%)	n	(%)
< 1/100	1	(8.33)	1	(14.28)
1/100	2	(16.66)	2	(28.57)
1/200	2	(16.66)	1	(14.28)
1/400	4	(33.33)	2	(28.57)
1/800	2	(16.66)	1	(14.28)
1/1600	1	(8.33)	0	(0.0)
1/3200	0	(0.0)	0	(0.0)

## VALORACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO SEGÚN LA DOSIS: SEROLOGÍA MEDIANTE IFI

El análisis estadístico se realizó mediante una ANOVA con el programa estadístico StatAdvisor.

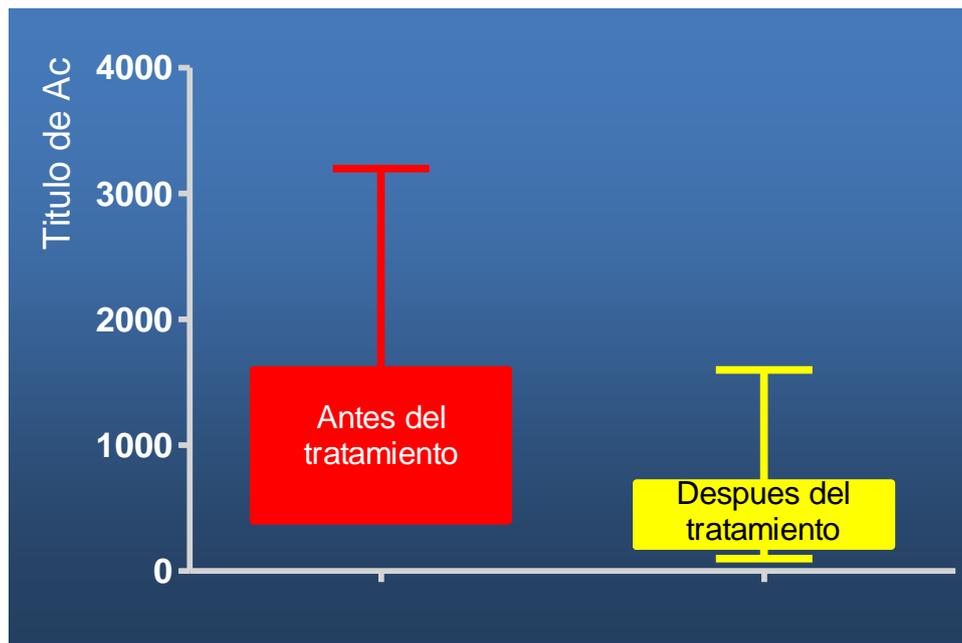


Fig 41. Título de anticuerpos antes y después del tratamiento a la dosis de 4mg

**Tabla ANOVA**

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	1,815E6	1	1,815E6	4,09	0,0555*
Intra grupos	9,76333E6	22	443788,		
Total (Corr.)	1,15783E7	23			

\*Puesto que el valor-P de la razón-F es mayor o igual que 0,05, no existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables con un nivel del 95,0% de confianza.

A pesar de la disminución evidente de los títulos de anticuerpos, al realizar el test estadístico, no encontramos diferencias significativas antes y después del tratamiento con la dosis de 4 mg.

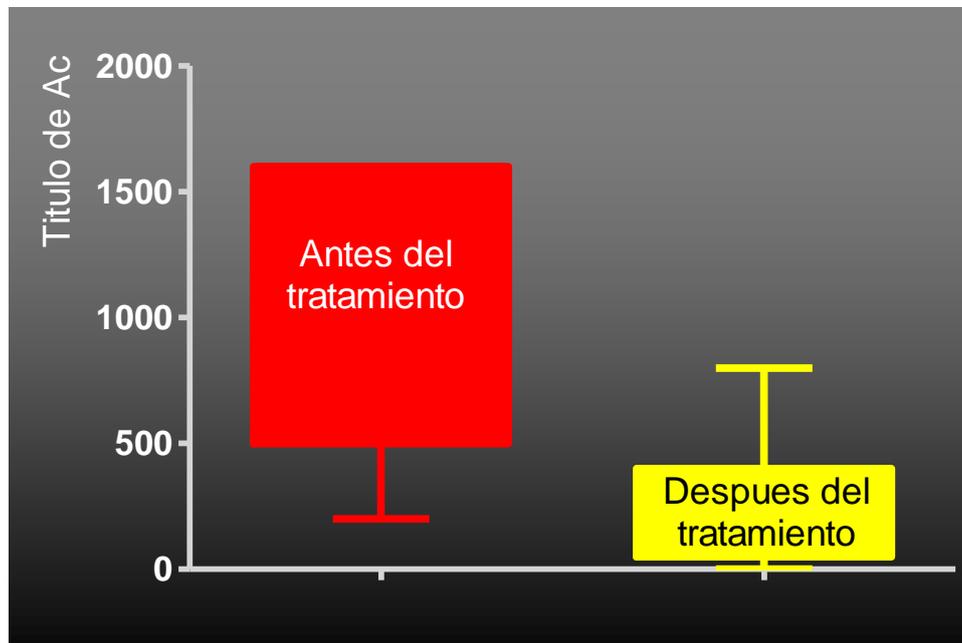


Fig 42. Título de anticuerpos antes y después del tratamiento a la dosis de 5mg

Tabla ANOVA

Fuente	Suma de Cuadrados	Gl	Cuadrado Medio	Razón-F	Valor-P
Entre grupos	2,59049E6	1	2,59049E6	10,52	0,0059*
Intra grupos	3,44889E6	14	246349,		
Total (Corr.)	6,03938E6	15			

\*Puesto que el valor-P de la prueba-F es menor que 0,05, si existe una diferencia estadísticamente significativa entre las medias de las 2 variables con un nivel del 95,0% de confianza.

Por tanto parece que la dosis de 5 mg es más eficaz que la dosis de 4 mg.

## **VALORACIÓN DE LA EFICACIA DEL TRATAMIENTO SEGÚN LA DOSIS: SEROLOGÍA MEDIANTE WESTERN-BLOT**

Aunque no existe un acuerdo entre los diferentes autores en cuanto al valor pronóstico de un antígeno en concreto en cuanto a la evolución de la leishmaniosis tras el tratamiento farmacológico, la mayoría considera que las diferencias más significativas se pueden observar entre las proteínas de bajo peso molecular.

En nuestro estudio y debido a la gran variabilidad existente entre las cepas de *L.infantum* decidimos realizar los western-blot empleando el extracto antigénico de dos cepas de referencia (BCN83 y BCN150), que muestran diferente grado de virulencia en animales de experimentación, aunque pertenecen al mismo zimodema (MON-1) y que originalmente habían sido aisladas de perros de la Península Ibérica.

Además, de evaluar la respuesta por IgG, se analizaron las respuestas por IgG1 e IgG2, ya que parece que la presencia de uno u otro isotipo puede tener valor pronóstico de la evolución de la enfermedad.

### Pretratamiento

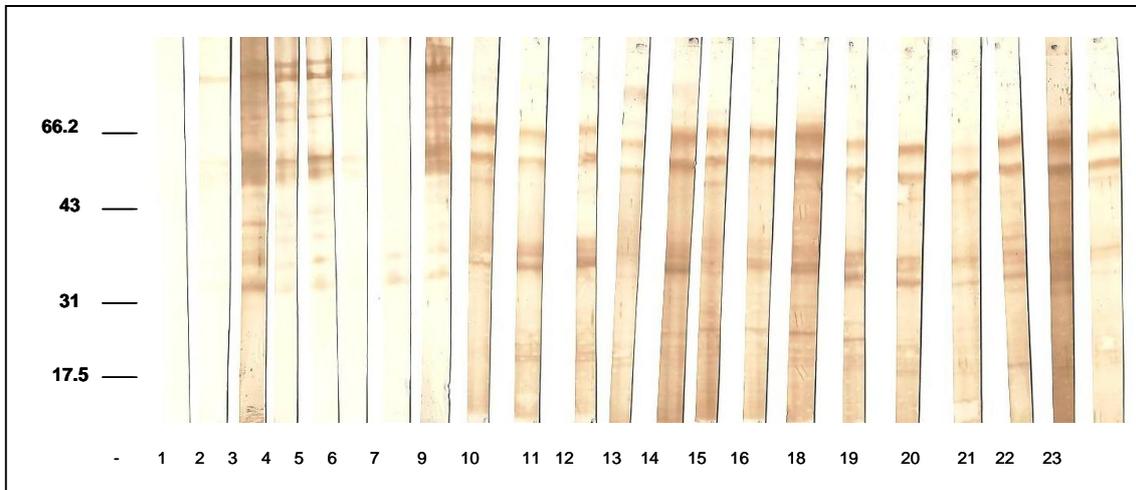


Fig 43. Reconocimiento antigénico por IgG empleando antígeno BCN83 de los sueros a día 0 pretratamiento

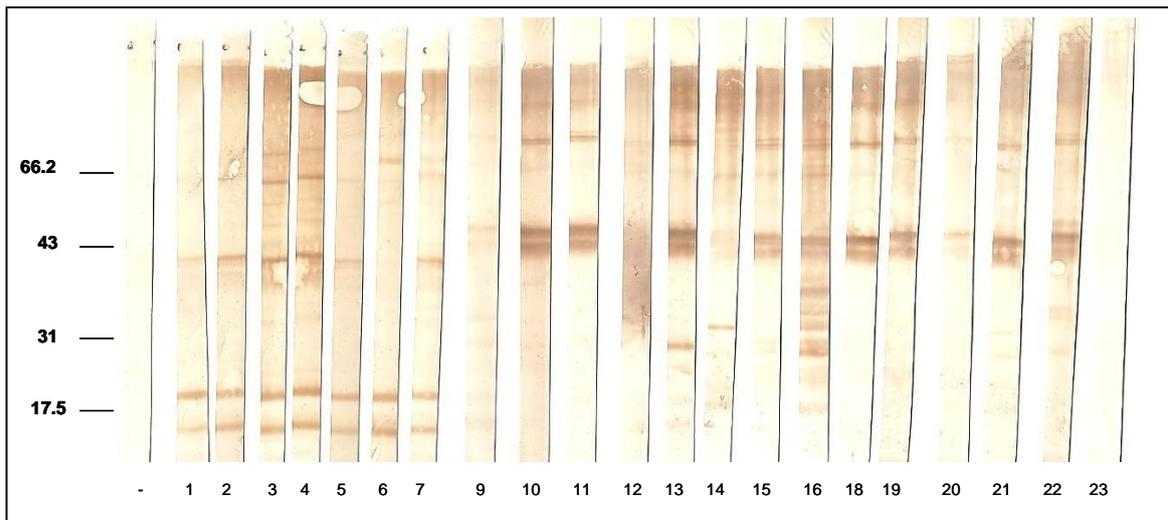


Fig 44. Reconocimiento antigénico por IgG1 empleando antígeno BCN83 de los sueros a día 0 pretratamiento.

El perfil de reconocimiento antigénico observado antes del tratamiento frente a Ag de BCN83 para las IgG, fue muy similar entre todos los animales (figura 43), observándose un patrón muy complejo, donde la mayoría de los antígenos se encontraban entre 20 y 70 kDa. Sin embargo, hubo más variaciones en el caso del reconocimiento por IgG1, manteniéndose en todos los animales el reconocimiento de las proteínas entre 40 y 45 kDa (figura 44).

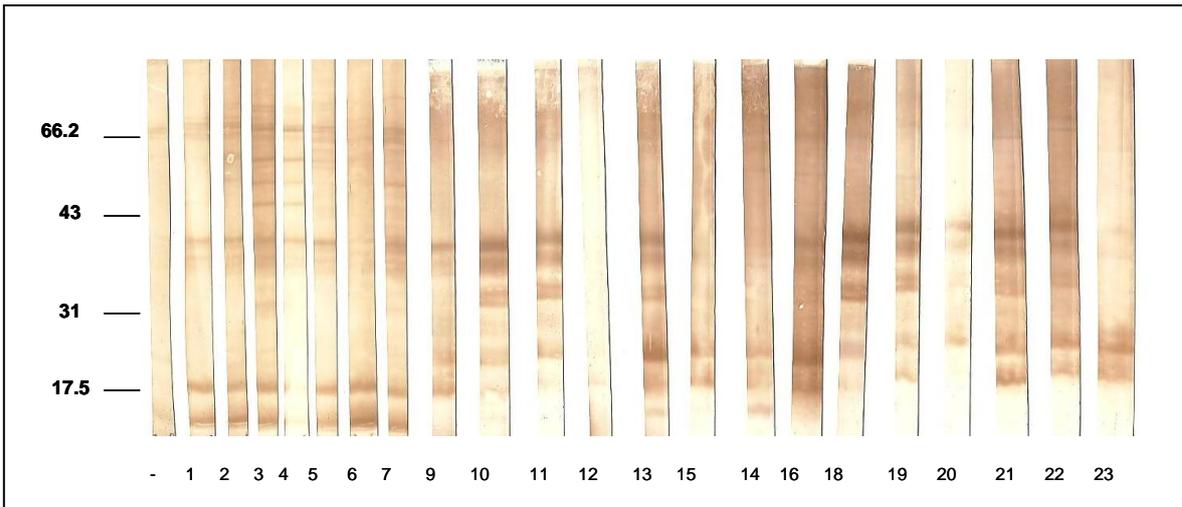


Fig 45. Reconocimiento antigénico por IgG2 empleando antígeno BCN83 de los sueros a día 0 pretratamiento.

En las IgG2, lo más llamativo es el reconocimiento de proteínas de bajo peso molecular, por debajo de 20 kDa (figura 45).

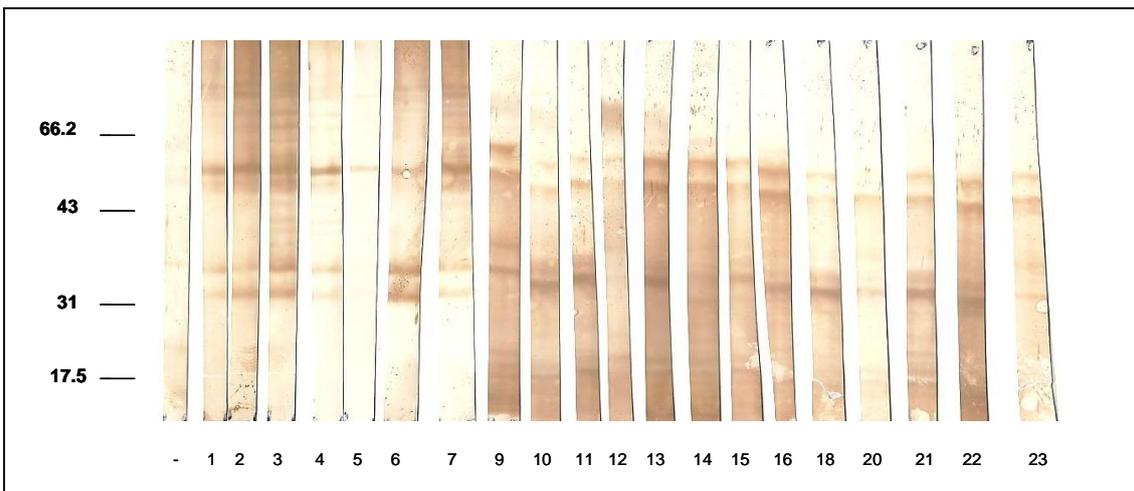


Fig 46. Reconocimiento antigénico por IgG empleando antígeno BCN150 de los sueros a día 0 pretratamiento

Cuando utilizamos el Ag BCN 150, el patrón de reconocimiento antigénico es muy homogéneo, y el rango de reconocimiento se amplia por debajo de 20 kDa (figura 46).

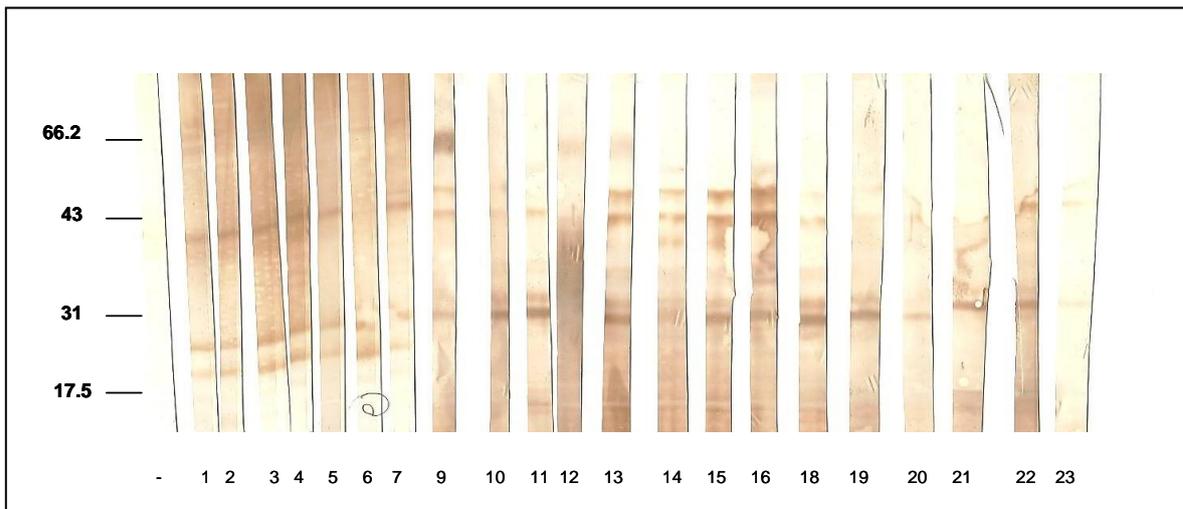


Fig 47. Reconocimiento antigénico por IgG1 empleando antígeno BCN150 de los sueros a día 0 pretratamiento.

El patrón de reconocimiento para las IgG1 fue más homogéneo entre los distintos animales para BCN150 que para BCN83. Y las proteínas más intensamente reconocidas estaban entre 20-30 kDa y entre 40-45 kDa (figura 47).

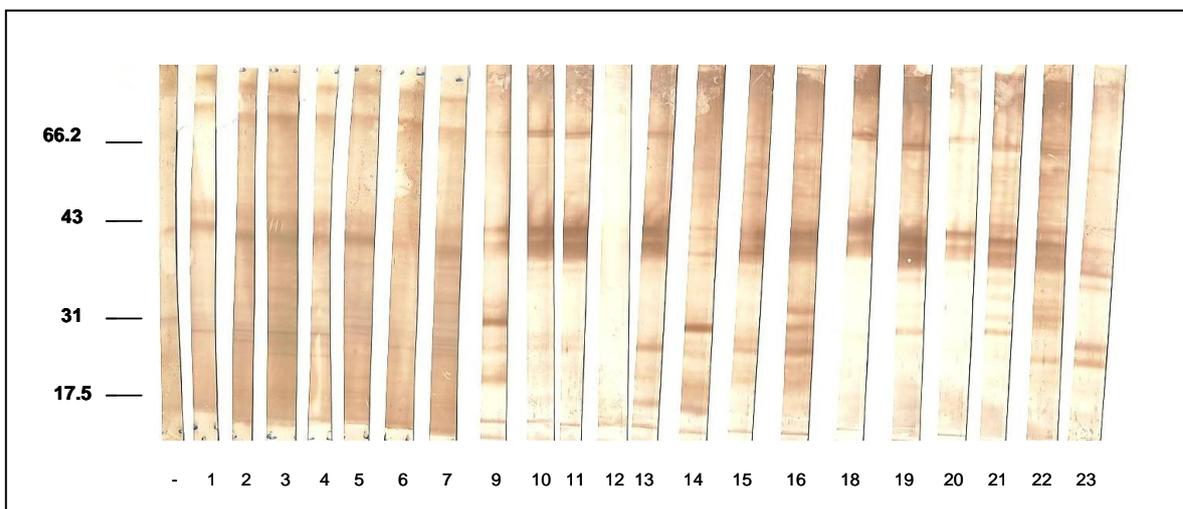


Fig 48. Reconocimiento antigénico por IgG2 empleando antígeno BCN150 de los sueros a día 0 pretratamiento

En relación a la IgG2, se puede observar que se mantiene el reconocimiento de las proteínas de 40-45 kDa, pero hay una gran variación en el reconocimiento de las proteínas de bajo peso molecular entre los diferentes animales (figura 48).

## Postratamiento

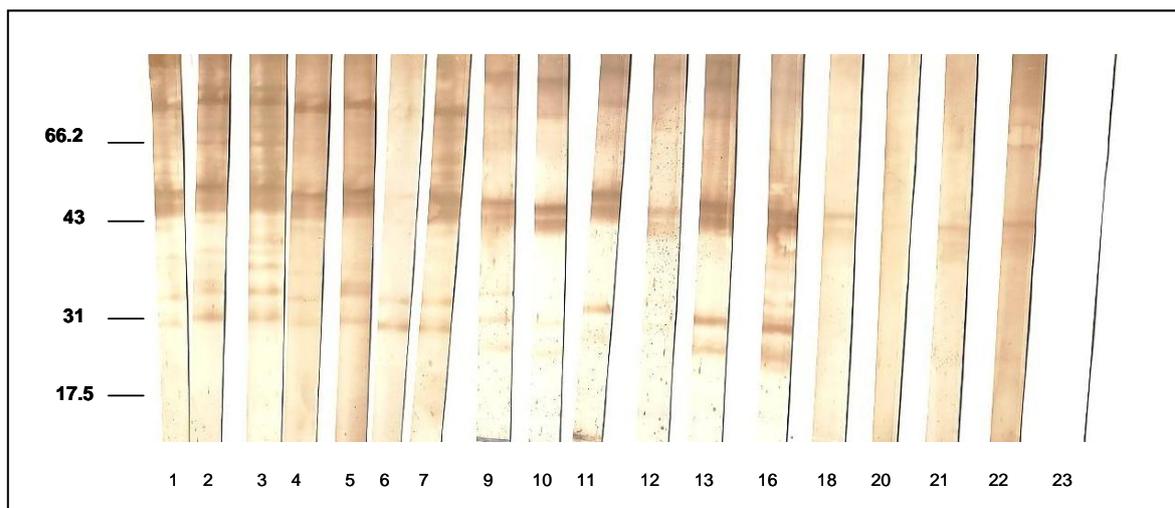


Fig 49. Reconocimiento antigénico por IgG empleando antígeno BCN83 de los sueros a día 90 postratamiento

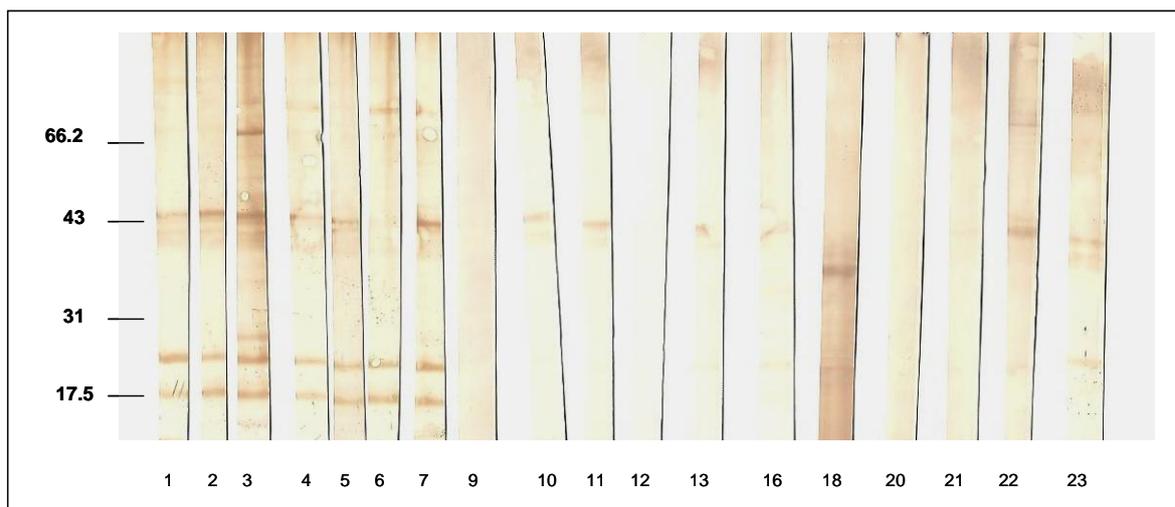


Fig 50. Reconocimiento antigénico por IgG1 empleando antígeno BCN83 de los sueros a día 90 postratamiento.

En el caso de las IgG frente a BCN83, se observa que se mantiene el reconocimiento de las proteínas entre 40 y 45 kDa, variando la intensidad según el animal. Lo más llamativo fue que se dejaron de reconocer las proteínas de bajo peso molecular en todos los animales (figura 49). Cuando se analizan las IgG1, vemos que hay una disminución del reconocimiento en la mayor parte de los animales de las proteínas de 40-45 kDa (figura 50).

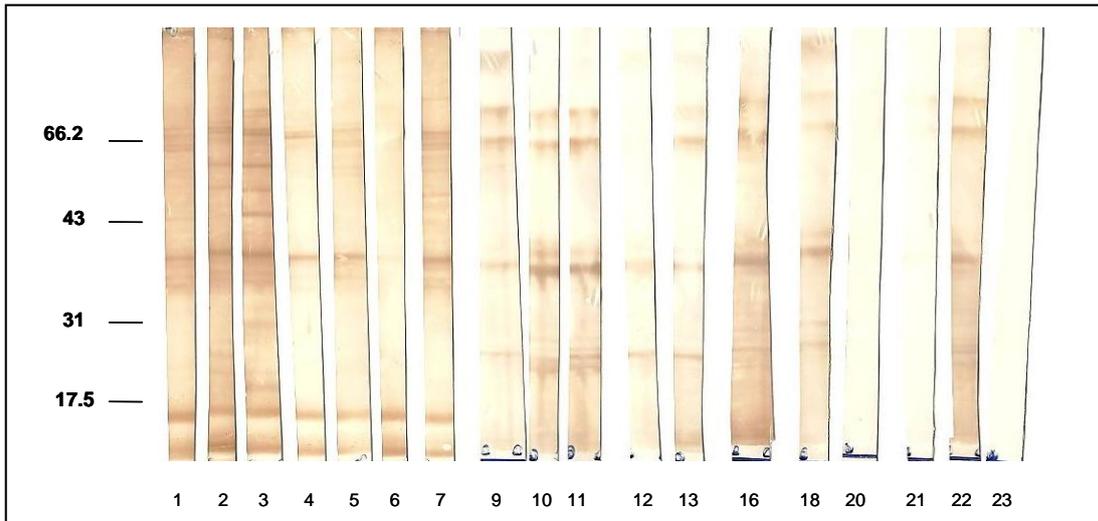


Fig 51. Reconocimiento antigénico por IgG2 empleando antígeno BCN83 de los sueros a día 90 postratamiento.

El perfil de reconocimiento por IgG2, frente a Ag de BCN83, tras el tratamiento es mucho más variable entre los diferentes animales, reconociéndose proteínas de diferentes pesos moleculares por debajo de 30 kDa (figura 51).

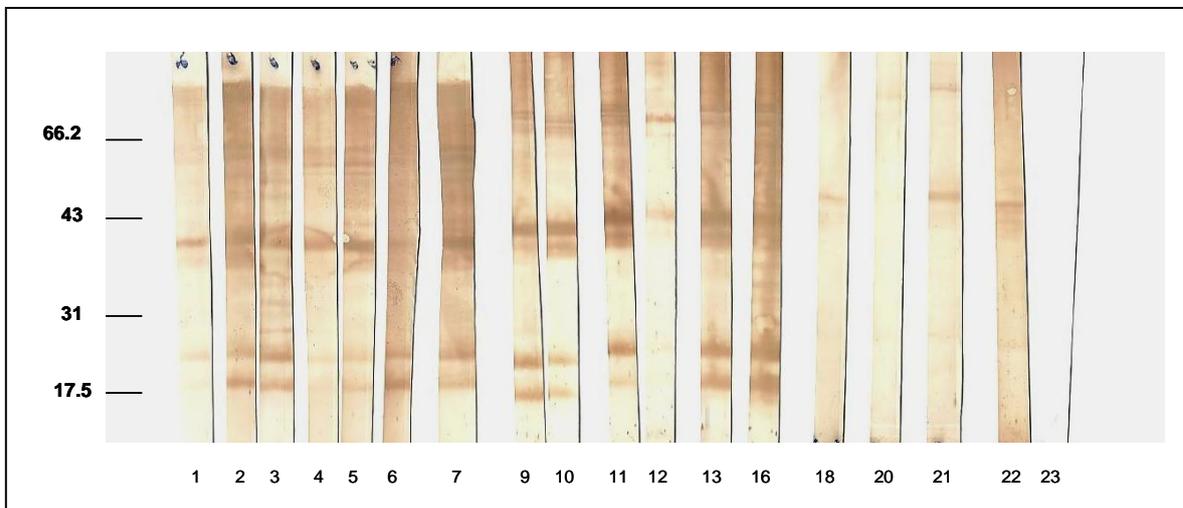


Fig 52. Reconocimiento antigénico por IgG empleando antígeno BCN150 de los sueros a día 90 postratamiento

En la figura 52 se observa el reconocimiento por IgG empleando antígeno de BCN150, el perfil de reconocimiento es mucho más homogéneo entre los diferentes animales que cuando se emplea el Ag de BCN83. Los títulos de anticuerpos tras el tratamiento

se habían reducido en la mayor parte de los animales, en el western-blot este fenómeno se refleja no solo en la intensidad de las bandas sino en la falta de reconocimiento de algunas de ellas, especialmente las de bajo peso molecular.

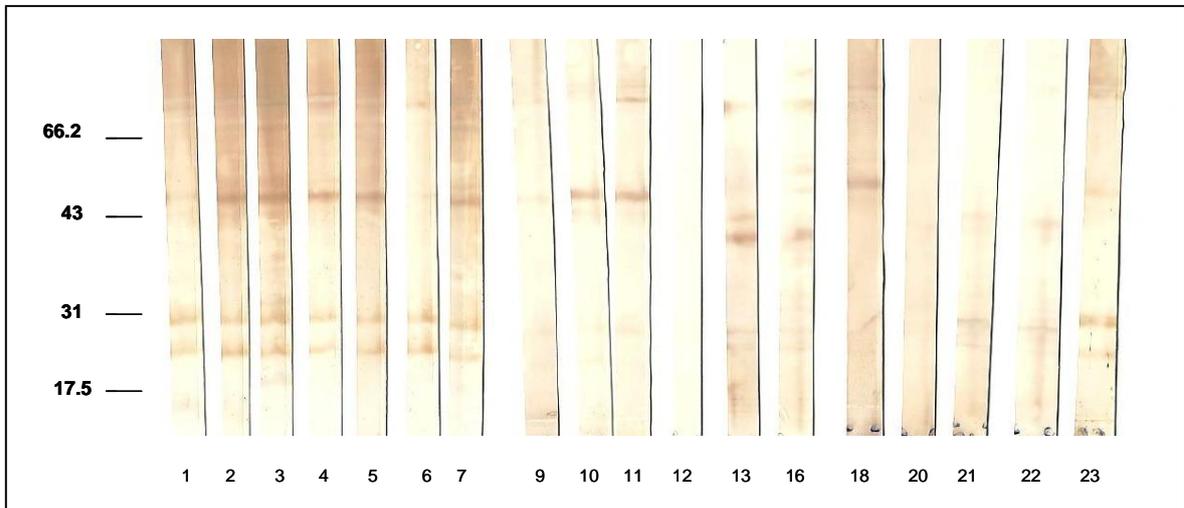


Fig 53. Reconocimiento antigénico por IgG1 empleando antígeno BCN150 de los sueros a día 90 postratamiento

La disminución en la intensidad de reconocimiento antigénico tras el tratamiento es especialmente visible cuando se analizan las IgG1 (figura 53).

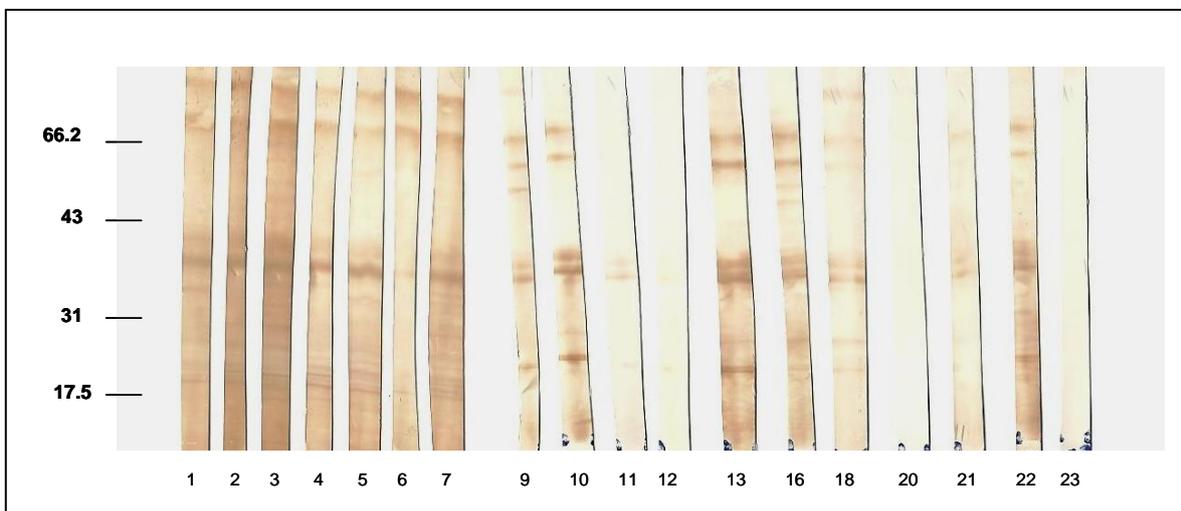


Fig 54. Reconocimiento antigénico por IgG2 empleando antígeno BCN150 de los sueros a día 90 postratamiento

Para las IgG2, se sigue manteniendo visible un doblete entre 40-45 kDa, variando el reconocimiento de los antígenos de bajo peso molecular según el animal (figura 54).

## **EFFECTOS ADVERSOS**

Para conocer la tolerancia del principio activo empleado, se llevó a cabo un estudio exhaustivo de los posibles efectos adversos durante el periodo de tratamiento en todos los animales incluidos. Se interrogaba y anotaba en cada visita cualquier incidencia observada por los cuidadores.

El tratamiento se realizó por vía endovenosa y durante el mismo ningún animal mostró ningún tipo de alteración. En este paso se tuvo especial precaución puesto que en cada uno de los tratamientos se les administraba una dosis entre 7-8 veces la dosis habitualmente empleada. Como el fármaco es un sistema de liberación sostenida tuvimos especial precaución a la hora de establecer la pauta posológica, distanciando las dosis (15 días), para evitar que un exceso de fármaco acumulado pudiera dar lugar a efectos adversos (específicamente toxicidad cardiaca, que ya había sido observada en estudios previos, cuando se administraba el tratamiento con una mayor frecuencia). Solamente uno de los animales mostró efectos adversos después del segundo día del tratamiento, consistente en vómitos y disminución del apetito, con estado de postración durante varios días.

Debemos hacer especial mención al perro 014 ("huesitos"). Su situación clínica al inicio del tratamiento era muy deplorable, con alteraciones renales y hepáticas debidas al propio parásito. En el tratamiento de anfotericina B convencional se recomienda no superar la dosis acumulada de 15 mg/Kg. Sin embargo, debido a la situación de este animal decidimos dar una cuarta dosis, es decir, una dosis acumulada de 20 mg. Aunque la administración del tratamiento no supuso la mejoría de la sintomatología, no se observaron efectos adversos tras el tratamiento.

**Síntomas principales:**

Alopecia: 3

Descamación: 2

Hiperqueratosis: 2

Onicogriposis: 2

IFI: 1/1400

Fig 55. Estado clínico del perro 014 al inicio del tratamiento



## FICHAS RESUMEN DE CADA ANIMAL ANTES Y DESPUÉS DEL TRATAMIENTO

A continuación, se detallan de forma más ilustrativa la situación clínica y serológica de cada uno de los animales antes y después del tratamiento.

Valores normales:

-Proteínas totales suero: 5,1 – 7,0 (g/dl)

-Cociente A/G: 0,72-1,90

### FICHA RESUMEN

Perro 001

Sexo: Hembra

Raza: Podenco

**DIA 0**



#### Síntomas principales:

Alopecia: 1

Descamación: 2

Hiperqueratosis: 1

Onicogriposis: 1

Puntuación clínica: 6

Proteínas: 8,6 gr/dl

Cociente A/G: 0,38

IFI: 1/800

**DIA 90**



#### Síntomas principales:

Alopecia: 0

Descamación: 0

Hiperqueratosis: 0

Onicogriposis: 0

Puntuación clínica: 2

IFI: 1/400

## FICHA RESUMEN

Perro 002  
Sexo: Hembra  
Raza: Cruce

**DIA 0**



### Síntomas principales:

Alopecia: 3  
Descamación: 2  
Hiperqueratosis: 0  
Onicogriposis: 1

Puntuación clínica: 25  
Proteínas: 8,5 gr/dl  
Cociente A/G: 0,34

IFI: 1/3200

**DIA 90**



### Síntomas principales:

Alopecia: 1  
Descamación: 2  
Hiperqueratosis: 0  
Onicogriposis: 1

Puntuación clínica: 14

IFI: 1/800

**FICHA RESUMEN**

Perro 003  
Sexo: Hembra  
Raza: Cruce

**DIA 0****Síntomas principales:**

Alopecia: 1

Descamación: 2

Hiperqueratosis: 2

Onicogriposis: 2

Puntuación clínica: 27

Proteínas: 9,7 gr/dl

Cociente A/G: 0,29

IFI: 1/1600

**DIA 90****Síntomas principales:**

Alopecia: 1

Descamación: 2

Hiperqueratosis: 2

Onicogriposis: 2

Puntuación clínica: 21

IFI: 1/1600

## FICHA RESUMEN

Perro 004  
Sexo: Hembra  
Raza: Cruce

**DIA 0**



### Síntomas principales:

Alopecia: 3  
Descamación: 1  
Hiperqueratosis:1  
Onicogriposis: 3

Puntuación clínica: 29  
Proteínas: 9,7 gr/dl  
Cociente A/G: 0,29

IFI: 1/1600

**DIA 90**



### Síntomas principales:

Alopecia: 0  
Descamación: 0  
Hiperqueratosis:1  
Onicogriposis: 2

Puntuación clínica: 12

IFI: 1/200

**FICHA RESUMEN****Perro 005****Sexo: Hembra****Raza: Cruce****DIA 0****Síntomas principales:**

Alopecia: 0

Descamación: 1

Hiperqueratosis: 2

Onicogriposis: 2

Puntuación clínica: 23

Proteínas: 9 gr/dl

Cociente A/G: 0,21

IFI: 1/400

**DIA 90****Síntomas principales:**

Alopecia: 2

Descamación: 2

Hiperqueratosis: 2

Onicogriposis: 2

Puntuación clínica: 29

IFI: 1/800

## FICHA RESUMEN

Perro 006  
Sexo: Hembra  
Raza: Cruce

**DIA 0**



### Síntomas principales:

Alopecia: 3  
Descamación: 2  
Hiperqueratosis: 2  
Onicogriposis: 1  
Adenopatías: 1  
Despigmentación: 2

Puntuación clínica: 17  
Proteínas: 8,5 gr/dl  
Cociente A/G: 0,4

IFI: 1/800

**DIA 90**



### Síntomas principales:

Alopecia: 0  
Descamación: 0  
Hiperqueratosis: 0  
Onicogriposis: 1  
Adenopatías: 0  
Despigmentación: 0

Puntuación clínica: 6

IFI: 1/200

**FICHA RESUMEN****Perro 007****Sexo: Macho****Raza: Pointer****DIA 0****Síntomas principales:**

Alopecia: 1

Descamación: 2

Hiperqueratosis: 1

Onicogriposis: 1

Puntuación clínica: 29

Proteínas: 8,6 gr/dl

Cociente A/G: 0,33

IFI: 1/800

**DIA 90****Síntomas principales:**

Alopecia: 1

Descamación: 2

Hiperqueratosis: 1

Onicogriposis: 1

Puntuación clínica: 21

IFI: 1/400

## FICHA RESUMEN

Perro 009

Sexo: Macho

Raza: Pointer

**DIA 0**



### Síntomas principales:

Alopecia: 1

Descamación: 1

Puntuación clínica: 14

Proteínas: 7,1 gr/dl

Cociente A/G: 0,34

IFI: 1/400

**DIA 90**



### Síntomas principales:

Alopecia: 1

Descamación: 1

Puntuación clínica: 12

IFI: 1/400

**FICHA RESUMEN**

**Perro 010**  
**Sexo: Hembra**  
**Raza: Cruce**

**DIA 0****Síntomas principales:**

Alopecia: 1  
Descamación: 1  
Hiperqueratosis: 1  
Adenopatias: 3

Puntuación clínica: 11  
Proteínas: 9 gr/dl  
Cociente A/G: 0,2

IFI: 1/400

**DIA 90****Síntomas principales:**

Alopecia: 1  
Descamación: 1  
Hiperqueratosis: 1  
Adenopatias: 1

Puntuación clínica: 9

IFI: 1/100

## FICHA RESUMEN

Perro 011

Sexo: Macho

Raza: Pointer

**DIA 0**



### Síntomas principales:

Alopecia: 1

Descamación: 1

Hiperqueratosis: 1

Onicogriposis: 1

Atrofia muscular: 2

Puntuación clínica: 9

Proteínas: 6,6 gr/dl

Cociente A/G: 0,42

IFI: 1/400

**DIA 90**



### Síntomas principales:

Alopecia: 1

Descamación: 1

Hiperqueratosis: 1

Onicogriposis: 1

Atrofia muscular: 0

Puntuación clínica: 7

IFI: 1/400

**FICHA RESUMEN****Perro 012****Sexo: Hembra****Raza: Pastro Alemán****DIA 0****Síntomas principales:**

Onicogriposis: 1

Ulceras: 2

Puntuación clínica: 8

Proteínas: 6 gr/dl

Cociente A/G: 0,49

IFI: 1/400

**DIA 90****Síntomas principales:**

Onicogriposis: 1

Ulceras: 0

Puntuación clínica: 3

IFI: 1/100

## FICHA RESUMEN

Perro 013  
Sexo: Hembra  
Raza: Pointer

**DIA 0**



### Síntomas principales:

Alopecia: 1  
Descamación: 1  
Hiperqueratosis: 1  
Onicogriposis: 2  
Adenopatías: 3

Puntuación clínica: 16  
Proteínas: 9,3 gr/dl  
Cociente A/G: 0,25

IFI: 1/1600

**DIA 90**



### Síntomas principales:

Alopecia: 1  
Descamación: 1  
Hiperqueratosis: 1  
Onicogriposis: 1  
Adenopatías: 1

Puntuación clínica: 11

IFI: 1/400

**FICHA RESUMEN**

Perro 015  
Sexo: Hembra  
Raza: Cruce

**DIA 0****Síntomas principales:**

Alopecia: 2  
Descamación: 2  
Hiperqueratosis: 2  
Onicogriposis: 1  
Adenopatías: 3

Puntuación clínica: 29  
Proteínas: 11,6 gr/dl  
Cociente A/G: 0,17

IFI: 1/1600

**DIA 90****Síntomas principales:**

Alopecia: 1  
Descamación: 1  
Hiperqueratosis: 1  
Onicogriposis: 1  
Adenopatías: 1

Puntuación clínica: 22

IFI: 1/400

## FICHA RESUMEN

Perro 016

Sexo: Macho

Raza: Cruce Braco

**DIA 0**



### Síntomas principales:

Alopecia: 1

Descamación: 3

Onicogriposis: 1

Puntuación clínica: 22

Proteínas: 8,9 gr/dl

Cociente A/G: 0,25

IFI: 1/1600

**FICHA RESUMEN****Perro 018****Sexo: Hembra****Raza: Samoyedo****DIA 0****Síntomas principales:**

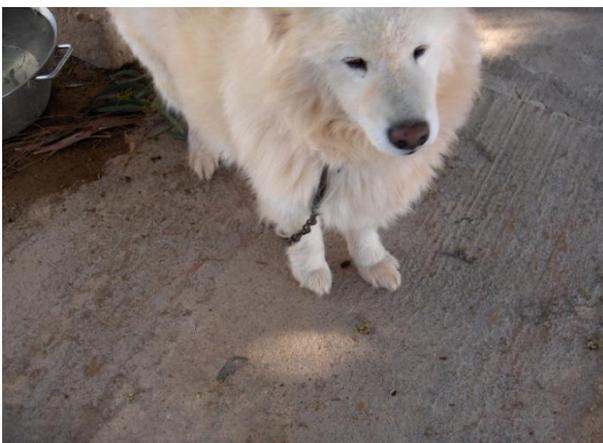
Alopecia: 1

Puntuación clínica: 8

Proteínas: 8,2 gr/dl

Cociente A/G: 0,31

IFI: 1/1600

**DIA 90****Síntomas principales:**

Alopecia: 0

Puntuación clínica: 5

IFI: 1/100

## FICHA RESUMEN

Perro 019  
Sexo: Macho  
Raza: Samoyedo

**DIA 0**



**Síntomas principales:**  
Alopecia: 1

Puntuación clínica: 8  
Proteínas: 10,3 gr/dl  
Cociente A/G: 0,25

IFI: 1/1600

**FICHA RESUMEN**

Perro 020  
Sexo: Hembra  
Raza: Cruce

**DIA 0****Síntomas principales:**

Falta de apetito: 3

Puntuación clínica: 3

Proteínas: 8,8 gr/dl

Cociente A/G: 0,31

IFI: 1/200

**DIA 90**

Puntuación clínica: 0

IFI: 1/100

## FICHA RESUMEN

Perro 021

Sexo: Hembra

Raza: Pastor Alemán

**DIA 0**



**Síntomas principales:**

Alopecia: 1

Puntuación clínica: 8

Proteínas: 8,7 gr/dl

Cociente A/G: 0,26

IFI: 1/800

**DIA 90**



**Síntomas principales:**

Alopecia: 1

Puntuación clínica: 4

IFI: 1/200

**FICHA RESUMEN**

Perro 022  
Sexo: Hembra  
Raza: Cruce

**DIA 0****Síntomas principales:**

Adenopatías: 3

Puntuación clínica: 6

Proteínas: 8,7 gr/dl

Cociente A/G: 0,47

IFI: 1/800

**DIA 90****Síntomas principales:**

Adenopatías: 2

Puntuación clínica: 0

IFI: 1/400

## FICHA RESUMEN

Perro 023

Sexo: Macho

Raza: Cruce gigante

**DIA 0**



### Síntomas principales:

Adenopatías: 3

Seborrea grasa: 1

Puntuación clínica: 10

Proteínas: 6,9 gr/dl

Cociente A/G: 0,56

IFI: 1/200-1/400

**DIA 90**



### Síntomas principales:

Adenopatías: 3

Seborrea grasa: 0

Puntuación clínica: 2

IFI: 1/100

**RESUMEN PUNTUACIÓN CLÍNICA Y TÍTULOS DE ANTICUERPOS**

Tabla 18. Resumen de la puntuación clínica global y títulos de anticuerpos a día 0 y a día 90 post-tratamiento con anfotericina poliagregada, para cada uno de los animales.

Animal	Puntuación clínica Día 0	Títulos IFI Día 0	Puntuación clínica Día 90	Títulos IFI Día 90
001	6	800	2	400
002	25	3200	14	800
003	27	1600	21	1600
004	29	1600	12	200
005	23	400	29	800
006	17	800	6	200
007	29	800	21	400
009	14	400	12	400
010	11	400	9	100
011	9	400	7	400
012	8	400	3	100
013	16	1600	11	400
015	22	1600	12	400
016	22	1600	15	
018	8	1600	5	100
019	8	1600	5	
020	3	200	0	100
021	8	800	4	200
022	6	800	0	400
023	10	400	2	100



## **DISCUSIÓN**

---



## FARMACOCINÉTICA

La anfotericina B poliagregada presenta un perfil farmacocinético completamente diferente al del AmBisome® caracterizado por una rápida desaparición de plasma tras la administración intravenosa y un volumen de distribución y semivida plasmática muy superiores, pudiéndose detectar niveles de anfotericina B en el organismo hasta 15 días después de la infusión del fármaco. Este perfil farmacocinético tan característico está relacionado íntimamente con las características morfológicas que presentan los poliagregados, un tamaño de partícula muy superior al del Ambisome® y un potencial zeta muy negativo y además son partículas relativamente hidrofóbicas (de ahí que estén agregadas y no solubilizadas en el medio acuoso).

Por esta razón, cabe pensar que la rápida desaparición de plasma ligada a una alta acumulación en el organismo podría estar relacionados con un proceso de fagocitosis por parte de los macrófagos circulantes tras la administración intravenosa seguida por una acumulación preferente en los tejidos del RES (hígado, bazo y médula ósea) en donde se localizan los macrófagos infectados por *Leishmania* (Gref *et al.*, 2013).

El tamaño de partícula del Ambisome® juega un papel clave en su perfil farmacocinético. El tamaño medio de partícula de los liposomas está en torno a los 70-80 nm siendo suficientemente pequeños como para ser menos opsonizados por los componentes del plasma, pero al mismo tiempo, son lo suficientemente grandes como para no ser rápidamente eliminados por el riñón (teniendo en cuenta que el glomérulo renal filtra de forma efectiva partículas por debajo de los 10 nm (Choi *et al.*, 2011). Por esta razón, tanto el AmBisome® como el poliagregado se consideran formulaciones más seguras y no tan nefrotóxicas como la Fungizona® que al ser un sistema micelar es la que tiene un tamaño de partícula inferior dando lugar a una eliminación renal más rápida y por lo tanto mayor acumulación en este órgano y mayor nefrotoxicidad, no pudiendo administrarse dosis diarias superiores a 1-1.5 mg/kg debido a los problemas de toxicidad.

En cuanto a la dosis óptima a administrar, se han probado varias opciones 5 y 10 mg/kg. En ninguno de los casos, se han observado efectos adversos durante la administración. La farmacocinética del poliagregado se ha descrito como no lineal, existiendo un equilibrio entre el fármaco que es transportado en sangre unido a las proteínas plasmáticas (que pueden llegar a saturarse) y a la actividad fagocítica del RES. En el caso de perros infectados con *Leishmania*, la capacidad fagocítica puede estar disminuida pero también puede existir un descenso en las proteínas plasmáticas a causa de la enfermedad, por lo que la variabilidad interindividual será evidente en función de las características de cada perro. Por esta razón, nos pareció más prudente comenzar los estudios de farmacodinamia con dosis de 5 mg/kg.

Quizás, las observaciones prácticas más importantes de este capítulo hayan sido: i) que preferiblemente la administración intravenosa debe de hacerse sin utilizar ningún anestésico ya que la gran mayoría presenta una alta unión a proteínas plasmáticas y va a interferir con el perfil farmacocinético del fármaco potenciando los efectos adversos y ii) es preferible utilizar la anfotericina B poliagregada sin encapsular debido al riesgo existente de que se puedan producir reacciones anafilácticas graves en más perros.

Según diferentes fuentes bibliográficas (Tabla 3), la ED<sub>50</sub> del Ambisome<sup>®</sup> frente a amastigotes de *Leishmania* es superior a la de la anfotericina B dimérica y monomérica, de manera que cabría pensar que, aunque la concentración plasmática del poliagregado fuese inferior a la del Ambisome<sup>®</sup> a los 7 días tras la administración de 5 mg/kg, no necesariamente tiene porque presentar menor actividad frente a *Leishmania*.

Tabla 19. Eficacia *in vitro* de la anfotericina B en diferentes estados de agregación frente a diferentes especies de *Leishmania* en diferentes estados amastigote o promastigote.

ESPECIE (ESTADÍO)	FORMULACIÓN	ED <sub>50</sub> (µCG /ML)	REF
<i>L. infantum</i> amastigotes	Anfotericina B monomérica	0.069 ± 0.01	Ordoñez <i>et al.</i> , 2007
	Anfotericina B dimérica	0.033 ± 0.007	
	Anfotericina B monoméricaencapsulada	0.0037 ± 0.00232	
	Anfotericina B diméricaencapsulada	0.037 ± 0.0113	
<i>L. donovania</i> amastigotes	Fungizona®	0.0166 + 0.0079	Manandhar <i>et al.</i> , 2008
	Fungizona® micronizada	0.0045 + 0.0026	
<i>L. donovani</i> promastigotes	Fungizona®	0.1125 + 0.0148	
	Fungizona® micronizada	0.0798 + 0.0248	
<i>L. donovani</i> amastigotes	Fungizona®	0.013	Petit <i>et al.</i> , 1999
	Amphocil®	0.02	
	Ambisome®	1.5	
	Abelcet®	2.6	
<i>L. major</i> amastigotes (NEAL-P)	Fungizona®	0.2	Yardley & Croft, 1997
	Ambisome®	1.8	
<i>L. major</i> amastigotes (JISH118)	Fungizona®	0.6	
	Ambisome®	2.0	
<i>L. major</i> promastigotes (NEAL-P)	Fungizona®	0.5	
	Ambisome®	2.96	
<i>L. major</i> promastigotes (JISH118)	Fungizona®	0.96	
	Ambisome®	3.21	

Como se ha descrito en el apartado de la dosis múltiple, en principio, el régimen terapéutico basado en una dosis de anfotericina B poliagregada de 5 mg/kg cada 15 días debiera de ser efectiva sin llegar a producir efectos tóxicos desorbitados que no permitan continuar con el tratamiento. Aunque se observó una mejoría clínica en los beagles tratados con la anfotericina B durante los experimentos de farmacocinética, hay que tener en cuenta que al ser Beagles infectados experimentalmente, recibieron una carga parasitaria muy superior a la que ocurre de manera natural y por lo tanto, presentaban un grado de la enfermedad demasiado avanzado, no obteniéndose curación clínica a largo plazo en ninguno de los perros a pesar de la administración intravenosa de anfotericina B.

## **FARMACODINAMIA**

### **Consideraciones y valoración de los animales incluidos en el estudio**

La leishmaniosis canina es una de las enfermedades parasitarias de mayor gravedad y a su vez, de más difícil manejo, debido principalmente a la variabilidad de los cuadros clínicos, al frecuente fracaso terapéutico y a su carácter zoonótico y vectorial, lo que dificulta su control en determinadas áreas endémicas (Miró & Fraile, 1999).

Se han llevado diferentes estudios para desarrollar modelos de leishmaniosis canina experimental con el fin de evaluar vacunas y tratamientos frente a esta enfermedad. En este sentido, se han desarrollado dos tipos de modelos, aquellos en los que se administra un elevado inoculo de promastigotes por vía intravenosa y los que se hacen por vía intradérmica, con inoculos más pequeños pero que simulan mejor la forma natural de infección.

En los modelos de administración intravenosa se consigue la aparición de los síntomas clínicos en todos los animales (Strauss-Ayali *et al.*, 2004; Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Carcelén *et al.*, 2009, Teixeira *et al.*, 2011; Fernández-Cotrina *et al.*, 2013), y de una forma más rápida que en el caso del uso de la vía intradérmica (Paranhos-Silva *et al.*, 2003; Travi *et al.*, 2009).

Sin embargo, algunos autores consideran que este tipo de modelos no reflejan de forma adecuada lo que ocurre en una infección natural. Así, más recientemente, Costa *et al.*, (2013) han desarrollado un modelo en el que se administraba por vía intradérmica una dosis elevada de promastigotes, pero en combinación con saliva de flebotominos, consiguiendo una mayor similitud a la infección natural.

En cualquier caso, la evaluación de fármacos en el caso de la leishmaniosis canina empleando animales experimentalmente infectados supone graves dificultades no solo en cuanto a disponer de un número de animales suficiente, que estén en unas condiciones adecuadas de alojamiento y aislamiento, sino a los condicionantes éticos. Por ello, el empleo de animales naturalmente infectados permite realizar una primera

aproximación más sencilla para evaluar la eficacia de fármacos. Previamente, nuestro grupo había realizado numerosos ensayos tanto de eficacia como de toxicidad en modelos de hamster y ratón, y además se habían realizado unos primeros ensayos en perros. Nuestros resultados habían demostrado que se conseguía una elevada eficacia empleando dosis muy elevadas en una pauta corta de administración (Sánchez-Brunete *et al.*, 2004). Sin embargo y debido a que existen diferencias considerables entre roedores y perros en cuanto al metabolismo de fármacos decidimos iniciar el estudio con animales que estaban en una situación de “desahucio” y que habrían sido sacrificados por su estado avanzado de la enfermedad, ya que desconocíamos si el fármaco a la dosis a aplicar podía mostrar toxicidad (Dietz *et al.*, 1983). La desventaja, sin embargo, es que la mayor parte de los animales estaban en la fase crónica de la enfermedad y no fue posible darles cuidados especiales adicionales.

En nuestro estudio la mayoría de animales eran hembras (61.9%). No existen datos concluyentes en cuanto a la influencia del sexo en la enfermedad, por lo que en general no se considera un factor determinante.

Todas las razas de perros son susceptibles de padecer la enfermedad. En nuestro estudio la mayoría de los animales eran de raza mixta (85,7%). Diversos autores indican una mayor susceptibilidad entre los animales de pelo corto (Morillas *et al.*, 1996), en nuestro estudio el 90% de los animales eran de pelo corto, mientras que solo el 10% eran de pelo largo, de los cuales dos eran de raza pura (samoyedos).

Todos los perros tenían una edad superior a dos años. La edad es un factor de riesgo de padecer la enfermedad ya que hay más posibilidad de sufrir la picadura del mosquito (Martínez-Cruz, 1990; Abranches *et al.*, 1991; Miró *et al.*, 2007b; Cortes *et al.*, 2012).

### **Sintomas pretratamiento**

La leishmaniosis puede dar lugar a diversos síntomas y manifestaciones, ya que afecta a muchos y diversos órganos, es común encontrar tanto animales asintomáticos como animales realmente graves y afectados por la enfermedad dependiendo de la fase de la enfermedad y del estado inmunitario. (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas y *et al.*, 1999). En la mayoría de los casos la enfermedad cursa con pérdida de peso progresivo, linfadenopatías y lesiones cutáneas (Pasa *et al.*, 2005).

Tradicionalmente en función de los síntomas, los animales se clasificaban en asintomáticos, oligosintomáticos y polisintomáticos (Mancianti *et al.*, 1988). Sin embargo, más recientemente se ha empezado a utilizar un sistema de puntuación objetiva de los signos clínicos, lo que permite obtener una puntuación clínica individualizada y su valoración a lo largo del tiempo (Rodríguez-Cortés *et al.*, 2007; Miró *et al.*, 2009; Miró *et al.*, 2011; Miró *et al.*, 2012). En nuestro estudio, se ha utilizado un sistema de categorización de los síntomas, donde se daban valores a 0 a 3 según la gravedad, para diferentes síntomas, hasta un valor máximo de 80. No todos los animales presentaron síntomas graves pero debemos tener en cuenta que muchas veces los perros pueden presentar formas sistémicas de la enfermedad, como insuficiencia renal, sin presentar lesiones cutáneas ni signos clínicos evidentes (Miró, 2013). De hecho, la puntuación total en relación a los síntomas clínicos osciló entre 29 y 3, a pesar de que todos los animales tenían títulos de anticuerpos específicos superiores a 1/400 (ver Tabla 18).

En nuestro estudio el 76% de los animales mostraron un apetito normal y tan solo 2 animales mostraron anorexia. En cuanto al estado general era normal en el 90% de los animales. El 24,8% de los animales mostró adelgazamiento o atrofia muscular, resultados similares al de otros estudios (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999)

Las lesiones cutáneas son constantes en la mayoría de los perros con leishmaniosis y en ocasiones es el único signo clínico apreciable. Además, son muy pleomórficas tanto desde un punto de vista clínico como histopatológico (Ordeix & Fondati, 2013). Los signos dermatológicos más comunes observados en perros con leishmaniosis incluyen dermatitis exfoliativa, dermatitis ulcerativa y onicogriposis. Sin embargo, también se diagnostican otras manifestaciones menos típicas como dermatitis papular, dermatitis nodular muco-cutánea o dermatitis pustular estéril (Saridomichelakis & Koutinas, 2014). Esta variación clínica se debe a una amplia variedad de mecanismos patológicos que ocurren secundariamente a la inflamación, deposición de complejos inmunes y/o producción de autoanticuerpos (Koutinas & Koutinas, 2014) y a la incapacidad del sistema inmunológico para controlar la multiplicación de los parásitos y la invasión de los tejidos (McCall *et al.*, 2013)

En nuestro estudio, la lesión cutánea más frecuente era la queratoseborreica (71,5%) La forma queratoseborreica se caracteriza por una dermatitis exfoliativa con lesiones alopécicas y descamativas difusas, localizadas especialmente en cabeza y extremidades. Estos resultados concuerdan con otros trabajos donde se observa un alto porcentaje de este tipo de lesiones tanto en animales naturalmente infectados (Ciaramella *et al.*, 1997; Poli *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999; Almeida *et al.*, 2005 Carcelén *et al.*, 2009) como en infectados experimentalmente (Fernández-Cotrina *et al.*, 2013; Hernández *et al.*, 2015a).

La siguiente forma cutánea más frecuente es la ulcerativa (33,3%), coexistiendo en varios animales ambos tipos de lesiones. Aparecen sobre todo en puntos de presión, bordes de orejas, uniones mucocutáneas, etc. Los resultados obtenidos son similares a los obtenidos por otros autores (Ciaramella *et al.*, 1997; Koutinas *et al.*, 1999), aunque varios autores indican una mayor incidencia (Almeida *et al.*, 2005).

Otra lesión relativamente frecuente en la Lcan es la onicogriposis. En nuestro estudio el 56% de los animales presentaban onicogriposis, síntoma que aparece entre un 24-

90% de los animales estudiados por otros autores (Koutinas *et al.*, 2010; Costa *et al.*, 2013; Proverbio *et al.*, 2014). Menos frecuente fue la hiperqueratosis nasal, apareciendo en un 34% de los animales, valor muy inferior al encontrado por otros autores (Koutinas *et al.*, 2001; Koutinas *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2015a).

Las lesiones oculares son también un hallazgo frecuente en perros con leishmaniosis, siendo la forma más frecuente la conjuntivitis (Peña *et al.*, 2000; Koutinas *et al.*, 2001). En nuestro estudio este tipo de lesiones apareció en un 30% de los animales, aunque solo uno de los animales mostraba lesiones graves, valores similares a los encontrados por otros autores.

Otro de los signos más frecuente en la leishmaniosis es la linfadenomegalia localizada o generalizada, que se caracteriza por el aumento del tamaño de los ganglios linfáticos, llegando a afectar al 90% de los animales (Slappendel, 1988; Koutinas *et al.*, 2001), especialmente en los ganglios preescapulares y poplíteos. En nuestro estudio el 90,5% de los perros mostraron inflamación de los ganglios, siendo generalizada en el 57% de los casos.

La esplenomegalia fue poco frecuente en nuestro estudio, lo que concuerda con otros autores que indican que para detectarla es necesario hacer diagnóstico por imagen (Koutinas *et al.*, 1999, Koutinas *et al.*, 2001).

Al contrario que en otros estudios, en los que aparecen porcentajes del 13-25% (Koutinas *et al.*, 2001, Cortadellas, 2003), en nuestro caso no encontramos ningún animal con epistaxis.

En cuanto a otros síntomas como alteraciones digestivas (que pueden producir procesos diarreicos más o menos graves) o poliuria y/o polidipsia no se observaron en los perros del estudio, aunque suelen ser frecuentes en la leishmaniosis (Bourdoiseau, 1993).

### Serología antes del tratamiento

En la leishmaniosis los animales enfermos presentan altos niveles de inmuglobulinas específicas frente al parásito y por tanto tienen un alto valor diagnóstico (Ferrer *et al.*, 1995). Sin embargo, la interpretación de los resultados serológicos es complicada y un título de anticuerpos positivo sin sintomatología, se considera insuficiente para considerar a un animal enfermo (Slappendel *et al.*, 1998).

Hay que recordar que en los perros susceptibles, el número de linfocitos B en sangre periférica varía enormemente, pudiendo aparecer en baja proporción debido posiblemente a la migración de estas células hacia piel y otros órganos. La activación de células B va a generar la sobreproducción de inmunoglobulinas (Cardoso *et al.*, 2007), sin embargo, estos anticuerpos no tienen un carácter protector para el hospedador, ya que aunque favorecen la fagocitosis no actúan en la destrucción de los amastigotes (Brandonisio *et al.*, 1996).

En este sentido, parece que los perros con una sintomatología más marcada presentan un título más elevado que los asintomáticos (Abranches *et al.*, 1991), por lo que diversos autores correlacionan los niveles de anticuerpos con la susceptibilidad a la enfermedad (Slappendel & Ferrer, 1998). Aunque otros autores no logran establecer dicha correspondencia entre títulos elevados y sintomatología (Vercammen *et al.*, 2002).

En nuestro estudio, no encontramos correlación entre los animales que presentaban los títulos más elevados y los que presentaban una mayor puntuación en la valoración clínica. Así, los perros 018 y 019, con con títulos de 1/1600, apenas presentaban síntomas, mientras que otros con los mismos títulos, como 003 ó 004, tenían las puntuaciones más elevadas. Las lesiones cutáneas estaban presentes en todos los animales, excepto en uno, independientemente del título de anticuerpos. Sin embargo, lo que permitía definir más claramente el *status* del animal era el proteinograma y los niveles de creatinina, que aparecían alterados en todos los animales incluidos en el

estudio. Salvo tres animales, el resto presentaban hiperproteinemia causada por una hipergammaglobulinemia, que aparecía alterada en todos los animales. El cociente A/G (albumina/globulinas) estaba por debajo del rango de normalidad en todos los animales, como consecuencia del incremento de las proteínas totales por la mayor producción de anticuerpos. Este fenómeno es un signo típico en la leishmaniosis y nos permitió confirmar que todos los animales estaban en una fase crónica de la enfermedad (Koutinas *et al.*, 1999; Solano-Gallego *et al.*, 2011).

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) se considera como la técnica de referencia debido a su alta sensibilidad y especificidad (Alvar *et al.*, 2004; Moreira *et al.*, 2005; Maia & Campino, 2008). La mayoría de los laboratorios, en nuestro ámbito geográfico, consideran el punto de corte del IFI, títulos iguales o superiores a 1/80 ó 1/100 (Martín-Sánchez *et al.*, 1994). En nuestro caso consideramos como positivos títulos iguales o superiores a 1/100.

En los animales estudiados pudimos observar una amplia variedad de títulos. En el grupo 1, un 41.66% de los animales tenían un título de 1/400, un 25%, 1/800, otro 25%, 1/1600 y un 8.33% tenían 1/3200. En el grupo 2, los animales tenían títulos de un 28.57% de 1/200, un 28.57%, 1/800 y un 42.85%, 1/1600. Siguiendo la Guía LeishVet (Solano-Gallego *et al.*, 2011) que tiene en cuenta los síntomas, los títulos de anticuerpos y los resultados de los análisis de laboratorio (Tabla 11), la mayoría de los animales estaban en el estadio II, salvo cuatro, de los cuales dos están en estadio I, uno en estadio III y otro en el IV.

### **Valoración de la evolución clínica tras el tratamiento.**

La mayoría de los estudios de eficacia frente a *Leishmania* en perros se han basado en el uso de los antimoniales en monoterapia o en combinación con alopurinol, con anfotericina convencional (Fungizona) o más recientemente con miltefosina (Solano-Gallego *et al.*, 2008). Sin embargo, ninguno de estos tratamientos permite una cura parasitológica, ya que los parásitos pueden permanecer en los órganos hematopoyéticos y reactivarse posteriormente, independientemente de que se haya producido una buena respuesta inicial al tratamiento (Martínez *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 2007; Hernández *et al.*, 2015). Además, en zonas endémicas es muy frecuente la re-infección (Moreno & Alvar, 2002; Kuhls *et al.*, 2008; Miró *et al.*, 2008).

Por otro lado, la comparación entre estudios resulta bastante complicada ya que cada autor utiliza posologías diferentes y distintos métodos diagnósticos para evaluar los resultados. Además, hay que tener en cuenta que la respuesta al tratamiento puede verse influenciada por la respuesta individual del paciente, la virulencia de la cepa o la presencia de enfermedades concomitantes.

En los últimos años, se ha adoptado como criterio para la determinación de la eficacia clínica de un tratamiento, hacer una valoración objetiva y fiable de los animales enfermos mediante una puntuación clínica (Miró *et al.*, 2009; Manna *et al.*, 2015; Hernandez *et al.*, 2015). En nuestro estudio este sistema fue especialmente útil, dada la limitación que suponía no poder obtener muestras de médula, bazo o ganglio para determinar la carga parasitaria.

En la mayoría de los trabajos de eficacia terapéutica se consigue una mejoría de la sintomatología clínica e incluso una remisión de los síntomas (Vercammen & De DeKen, 1996; Riera *et al.*, 1999; Pasa *et al.*, 2005; Mateo *et al.*, 2009).

En nuestro estudio hubo una remisión parcial de los síntomas, de forma que teniendo en cuenta el "score" clínico total, hubo una reducción del 38,3% en el grupo 1 que había recibido la dosis de 4 mg, y de 37,9 % en la dosis de 5 mg. Otros estudios

obtienen valores más altos de remisión de los síntomas, así fue del 85,4% empleando glucantime (Slappendel & Teske, 1997) y del 70,4% (Mateo *et al.*, 2009).

Esta menor remisión de los síntomas puede deberse a que los animales incluidos en el estudio estaban en una situación muy avanzada de la enfermedad, además la comparación se realizó a los 90 días post-tratamiento, mientras que en otros trabajos el seguimiento se realizó durante un periodo más largo de tiempo.

En nuestro estudio el 100% de los animales recuperó el apetito. Un 85% presentaron un estado general normal. Solo un 9,5% de los animales siguió presentando adenopatía generalizada. En cuanto a las lesiones cutáneas también mejoraron de forma significativa, reduciéndose las alopecias un 100% en algunos animales, las formas queratoseborreicas se redujeron un 60%, las formas ulcerativas, se redujeron un 90,5% y las nodulares un 50%. Tan solo en el perro 005 hubo un incremento del “score” al final del tratamiento en relación al valor inicial.

Aplicando el test estadístico sobre el “score” total no se encontraron diferencias significativas antes y después del tratamiento, ni con la dosis de 4 ni con la de 5 mg. Sin embargo, tal y como se recogen en las fichas resumen, el estado general de los animales mejoró considerablemente.

### **Serología después del tratamiento**

En la práctica veterinaria se utiliza la seroconversión de la titulación de los niveles de anticuerpos con posterioridad al tratamiento como indicio de la eficacia del tratamiento (Poli *et al.*, 1997), (Miró & Molina, 2006). Diversos autores han indicado una reducción de los títulos acompañada de remisión de los síntomas tras el tratamiento (Poli *et al.*, 1997; Riera *et al.*, 1999). Sin embargo, otros autores indican que el título de anticuerpos se mantiene elevado durante un tiempo bastante prolongado tras el tratamiento aunque se haya producido la remisión de los síntomas (Ferrer *et al.*, 1995; Pasa *et al.*, 2005).

Por otro lado, el uso de la serología para valorar la eficacia terapéutica en la leishmaniosis canina es controvertido. Diversos autores consideran que la respuesta inmune humoral no está implicada en el control de la enfermedad y por tanto el nivel de inmunoglobulinas no tendría valor pronóstico (Ferrer *et al.*, 1995; Rougier *et al.*, 2012), sin embargo otros indican que el nivel de anticuerpos debería emplearse siempre en el seguimiento del tratamiento (Martínez *et al.*, 2011; Miró *et al.*, 2011).

Por otro lado, numerosos autores correlacionan una reducción progresiva de los títulos de anticuerpos con una buena respuesta clínica al tratamiento (Valladares *et al.*, 1998; Riera *et al.*, 1999; Torres *et al.*, 2011). En nuestro estudio se produjo una reducción de los títulos de anticuerpos en todos los animales menos en tres (animales 003, 009 y 011), en los que se mantuvo el título original y uno en el que aumento (005). El animal 003 presentaba al inicio del estudio no solo un título muy elevado, sino que la puntuación clínica era también muy alta. Los animales 009 y 011 tenían puntuaciones y títulos medios. Los animales 003 y 005 presentaron un incremento de la puntuación clínica al final del experimento (en 003 tras disminuir a mitad del experimento, volvieron a aumentar a día 90), aunque en 003 se mantuvieron los títulos de anticuerpos en 005 aumentaron. Por tanto parece que sí existe una relación entre la evolución clínica y la evolución de los títulos de anticuerpos.

En un estudio en Beagles a los que se les infectó de forma experimental con una elevada cantidad de promastigotes y se les administró anfotericina poliagregada i.v. en la fase crónica de la enfermedad, encontraron que los títulos disminuían al inicio del tratamiento, sin que se modificara la puntuación clínica. Si embargo, encontraron que el único animal que redujo el título de anticuerpos de 1/3200 hasta 1/100 era el que tenía una carga parasitaria muy baja al final del experimento (Hernández *et al.*, 2015b).

Cuando comparamos las dos dosis ensayadas en nuestro estudio, vemos que se produjo una reducción de los títulos de anticuerpos, si bien, solo fue estadísticamente significativa en el caso de la dosis de 5 mg.

En el caso del western-blot, los resultados fueron más similares a los obtenidos por otros autores, cuando empleamos el antígeno de la cepa BCN83 (Fernández-Pérez *et al.*, 1999), observando diferencias antes y después del tratamiento en las proteínas de bajo peso molecular. No encontramos claras evidencias en cuanto a posibles diferencias entre los subtipos de inmunoglobulinas al contrario que otros autores (Nieto *et al.*, 1999), posiblemente debido a que el estudio finalizó a 90 días postratamiento y la modificación del tipo de respuesta posiblemente requiera de más tiempo de seguimiento.

Diversos estudios han tratado de correlacionar no solo los títulos de anticuerpos, sino la posible asociación de los isotipos de IgG con la susceptibilidad/ resistencia en la leishmaniosis canina. Sin embargo, no se ha podido establecer una clara relación, al contrario de lo que ocurre en el modelo murino donde la resistencia se asocia a las IgG2a con el desarrollo de una respuesta Th1 y la susceptibilidad a las IgG1 con una respuesta de tipo Th2 (Saridomichelakis, 2009).

Rodríguez-Cortés *et al.*, (2010), consideran que los niveles de IgG2 tienen un mayor valor diagnóstico que el IFI o la qPCR especialmente en el seguimiento de los tratamientos.

Si bien, en nuestro estudio no se realizó una determinación cuantitativa de las IgG2, si se observó una disminución de la intensidad del reconocimiento de las bandas para esta inmunoglobulina.

Aunque la mayor parte de los estudios que utilizan el western-blot para el análisis de la respuesta inmune en la leishmaniosis canina utilizan como antígenos, el extracto bruto de promastigotes, no existe un criterio en cuanto a la cepa de *Leishmania* a partir de la

que se prepara (Saridomichelakis, 2009). En nuestro estudio se emplearon los antígenos preparados a partir de dos cepas que habían presentado diferente comportamiento en cuanto a su virulencia en un modelo de leishmaniosis visceral en hámster, BCN83 y BCN150 (cepa más virulenta). Entre los dos tipos de antígenos empleados el que parecía ser más homogéneo en cuanto al reconocimiento antigénico entre los diferentes animales fue BCN150.

### Eficacia y efectos adversos de la formulación de anfotericina b poliagregada

La mayoría de los tratamientos aplicados emplean pautas posológicas muy prolongadas, de alrededor 2 meses, con el fin de reducir la toxicidad de los fármacos (Solano-Gallego *et al.*, 2008). En la tabla 20 se resumen los tratamientos más frecuentes con el tipo de toxicidad que producen, así como la duración de los tratamientos más habituales. En muchas ocasiones la administración del fármaco debe realizarse cada 12 h o una vez al día, lo que resulta “engorroso” para el dueño del animal, y supone en muchas ocasiones que se abandone el tratamiento antes de completarlo, lo que puede facilitar la aparición de resistencias.

Tabla 20. Tratamientos farmacológicos en la LCan y efectos adversos más frecuentes (Reguera *et al.*, 2016)

Tratamiento farmacológico	Vía y dosis	Frecuencia	Duración	Efectos adversos frecuentes	Referencia
Antimoniato de meglumina	100 mg/kg iv, sc	8–24 h	3-4 sem	Nefrotoxicidad	Berman, 1988
Estibogluconato sódico	50 mg/kg iv, sc	24 h	3-4 sem	Nefrotoxicidad	Balaña-Fauce <i>et al.</i> , 1998
Miltefosina	2 mg/kg po	24 h	4 sem	Desordenes digestivos	Mateo <i>et al.</i> , 2009; Andrade <i>et al.</i> , 2011

<b>Anfotericina B deoxicolato</b>	0,5 mg/kg iv	Dos veces/ semana	8 sem	Nefrotoxicidad	Oliva <i>et al.</i> , 1995
<b>Antimoniato de meglumina +alopurinol</b>	100 mg/kg sc; 10 mg/kg po	24 h	2 meses- 1 año	Nefrotoxicidad + Urolitiasis	Koutinas <i>et al.</i> , 2001
<b>Miltefosina+ alopurinol</b>	2 mg/kg po; 10 mg/kg po	24 h	1 mes- 1 año	Desordenes digestivos	Miró <i>et al.</i> , 2009
<b>Alopurinol</b>	20 mg/kg po	24 h	Toda la vida	Urolitiasis	Saridomichelakis <i>et al.</i> , 2005
<b>Paromomicina</b>	15 to 20 mg/kg im	24 h	3 sem	Nefrotoxicidad	Poli <i>et al.</i> , 1994
<b>Domperidona</b>	0.5 mg/kg po	24 h	4 sem	Desordenes digestivos+ galactogogo	Sabaté <i>et al.</i> 2014

El tratamiento clásico en la leishmaniosis se ha realizado con los derivados antimoniales. Estos presentan un modelo farmacocinético de tipo tricompartmental. Tienen una rápida absorción desde el punto de la inoculación, con una semivida de 2 horas, y posterior aclaramiento urinario. El efecto de los antimoniales depende de la concentración alcanzada en bazo, hígado y médula ósea, por lo que es necesario una elevada biodisponibilidad y volumen de distribución, y para mantener una concentración terapéutica efectiva es necesaria una administración repetida, una vez al día durante al menos 30 días (Valladares *et al.*, 1998). Por otro lado, existe disparidad de resultados en cuanto a los efectos adversos y la aparición de recidivas (Valladares *et al.*, 1998; Noli & Auxilia, 2005; Manna *et al.*, 2015).

En los últimos años, en los países de la Cuenca Mediterránea, los antimoniales se han sustituido por la miltefosina. En su farmacocinética, tras su administración por vía oral, presenta una lenta absorción y una elevada biodisponibilidad (94%), su semivida es de 159 h y se acumula en riñón, mucosa intestinal, hígado y bazo (Sindermann & Engel, 2006). No presenta nefrotoxicidad, pero si son frecuentes las manifestaciones intestinales (Mateo *et al.*, 2009).

En el caso del alopurinol se han descrito náuseas, vómitos, diarreas, elevación de las enzimas hepáticas y de la fosfatasa alcalina (Motriz *et al.*, 1998).

La anfotericina en forma de deoxicolato se ha usado de forma muy limitada en la práctica clínica veterinaria, por su nefrotoxicidad y por su difícil administración (Reguera *et al.*, 2016).

Está descrito que la anfotericina B elimina el parásito (Miró *et al.*, 2005), mientras que los antimoniales consiguen la remisión clínica pero no la cura parasitológica, con lo cual es frecuente la aparición de recidivas (Ikeda-García *et al.*, 2007), sin embargo, la OMS ha instado a reducir el uso de la anfotericina B en el ámbito veterinario en las zonas endémicas de leishmaniosis por su toxicidad y para evitar la aparición de resistencias que puedan afectar al tratamiento de la leishmaniosis en humanos, aunque si sería recomendable su uso en zonas no endémicas con casos esporádicos de LCan (Best *et al.*, 2014). A pesar de esto, no se han descrito hasta el momento resistencias a la anfotericina y difícilmente van a aparecer dado su mecanismo de acción.

En nuestro estudio se pretendía evaluar la eficacia y la tolerabilidad de un fármaco de liberación sostenida, lo que implicaría reducir el número de dosis a administrar. En el apartado de farmacocinética habíamos comprobado que la formulación de anfotericina como poliagregado libre presentaba ventajas sobre la microencapsulada, no solo desde el punto de vista tecnológico, sino que además era mejor tolerada, incluso en animales enfermos y además no producía sensibilización alérgica.

En el estudio de Hernández *et al.*, (2015b) en el que empleaban un modelo de leishmaniosis canina experimental para la valoración de la eficacia del tratamiento con anfotericina B polioagregada a una dosis de 5 mg/kg de peso, observaron durante la administración del tratamiento hipotensión, diarrea, dolor abdominal, pérdida de apetito y de peso, fiebre y astenia. En nuestro estudio solo uno de los animales mostró alteraciones de carácter digestivo tras el tratamiento. A diferencia del estudio de Hernández *et al.*, (2015b) no utilizamos sedantes o anestésicos ya que parecían interferir en la farmacocinética de la anfotericina, tal como se indicó en el capítulo I.

Además, en nuestro estudio conseguimos mejoría de los síntomas clínicos y reducción de los títulos de anticuerpos de la mayoría de los animales tratados.

Por tanto la formulación de anfotericina B poliagregada se puede considerar inocua si se utiliza en una pauta de tratamiento adecuada. Es decir, ha demostrado tener un buen índice terapéutico.

## **CONCLUSIONES**

---



1. Con la formulación poliagregada, aunque las concentraciones plasmáticas no son tan elevadas como las obtenidas en el AmBisome<sup>®</sup>, se consigue un balance beneficio/riesgo favorable, ya que permite administrar dosis de hasta 10 mg/kg sin que se observen efectos adversos agudos en los Beagles y además se mantienen en el organismo concentraciones eficaces durante periodos de hasta 15 días lo que facilita mantener un régimen de administración más cómodo y no es necesaria una administración diaria de dosis bajas como en el caso de la Fungizona<sup>®</sup>, que por otro lado es mucho más nefrotóxica.
2. Respecto a la formulación poliagregada encapsulada en microsferas de albúmina, aunque parece que permite vectorizar mejor la anfotericina B ya que tiene menor riesgo de interacciones con aquellos fármacos que también se unen a proteínas plasmáticas; muestra un balance beneficio/riesgo menor que la formulación poliagregada, ya que puede aparecer un fenómeno de sensibilización alérgica a la albúmina humana. Por ello se debería intentar preparar las microsferas utilizando albúmina de perro para disminuir así el riesgo de posibles reacciones anafilácticas.
3. Con la administración de tres dosis de 5 mg/kg cada quince días de anfotericina B poliagregada se mantienen concentraciones eficaces en el organismo siendo ésta la pauta elegida para comenzar los estudios de eficacia en perros naturalmente infectados. A modo de comparación se probó, además, una dosis de 4 mg/kg, con el mismo intervalo de administración.

4. Ambas dosis (4 y 5 mg/Kg en pauta triple) consiguen la reducción del 38 y 39% de los síntomas, respectivamente, siendo las lesiones cutáneas las que mejoraron en mayor grado. Sin embargo, no se encuentran diferencias significativas en la remisión de los síntomas antes y después del tratamiento en ninguno de los dos regímenes, probablemente debido al estadio tan avanzado de la enfermedad de los animales a tratar.
5. La seroconversión de la titulación de los niveles de anticuerpos con posterioridad al tratamiento fue estadísticamente significativa con la dosis de 5 mg/kg a los 90 días, siendo indicativo de eficacia terapéutica.
6. La nueva formulación de anfotericina B poliagregada permite la administración de dosis elevadas de este compuesto sin que aparezca toxicidad, siempre y cuando las dosis se administren de forma espaciada. Es por tanto, una formulación sencilla de preparar, coste-efectiva, fácilmente escalable a la hora de llevar a cabo su producción industrial y por lo tanto de aplicación en el ámbito veterinario.

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



## A

**Abranches P, Santos-Gomes G, Rachamim N, Campino L, Schnur LF, Jaffe CL.** An experimental model for canine visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 1991; 13 (5): 537-550.

**Adedoyin A, Swenson CE, Bolcsak LE, Hellmann A, Radowska D, Horwith G, Janoff AS, Branch RA.** A pharmacokinetic study of amphotericin B lipid complex injection (Abelcet) in patients with definite or probable systemic fungal infections. *Antimicrob Agents Chemother.* 2000; 44(10): 2900-2902.

**AEMPS.** Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. 2013.

Ficha técnica del Abelcet. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=60945&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf> [Fecha de acceso: 26/03/2013].

**AEMPS.** Agencia Española de Medicamentos y Productos Sanitarios. 2013.

Ficha técnica de la Fungizona. Disponible en: <http://www.aemps.gob.es/cima/especialidad.do?metodo=verFichaWordPdf&codigo=46773&formato=pdf&formulario=FICHAS&file=ficha.pdf>. [Fecha de acceso: 26/03/2013].

**Aisa MJ, Castillejo S, Gallego M, Fisa R, Riera MC, de Colmenares M, Torras S, Roura X, Sentis J, Portus M.** Diagnostic potential of Western blot analysis of sera from dogs with leishmaniasis in endemic areas and significance of the pattern. *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58(2): 154-159.

**Alcolea PJ, Alonso A, Larraga V.** Rationale for selection of developmentally regulated genes as vaccine candidates against *Leishmania infantum* infection. *Vaccine.* 2016; 34(46): 5474-5478.

**Al-Quadeib BT, Radwan MA, Siller L, Horrocks B, Wright MC.** Stealth Amphotericin B nanoparticles for oral drug delivery: In vitro optimization. *Saudi Pharm J.* 2015; 23(3): 290-302.

**Alten B, Maia C, Afonso MO, Campino L, Jiménez M, González E, Molina R, Bañuls AL, Prudhomme J, Vergnes B, Toty C, Cassan C, Rahola N, Thierry M, Sereno D, Bongiorno G, Bianchi R, Houry C, Tsigotakis N, Dokianakis E, Antoniou M, Christodoulou V, Mazeris A, Karakus M, Ozbel Y, Arserim SK, Erisoz Kasap O, Gunay F, Oguz G, Kaynas S, Tsertsvadze N, Tskhvaradze L, Giorgobiani E, Gramiccia M, Volf P, Gradoni L.** Seasonal dynamics of Phlebotomine sand fly Species proven vectors of Mediterranean Leishmaniasis caused by *Leishmania infantum*. *PLoS Negl Trop Dis.* 2016; 10(2):e0004458.

**Almeida MA, Jesus EE, Sousa-Atta ML, Alves LC, Berne ME, Atta AM.** Clinical and serological aspects of visceral leishmaniasis in northeast Brazilian dogs naturally infected with *Leishmania chagasi*. *Vet Parasitol.* 2005; 127(3-4): 227-232.

**Alvar J, Molina R, San Andrés M, Tesouro M, Nieto J, Vitutia M, González F, San Andrés MD, Boggio J, Rodriguez F, et al.** Canine leishmaniasis: clinical, parasitological and entomological follow-up after chemotherapy. *Ann Trop Med Parasitol.* 1994; 88(4):371-8.

**Alvar J, Cañavate C, Gutiérrez-Solar B, Jiménez M, Laguna F, López-Vélez R, Molina R, Moreno J.** *Leishmania* and human immunodeficiency virus coinfection: the first 10 years. *Clin Microbiol Rev.* 1997; 10(2): 298-319.

**Alvar J.** Las leishmaniasis: de la biología al control. 2001. Lab. Intervet S. A. 2ed. Gráficas Varona. Salamanca.

**Alvar J, Cañavate C, Molina R, Moreno J, Nieto J.** Canine leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 2004; 57:1-88.

**Alvar J, Yactayo S, Bern C.** Leishmaniasis and poverty. *Trends Parasitol.* 2006; 22(12):552-557.

**Amela C, Suarez B, Isidoro B, Sierra MJ, Santos S & Simón F.** Evaluación del riesgo de transmisión de *Leishmania infantum*. España 2012.

<http://www.msssi.gob.es/profesionales/saludPublica/ccayes/analisisituacion/doc/leishmania.pdf>

**Andrade HM, Toledo VP, Pinheiro MB, Guimarães TM, Oliveira NC, Castro JA, Silva RN, Amorim AC, Brandão RM, Yoko M, Silva AS, Dumont K, Ribeiro ML Jr, Bartchewsky W, Monte SJ.** Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Vet Parasitol.* 2011; 181(2-4): 83-90.

**Antoniou M, Haralambous C, Mazeris A, Pratlong F, Dedet JP, Soteriadou K.** *Leishmania donovani* leishmaniasis in Cyprus. *Lancet Infect Dis.* 2008; 8(1): 6-7.

**Aramwit P, Yu BG, Lavasanifar A, Samuel J, Kwon GS.** The effect of serum albumin on the aggregation state and toxicity of amphotericin B. *J Pharm Sci.* 2000; 89(12):1589-1593.

**Arboix M & Valladares JE.** Terapéutica de la leishmaniosis canina. *Canis et Felis,* 1997; 29: 65-81.

**Ashford RW.** The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. *Int J Parasitol.* 2000; 30(12-13): 1269-1281.

**Ashutosh, Sundar S, Goyal N.** Molecular mechanisms of antimony resistance in *Leishmania*. *J Med Microbiol.* 2007; 56 (Pt 2):143-53.

**Asher I.** *Analytical Profiles of Drug Substances Vol. 6.* 1977, London: Academic Press 1-39.

**Athanasiou LV, Saridomichelakis MN, Kontos VI, Spanakos G, Rallis TS.** Treatment of canine leishmaniosis with aminosidine at an optimized dosage regimen: a pilot open clinical trial. *Vet Parasitol.* 2013; 192(1-3): 91-97.

**Ayestarán A, López RM, Montoro JB, Estíbalz A, Pou L, Julià A, López A, Pascual B.** Pharmacokinetics of conventional formulation versus fat emulsion formulation of amphotericin B in a group of patients with neutropenia. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(3): 609-612.

## B

**Balaña-Fouce R, Reguera RM, Cubría JC, Ordóñez D.** The pharmacology of leishmaniasis. *Gen Pharmacol.* 1998; 30(4): 435-443.

**Balaña-Fouce R, Calvo-Álvarez E, Álvarez-Velilla R, Prada CF, Pérez-Pertejo Y, Reguera RM.** Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. *Mol Biochem Parasitol.* 2012; 181(2): 85-93.

**Baleeiro CO, Paranhos-Silva M, dos Santos JC, Oliveira GG, Nascimento EG, de Carvalho LP, dos-Santos WL.** Montenegro's skin reactions and antibodies against different *Leishmania* species in dogs from a visceral leishmaniosis endemic area. *Vet Parasitol.* 2006; 139(1-3): 21-28.

**Bañuls AL, Hide M, Prugnolle F.** *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 2007; 64:1-109.

**Baneth G, Shaw SE.** Chemotherapy of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2002; 106(4):315-324.

**Baneth G, Koutinas AF, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Ferrer L.** Canine leishmaniosis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: Part one. *Trends Parasitol.* 2008; 24: 324–330.

**Barratt G & Legrand P.** Comparison of the efficacy and pharmacology of formulations of amphotericin B used in treatment of leishmaniasis. *Curr Opin Infect Dis.* 2005; 18(6): 527-30.

**Barbieri CL.** Immunology of canine leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2006; 28: 329-337.

**Bates PA & Rogers ME.** New insights into the developmental biology and transmission mechanisms of *Leishmania*. *Curr Mol Med.* 2004; 4(6): 601-609.

**Barwicz J, Christian S, Gruda I.** Effects of the aggregation state of amphotericin B on its toxicity to mice. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(10):2310-2315.

**Barwicz J, Gruszecki W & Gruda I.** Spontaneous organization of amphotericin B in aqueous medium. *J Colloid Interface Sci* , 1993; 158: 71-76.

**Barwicz J, Tancredi P.** The effect of aggregation state of amphotericin-B on its interactions with cholesterol- or ergosterol-containing phosphatidylcholine monolayers. *Chem Phys Lipids.* 1997; 85(2):145-155.

**Bekersky I, Boswell GW, Hiles R, Fielding RM, Buell D, Walsh TJ.** Safety and toxicokinetics of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) in beagle dogs. *Pharm Res.* 1999; 16(11):1694-1701.

**Bekersky I, Fielding RM, Dressler DE, Lee JW, Buell DN, Walsh TJ.** Plasma protein binding of amphotericin B and pharmacokinetics of bound versus unbound amphotericin B after administration of intravenous liposomal amphotericin B (AmBisome) and amphotericin B deoxycholate. *Antimicrob Agents Chemother.* 2002; 46(3):834-840.

**Bellocchio S, Gaziano R, Bozza S, Rossi G, Montagnoli C, Perruccio K, Calvitti M, Pitzurra L, Romani L.** Liposomal amphotericin B activates antifungal resistance with reduced toxicity by diverting Toll-like receptor signalling from TLR-2 to TLR-4. *J Antimicrob Chemother.* 2005; 55(2): 214-222.

**Bellmann R.** Clinical pharmacokinetics of systemically administered antimycotics. *Curr Clin Pharmacol.* 2007; 2(1):37-58.

**Berman JD.** Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy and future strategies. *Rev Infect Dis.* 1988; 10: 560–586.

**Berry CC & Curtis ASG.** Functionalisation of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. *J Phys D Appl Phys.* 2003; 36:198-206.

**Best MP, Ash A, Bergfeld J, Barrett J.** The diagnosis and management of a case of leishmaniosis in a dog imported to Australia. *Vet Parasitol.* 2014; 202(3-4):292-295.

**Boceta C, Alonso C, Jiménez-Ruiz A.** Leucine rich repeats are the main epitopes in *Leishmania infantum* PSA during canine and human visceral leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 2000; 22(2):55-62.

**Bolard J, Legrand P, Heitz F, Cybulska B.** One-sided action of amphotericin B on cholesterol-containing membranes is determined by its self-association in the medium. *Biochemistry.* 1991; 30(23):5707-5715.

**Bourdoiseau G, Bonnefont C, Magnol JP, Saint-André I, Chabanne L.** Lymphocyte subset abnormalities in canine leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997; 56(3-4): 345-51.

**Brajtburg J & Bolard J.** Carrier effects on biological activity of Amphotericin B. *Clin Microbiol Rev.* 1996; 9: 512-531.

**Brandonisio O, Panunzio M, Faliero SM, Ceci L, Fasanella A, Puccini V.** Evaluation of polymorphonuclear cell and monocyte functions in *Leishmania infantum*-infected dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996; 53(1-2):95-103.

## C

**Carcelén J, Iniesta V, Fernández-Cotrina J, Serrano F, Parejo JC, Corraliza I, Gallardo-Soler A, Marañón F, Soto M, Alonso C, Gómez-Nieto C.** The chimerical multi-component Q protein from *Leishmania* in the absence of adjuvant protects dogs against an experimental *Leishmania infantum* infection. *Vaccine.* 2009; 27(43): 5964-5973.

**Cardoso L, Neto F, Sousa JC, Rodrigues M, Cabral M.** Use of a leishmanin skin test in the detection of canine *Leishmania*-specific cellular immunity. *Vet Parasitol.* 1998; 79(3): 213-20.

**Cardoso L, Rodrigues M, Santos H, Schoone GJ, Carreta P, Varejão E, van Benthem B, Afonso MO, Alves-Pires C, Semião-Santos SJ, Rodrigues J, Schallig HD.** Sero-epidemiological study of canine *Leishmania spp.* infection in the municipality of Alijó (Alto Douro, Portugal). *Vet Parasitol.* 2004; 121(1-2): 21-32.

**Cardoso L, Schallig HD, Cordeiro-da-Silva A, Cabral M, Alunda JM, Rodrigues M.** Anti-*Leishmania* humoral and cellular immune responses in naturally infected symptomatic and asymptomatic dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007; 117(1-2): 35-41.

**Carnero R.** Coste-efectividad del tratamiento antifúngico con AmBisome (anfotericina B liposómica). *Rev Esp Econ Salud,* 2005. 4(3): 172-177.

**Carrera L, Fermín ML, Tesouro M, García P, Rollán E, González JL, Méndez S, Cuquerella M, Alunda JM.** Antibody response in dogs experimentally infected with *L. infantum*: Infection course antigen markers. *Exp. Parasitol.* 1996; 82: 139-146.

**Carrillo E, Ahmed S, Goldsmith-Pestana K, Nieto J, Osorio Y, Travi B, Moreno J, McMahon-Pratt D.** Immunogenicity of the P-8 amastigote antigen in the experimental model of canine visceral leishmaniasis. *Vaccine,* 2007; 25(8):1534-1543.

**Carstensen J & Rhodes CT,** eds. *Drug stability: principles and practices.* 2000, Marcel Dekker: New York.

**Carter KC, Dolan TF, Alexander J, Baillie AJ, McColgan C.** Visceral leishmaniasis: drug carrier system characteristics and the ability to clear parasites from the liver, spleen and bone marrow in *Leishmania donovani* infected BALB/c mice. *J Pharm Pharmacol.* 1989; 41(2):87-91.

**Cavaliero T, Arnold P, Mathis A, Glaus T, Hofmann-Lehmann R, Deplazes P.** Clinical, serologic, and parasitologic follow-up after long-term allopurinol therapy of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *J Vet Intern Med.* 1999; 13: 330–334.

**Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J, Boelaert M.** Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol.* 2007; 5(11): 873-82.

**Chatzis MK, Leontides L, Athanasiou LV, Papadopoulos E, Kasabalis D, Mylonakis M, Rallis T, Koutinas AF, Andreadou M, Ikononopoulos J, Saridomichelakis MN.** Evaluation of indirect immunofluorescence antibody test and enzyme-linked immunosorbent assay for the diagnosis of infection by *Leishmania infantum* in clinically normal and sick cats. *Exp Parasitol.* 2014; 147:54-59.

**Chávez-Fumagalli MA, Ribeiro TG, Castilho RO, Fernandes SO, Cardoso VN, Coelho CS, Mendonça DV, Soto M, Tavares CA, Faraco AA, Coelho EA.** New delivery systems for

amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2015; 48 (3):235-242.

**Chávez-Fumagalli MA, Schneider MS, Lage DP, Machado-de-Ávila RA, Coelho EA.** An *in silico* functional annotation and screening of potential drug targets derived from *Leishmania* spp. hypothetical proteins identified by immunoproteomics. *Exp Parasitol.* 2017. S0014-4894(16)30302-2.

**Chawla B, Jhingran A, Panigrahi A, Stuart KD, Madhubala R.** Paromomycin affects translation and vesicle-mediated trafficking as revealed by proteomics of paromomycin - susceptible -resistant *Leishmania donovani*. *PLoS One.* 2011; 6(10):e26660.

**Choi JH, Kwon EY, Park CM, Choi SM, Lee DG, Yoo JH, Shin WS, Stevens DA.** Immunomodulatory effects of antifungal agents on the response of human monocytic cells to *Aspergillus fumigatus* conidia. *Med Mycol.* 2010; 48(5):704-709.

**Choi CH, Zuckerman JE, Webster P, Davis ME.** Targeting kidney mesangium by nanoparticles of defined size. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2011; 108(16):6656-6661.

**Chonn A, Semple SC, Cullis PR.** Separation of large unilamellar liposomes from blood components by a spin column procedure: towards identifying plasma proteins which mediate liposome clearance in vivo. *Biochim Biophys Acta.* 1991; 1070(1):215-222.

**Chunge CN, Owate J, Pamba HO, Donno L.** Treatment of visceral leishmaniasis in Kenya by aminosidine alone or combined with sodium stibogluconate. *Trans R Soc Trop Med Hyg-* 1990; 84: 221–225.

**Ciaramella P, Oliva G, Luna RD, Gradoni L, Ambrosio R, Cortese L, Scalone A, Persechino A.** A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*. *Vet Rec.* 1997; 141: 539–543.

**Cortadellas O.** Initial and long-term efficacy of a lipid emulsion of anphotericin B desoxycholate in the managment of canine leishmaniasis. *J Vet Intern Med.* 2003; 17: 808-812.

**Cortes S, Vaz Y, Neves R, Maia C, Cardoso L, Campino L.** Risk factors for canine leishmaniasis in an endemic Mediterranean region. *Vet Parasitol.* 2012; 189 (2-4):189-196.

**Costa FA, Goto H, Saldanha LC, Silva SM, Sinhorini IL, Silva TC, Guerra JL.** Histopathologic patterns of nephropathy in naturally acquired canine visceral leishmaniasis. *Vet. Pathol.* 2003; 40: 677–684.

**Costa DJ, Carvalho RM, Abbehusen M, Teixeira C, Pitombo M, Trigo J, Nascimento F, Amorim L, Abreu-Silva AL, do Socorro Pires Cruz M, Miranda JC, Fukutani K, de Oliveira CI, Barral A, Barral-Netto M, Brodskyn C.** Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as a model to study Canine Visceral Leishmaniasis. *PLoS One.* 2013; 8(4):e60535.

**Coura-Vital W, Marques MJ, Giunchetti RC, Teixeira-Carvalho A, Moreira ND, Vitoriano-Souza J, Vieira PM, Carneiro CM, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA, Carneiro M, Reis AB.** Humoral and cellular immune responses in dogs with inapparent natural *Leishmania infantum* infection. *Vet J.* 2011; 190(2):e43-7.

**Croft SL, Snowdon D, Yardley V.** The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *T.brucei*. *J Antimicrob Chemoth.* 1996; 36(6): 1041-1047.

**Croft SL & Yardley V.** Chemotherapy of leishmaniosis. *Curr Pharm Des.* 2002; 8(4): 319-42.

**Croft SL & Coombs GH.** Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search novel drugs. *Trends Parasitol.* 2003; 19: 502–508.

**Croft SL, Olliaro P.** Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect.* 2011; 17(10):1478-83.

## D

**Daneshmend TK, Warnock DW.** Clinical pharmacokinetics of systemic antifungal drugs. *Clin Pharmacokinet.* 1983; (1):17-42.

**Dantas-Torres F, Baneth G, Miró G, Cardoso L, Oliva G, Solano-Gallego L, Bourdeau P, Otranto D.** Further thoughts on "Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector". *Vet Parasitol.* 2014; 204(3-4):443-444.

**Darole PS, Hegde DD, Nair HA.** Formulation and evaluation of microemulsion based delivery system for amphotericin B. *AAPS PharmSciTech.* 2008; 9(1):122-128.

**Davis SS.** Biomedical applications of nanotechnology--implications for drug targeting and gene therapy. *Trends Biotechnol.* 1997; 15(6):217-224.

**Day MJ.** Immunoglobulin G subclass distribution in canine leishmaniosis: a review and analysis of pitfalls in interpretation. *Vet Parasitol.* 2007; 147(1-2):2-8.

**De Freitas JC, Lopes-Neto BE, de Abreu CR, Coura-Vital W, Braga SL, Reis AB, Nunes-Pinheiro DC.** Profile of anti-*Leishmania* antibodies related to clinical picture in canine visceral leishmaniasis. *Res Vet Sci.* 2012; 93(2):705-9.

**De Lima H, Rodríguez N, Barrios MA, Avila A, Cañizales I, Gutiérrez S.** Isolation and molecular identification of *Leishmania chagasi* from a bat (*Carollia perspicillata*) in northeastern Venezuela. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2008; 103(4):412-414.

**De Moraes RC, Gonçalves Sda C, Costa PL, da Silva KG, da Silva FJ, Silva RP, de Brito ME, Brandão-Filho SP, Dantas-Torres F, de Paiva-Cavalcanti M.** Detection of *Leishmania infantum* in animals and their ectoparasites by conventional PCR and real time PCR. *Exp Appl Acarol.* 2013; 59(4):473-481.

**Dea Ayuela MA, Rama-Íñiguez S, Sánchez-Brunete JA, Torrado-Durán JJ, Alunda JM & Bolás-Fenández F.** Anti-leishmanial activity of an new formulation of amphotericin B. *Trop Med Int Health.* 2004; 9 (9): 981-990.

**Deplazes P, Arnold P, Skaggs J, Gessler M.** Parasitological and immunological progress during and after chemotherapy of leishmaniosis in dogs. *Schweizer Archiv fur Tierheilkunde.* 1992; 134: 85-93.

**Deplazes P, Smith NC, Arnold P, Lutz H, Eckert J.** Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Parasite Immunol.* 1995; 17(9): 451-458.

**Denerolle P & Bourdoiseau G.** Combination allopurinol and antimony treatment versus antimony alone and allopurinol alone in the treatment of canine leishmaniasis (96 cases). *J Vet Intern Med.* 1999; 13: 413–415.

**Dietz FK, Ramsey JC, Watanabe PG.** Relevance of experimental studies to human risk. *Environ Health Perspect.* 1983; 52: 9-14.

**Dougall AM, Alexander B, Holt DC, Harris T, Sultan AH, Bates PA, Rose K, Walton SF.** Evidence incriminating midges (Diptera: Ceratopogonidae) as potential vectors of *Leishmania* in Australia. *Int J Parasitol.* 2011; 41(5):571-579.

Dujardin JC, Campino L, Cañavate C, Dedet JP, Gradoni L, Soteriadou K, Mazeris A, Ozbel Y, Boelaer M. Spread of Vector-borne Diseases and Neglect of Leishmaniasis, Europe. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14(7): 1013–1018.

Dupont B. Overview of the lipid formulations of amphotericin B. *J Antimicrob Chemother.* 2002; 49 Suppl 1:31-6.

## E

Egito LC, de Medeiros SR, Medeiros MG, Price JC, Egito ES. Evaluation of the relationship of the molecular aggregation state of amphotericin B in medium to its genotoxic potential. *J Pharm Sci.* 2004; 93(6):1557-1565.

Espada R, Valdespina S, Alfonso C, Rivas G, Ballesteros MP, Torrado JJ. Effect of aggregation state on the toxicity of different amphotericin B preparations. *Int J Pharm.* 2008a; 361(1-2):64-69.

Espada R, Valdespina S, Dea MA, Molero G, Ballesteros MP, Bolás F, Torrado JJ. *In vivo* distribution and therapeutic efficacy of a novel amphotericin B poly-aggregated formulation. *J Antimicrob Chemother.* 2008b; 61(5):1125-1131.

Espada R, Josa JM, Valdespina S, Dea MA, Ballesteros MP, Alunda JM, Torrado JJ. HPLC assay for determination of amphotericin B in biological samples. *Biomed Chromatogr.* 2008c; 22(4):402-407.

## F

Faraut-Gambarelli F, Pioroux R, Deniau M, Giusiano B, Marty G, Faugere B, Dumon H. *In vitro* resistance of *Leishmania infantum* to meglumine antimoniate: a study of 37 strains collected from patients with visceral leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41: 827–830.

Fernandez-Bellon H, Solano-Gallego L, Rodriguez-Cortes A, Ferrer L, Gallego M, Alberola J, Ramis A. Little evidence of seasonal variation of natural infection by *Leishmania infantum* in dogs in Spain. *Vet. Parasitol.* 2008; 155: 32–36.

Fernández-Cotrina J, Iniesta V, Belinchón-Lorenzo S, Muñoz-Madrid R, Serrano F, Parejo JC, Gómez-Gordo L, Soto M, Alonso C, Gómez-Nieto LC. Experimental model for

reproduction of canine visceral leishmaniosis by *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 2013; 192 (1-3):118-128.

**Fernández-Pérez FJ, Méndez S, de la Fuente C, Cuquerella M, Gómez MT, Alunda JM.** Value of Western blotting in the clinical follow-up of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest.* 1999; 11(2): 170-173.

**Ferreira Cdos S, Martins PS, Demicheli C, Brochu C, Ouellette M, Frézard F.** Thiol-induced reduction of antimony (V) into antimony (III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. *Biomaterials.* 2003; 16(3): 441-446.

**Ferrer L, Alisa MJ, Roura X, Portús M.** Serological diagnosis and treatment of canine leishmaniasis. *Vet. Rec.* 1995; 136: 514-516.

**Fielding RM, Smith PC, Wang LH, Porter J, Guo LS.** Comparative pharmacokinetics of amphotericin B after administration of a novel colloidal delivery system, ABCD, and a conventional formulation to rats. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(6):1208-1213.

**Fielding RM, Singer AW, Wang LH, Babbar S, Guo LS.** Relationship of pharmacokinetics and drug distribution in tissue to increased safety of amphotericin B colloidal dispersion in dogs. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(2):299-307.

**Fiese MJ.** Treatment of disseminated coccidioidomycosis with amphotericin B; report of a case. *Calif Med.* 1957; 86(2):119-20.

**Font A, Roura X, Fondevila D, Closa JM, Mascort J, Ferrer L.** Canine mucosal leishmaniasis. *J Am Anim Hosp Assoc.* 1996; 32(2): 131-137.

**Foroughi-Parvar F & Hatam G.** Vaccines for canine leishmaniasis. *Adv Prev Med.* 2014: 569193.

**Furtado TA.** Clinical results in the treatment of American leishmaniasis with oral and intravenous amphotericin. *Antibiot Annu,* 1959. 7: 631-637.

## G

**Gaboriau F, Chéron M, Leroy L, Bolard J.** Physico-chemical properties of the heat-induced 'superaggregates' of amphotericin B. *Biophys Chem.* 1997; 66(1):1-12.

**Gershkovich P, Wasan EK, Sivak O, Li R, Zhu X, Werbovets KA, Tidwell RR, Clement JG, Thornton SJ, Wasan KM.** Visceral leishmaniasis affects liver and spleen concentrations of amphotericin B following administration to mice. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(3):535-537.

**Gicheru MM, Olobo JO.** Evaluation of recombinant gp63, the major *Leishmania* surface glycoprotein, as a diagnostic molecule for leishmaniasis in vervet monkeys. *Acta Trop.* 1994; 58(3-4):345-348.

**Gómez-Ochoa P, Castillo JA, Gascón M, Zarate JJ, Alvarez F, Couto CG.** Use of domperidone in the treatment of canine visceral leishmaniasis: a clinical trial. *Vet J.* 2009; 179(2):259-263.

**Gradoni L.** The diagnosis of canine leishmaniasis. En: Killick-Kendrick R ed. *Canine Leishmaniasis: Moving towards a Solution. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International Canine Leishmaniasis Forum, 7-14. Sevilla, Spain, 2002.* Intervet International BV.

**Gradoni L.** Epidemiological surveillance of leishmaniasis in the European Union: operational and research challenges. *Euro Surveill.* 2013; 18(30):20539.

**Gramiccia M & Gradoni L.** The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. *Int J Parasitol.* 2005; 35(11-12): 1169-1180.

**Gramiccia MI, Gradoni L, Orsini S.** Decreased sensitivity to meglumine antimoniate (Glucantime) of *Leishmania infantum* isolated from dogs after several courses of drug treatment. *Ann Trop Med Parasitol.* 1992; 86: 613–620.

**Gref R, Minamitake Y, Peracchia MT, Trubetskoy V, Torchilin V, Langer R.** Biodegradable long-circulating polymeric nanospheres. *Science.* 1994; 263(5153):1600-1603.

**Guarga JL, Moreno J, Lucientes J, Gracia MJ, Peribanez MA, Castillo JA.** Evaluation of a specific immunochemotherapy for the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet Immunol Immuno.* 2002; 88 (1-2): 13-20.

## H

**Hamilton B & Bishop W.** Leishman-Donovan Bodies and Donovaniasis: Sir William Boog Leishman, 1865-1926: Charles Donovan, 1863-1951. *Br J Vener Dis.* 1959; 35(1): 8-9.

**Harrell ER & Curtis AC.** The treatment of North American blastomycosis with amphotericin B. *AMA Arch Derm.* 1957; 76(5):561-568.

**Heinemann V, Bosse D, Jehn U, Kähny B, Wachholz K, Debus A, Scholz P, Kolb HJ, Wilmanns W.** Pharmacokinetics of liposomal amphotericin B (Ambisome) in critically ill patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(6):1275-1280.

**Helhazar M, Leitão J, Duarte A, Tavares L, da Fonseca IP.** Natural infection of synanthropic rodent species *Mus musculus* and *Rattus norvegicus* by *Leishmania infantum* in Sesimbra and Sintra-Portugal. *Parasit Vectors.* 2013; 6:88.

**Hernández L, Montoya A, Checa R, Dado D, Gálvez R, Otranto D, Latrofa MS, Baneth G, Miró G.** Course of experimental infection of canine leishmaniosis: follow-up and utility of noninvasive diagnostic techniques. *Vet Parasitol.* 2015a; 207(1-2):149-155.

**Hernández L, Bolás-Fernández F, Montoya A, Checa R, Dado D, Gálvez R, Serrano DR, Torrado JJ, Otranto D, Latrofa MS, Baneth G, Miró G.** Unresponsiveness of experimental canine Leishmaniosis to a new Amphotericin B formulation. *Advances in Pharmaceutics.* 2015b; ID 160208.

**Hillaireau H, Couvreur P.** Nanocarriers' entry into the cell: relevance to drug delivery. *Cell Mol Life Sci.* 2009; 66(17):2873-96.

**Horrillo L, San Martín JV, Molina L, Madroñal E, Matía B, Castro A, García-Martínez J, Barrios A, Cabello N, Arata IG, Casas JM, Ruiz Giardin JM.** Atypical presentation in adults in the largest community outbreak of leishmaniasis in Europe (Fuenlabrada, Spain). *Clin Microbiol Infect.* 2015; 21(3):269-73.

## I

**Ikeda-García FA, Lopes RS, Marques FJ, Lima VMF, Morinishi CK, Bonello FL, Zanette MF, Perri SHV & Feitosa MM.** Clinical and parasitological evaluation of dogs naturally infected by *Leishmania (leishmania) chagasi* submitted to treatment with meglumine antimoniate. *Vet. Parasitol.* 2007; 143: 254-259.

## J

**Jhingran A, Chawla B, Saxena S, Barrett MP, Madhubala R.** Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. *Mol Biochem Parasitol*. 2009; 164(2): 111-117.

**Jiménez M, González E, Iriso A, Marco E, Alegret A, Fúster F, Molina R.** Detection of *Leishmania infantum* and identification of blood meals in *Phlebotomus perniciosus* from a focus of human leishmaniasis in Madrid, Spain. *Parasitol Res*. 2013; 112(7):2453-2459.

**Joshi PB, Kelly BL, Kamhawi S, Sacks DL, McMaster WR.** Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. *Mol Biochem Parasitol*. 2002; 120(1):33-40.

## K

**Kaye PM, Svensson M, Ato M, Maroof A, Polley R, Stager S, Zubairi S, Engwerda CR.** The immunopathology of experimental visceral leishmaniasis. *Immunol Rev*. 2004; 201:239-253.

**Kleinberg M.** What is the current and future status of conventional amphotericin B? *Int J Antimicrob Agents*. 2006; 27 Suppl 1:12-16.

**Koutinas AF, Polizopoulou ZS, Saridomichelakis MN, Argyriadis D, Fytianou A, Plevraki KG.** Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989–1996). *J Am Anim Hosp Assoc*. 1999; 35: 376–383.

**Koutinas AF, Saridomichelakis MN, Mylonakis ME, Leontides L, Polizopoulou Z, Billinis C, Argyriadis D, Diakou N, Papadopoulos O.** A randomised, blinded, placebo-controlled clinical trial with allopurinol in canine leishmaniosis. *Vet Parasitol*. 2001; 98: 247–261.

**Koutinas AF, Carlotti DN, Koutinas C, Papadogiannakis EI, Spanakos GK, Saridomichelakis MN.** Claw histopathology and parasitic load in natural cases of canine leishmaniosis associated with *Leishmania infantum*. *Vet Dermatol*. 2010; 21(6):572-577.

**Koutinas AF, Koutinas CK.** Pathologic mechanisms underlying the clinical findings in canine leishmaniasis due to *Leishmania infantum/chagasi*. *Vet Pathol*. 2014; 51:527–538.

**Kozinn PJ, Taschdjian CI, Dragutsky D, Minsky A.** Treatment of cutaneous candidiasis in infancy and childhood with nystatin and amphotericin B. *Antibiot Annu*. 1956-1957:128-134.

**Kulkarni MM, McMaster WR, Kamysz E, Kamysz W, Engman DM, McGwire BS.** The major surface-metalloprotease of the parasitic protozoan, *Leishmania*, protects against antimicrobial peptide-induced apoptotic killing. *Mol Microbiol.* 2006; 62(5):1484-1497.

**Kulkarni MM, Jones EA, McMaster WR, McGwire BS.** Fibronectin binding and proteolytic degradation by *Leishmania* and effects on macrophage activation. *Infect Immun.* 2008; 76(4):1738-1747.

**Kumar R & Engwerda C.** Vaccines to prevent leishmaniasis. *Clin Transl Immunology.* 2014; 3(3): e13.

**Kuhls K, Chicharro C, Cañavate C, Cortes S, Campino L, Haralambous C, Soteriadou K, Pralong F, Dedet JP, Mauricio I, Miles M, Schaar M, Ochsenreither S, Radtke OA, Schönian G.** Differentiation and gene flow among European populations of *Leishmania infantum* MON-1. *PLoS Negl Trop Dis.* 2008; 2(7):e261.

**Kwong D, Tees DF, Goldsmith HL.** Kinetics and locus of failure of receptor-ligand-mediated adhesion between latex spheres. II. Protein-protein bond. *Biophys J.* 1996; 71(2):1115-1122.

## L

**Lainson R & Shaw JJ.** Evolution, classification and geographical distribution. In: *The Leishmaniases in Biology and Medicine*, Vol. 1 (W. Peters and R. Killick-Kendrick, eds), pp. 1–120. 1987. London: Academic Press.

**Lainson R, Ready PD, Shaw JJ.** *Leishmania* in phlebotomid sandflies. VII. On the taxonomic status of *Leishmania peruviana*, causative agent of Peruvian 'uta', as indicated by its development in the sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1979; 206 (1164): 307-318.

**Lambing HE, Wolf BD, Hartsel SC.** Temperature effects on the aggregation state and activity of amphotericin B. *Biochim Biophys Acta.* 1993;1152(1):185-188.

**Landau L, Achilladelis B, Scriabine A.** Eds. *Pharmaceutical Innovation: Revolutionizing Human Health.* 1999, Chemical Heritage Foundation: Philadelphia, USA. pp 176-178.

**Laniado-Laborín R, Cabrales-Vargas MN.** Amphotericin B: side effects and toxicity. *Rev Iberoam Micol.* 2009; 26(4):223-227.

**Leandro C, Santos-Gomes GM, Campino L, Romão P, Cortes S, Rolão N, Gomes-Pereira S, Riça Capela MJ, Abranches P.** Cell mediated immunity and specific IgG1 and IgG2 antibody response in natural and experimental canine leishmaniosis. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 79: 273–284.

**Legrand P, Romero EA, Cohen BE, Bolard J.** Effects of aggregation and solvent on the toxicity of amphotericin B to human erythrocytes. *Antimicrob Agents Chemother.* 1992; 36(11):2518-2522.

**Lemke A, Kiderlen AF, Kayser O.** Amphotericin B. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005; 68(2):151-162.

**Liste F, Gascon M.** Allopurinol in the treatment of canine visceral leishmaniasis. *Vet. Rec.* 1995; 137: 23–24.

**Luciani A, Sconza S, Civitella C, Guglielmini C.** Evaluation of the cardiac toxicity of N-methylglucamine antimoniate in dogs with naturally occurring leishmaniasis. *Vet J.* 2013; 196 (1):119-121.

## M

**Maia C & Campino L.** Methods for diagnosis of canine leishmaniasis and immune response to infection. *Vet Parasitol.* 2008; 158: 274–287.

**Maia C, Seblova V, Sadlova J, Votypka J, Volf P.** Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. *PLoS Negl Trop Dis.* 2011; 5(6): e1181.

**Maia C, Cardoso L.** Spread of *Leishmania infantum* in Europe with dog travelling. *Vet Parasitol.* 2015; 213(1-2):2-11.

**Majumder B, Biswas R, Chattopadhyay U.** Prolactin regulates antitumor immune response through induction of tumoricidal macrophages and release of IL-12. *Int J Cancer.* 2002; 97: 493–500.

**Manandhar KD, Yadav TP, Prajapati VK, Kumar S, Rai M, Dube A, Srivastava ON, Sundar S.** Antileishmanial activity of nano-amphotericin B deoxycholate. *J Antimicrob Chemother.* 2008; 62(2):376-380.

**Mancianti F, Gramiccia M, Gradoni L, Pieri S.** Studies on canine leishmaniasis control. 1. Evolution of infection of different clinical forms of canine leishmaniasis following antimonial treatment. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1988; 82 : 566–567.

**Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, Gravino AE.** Urine sampling for realtime polymerase chain reaction based diagnosis of canine leishmaniasis. *J Vet Diagn Invest.* 2008a; 20: 64–67.

**Manna L, Reale S, Picillo E, Vitale F, Gravino AE.** Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol. *Cytokine.* 2008b; 44(2): 288-292.

**Manna L, Vitale F, Reale S, Picillo E, Neglia G, Vescio F, Gravino AE.** Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniosis. *Vet J.* 2009; 182 (3): 441-445.

**Manna L, Corso R, Galiero G, Cerrone A, Muzj P, Gravino AE.** Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. *Parasit Vectors.* 2015;8:289.

**Martín-Sánchez J, Morillas Márquez F, Sanchiz Martín MC, Acedo Sánchez C.** Isoenzymatic characterization of the etiologic agent of canine leishmaniasis in the Granada region of southern Spain. *Am J Trop Med Hyg.* 1994; 50: 758-762.

**Martín-Sánchez J, Gállego M, Barón S, Castillejo S, Morillas-Marquez F.** Pool screen PCR for estimating the prevalence of *Leishmania infantum* infection in sandflies (Diptera: Nematocera, Phlebotomidae). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2006; 100(6):527-532.

**Martínez V, Quilez J, Sánchez A, Roura X, Francino O, Altet L.** Canine leishmaniasis: the key points for qPCR result interpretation. *Parasit Vectors.* 2011; 4:57.

**Martínez-Cruz MS, Martínez Moreno A, Martínez Moreno FJ, Martínez Gómez F, Hernández Rodríguez S.** Epidemiología de la leishmaniosis canina en Córdoba. *Rev Iber Parasitol.* 1990; 50 :1-7.

**Mateo M, Maynard L, Vischer C, Bianciardi P, Miró G.** Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniosis. *Parasitol Res.* 2009; 105(1): 155-162.

**McCall LI, Zhang WW, Matlashewski G.** Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. *PLoS Pathog.* 2013; 9: e1003053.

**McGwire BS, Chang KP, Engman DM.** Migration through the extracellular matrix by the parasitic protozoan *Leishmania* is enhanced by surface metalloprotease gp63. *Infect Immun.* 2003; 71(2):1008-1010.

**Mesa-Arango AC, Scorzoni L, Zaragoza O.** It only takes one to do many jobs: Amphotericin B as antifungal and immunomodulatory drug. *Front Microbiol.* 2012; 3:286.

**Mesa-Villanueva M & Patiño P.** Receptores tipo Toll: entre el reconocimiento de lo no propio infeccioso y las señales endógenas de peligro *Inmunología*, 2006. 25(2): 115-130.

**Meunier F, Prentice HG, Ringdén O.** Liposomal amphotericin B (AmBisome): safety data from a phase II/III clinical trial. *J Antimicrob Chemother.* 1991; 28 Suppl B: 83-91.

**Miró G. & Fraile C.** Leishmaniosis canina: revisión práctica. *Consulta de difusión Veterinaria.* 1999; 7(56): 63-74.

**Miró G, Mateo M, Cruz I, Cañavate C, Nieto J, Montoya A, Galy S, Médaille C, Alvar J.** Miltefosine a new treatment for canine leishmaniosis. *Worldleish3.* 2005. (Palermo-Terrasini, Sicily, Italy), p.175.

**Miró G & Molina R.** Leishmaniosis canina: manejo clínico y situación actual en España. 2006. Ediciones Bayer Health Care.

**Miró G, Montoya A, Mateo M, Alonso A, García S, García A, Caballero MJ, Molina R.** A leishmaniosis surveillance system among stray dogs in the region of Madrid: ten years of serodiagnosis (1996-2006). *Parasitol Res.* 2007. 101(2): 253-257.

**Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Oliva G, Baneth G.** Canine leishmaniosis--new concepts and insights on an expanding zoonosis: part two. *Trends Parasitol.* 2008; 24(8): 371-377.

**Miró G, Oliva G, Cruz I, Cañavate C, Mortarino M, Vischer C, Bianciardi P.** Multicentric, controlled clinical study to evaluate effectiveness and safety of miltefosine and allopurinol for canine leishmaniosis. *Vet Dermatol.* 2009; 20(5-6): 397-404.

**Miró G, Gálvez R, Fraile C, Descalzo MA, Molina R.** Infectivity to *Phlebotomus perniciosus* of dogs naturally parasitized with *Leishmania infantum* after different treatments. *Parasit Vectors.* 2011; 4: 52.

**Miró G, Checa R, Montoya A, Hernández L, Dado D, Gálvez R.** Current situation of *Leishmania infantum* infection in shelter dogs in northern Spain. *Parasit Vectors*. 2012; 5:60.

**Miró, G.** (2013). Tratamiento y pronóstico. En: *Leishmaniosis. Una revisión actualizada* (ed. Servet), 8,151-164.

**Miró G, Rupérez C, Checa R, Gálvez R, Hernández L, García M, Canorea I, Marino V, Montoya A.** Current status of *L. infantum* infection in stray cats in the Madrid region (Spain): implications for the recent outbreak of human leishmaniosis? *Parasit Vectors*. 2014; 7:112.

**Moffat A, Jackson JV, Moss MS & Widdop B.** Eds. *Clarke's Isolation and Identification of Drugs in Pharmaceuticals, Body Fluids, and Post-Mortem Material*. 2nd ed. 1986, The Pharmaceutical Press: London.

**Molina R, Amela C, Nieto J, San-Andrés M, González F, Castillo JA, Lucientes J, Alvar J.** 1994. Infectivity of dogs naturally infected with *L.infantum* to colonized *Ph. Perniciosus*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1994; 88: 491-493.

**Molina R, Jiménez MI, Cruz I, Iriso A, Martín-Martín I, Sevillano O, Melero S, Bernal J.** The hare (*Lepus granatensis*) as potential sylvatic reservoir of *Leishmania infantum* in Spain. *Vet Parasitol*. 2012; 190(1-2):268-271.

**Moreira MAB, Luvizotto MCR, Corbett CEP, & Laurenti MD.** 2005. Evaluation of immunological and molecular methods for parasitological diagnosis of canine visceral leishmaniasis. *Worldleish3* (Palermo-Terrasini, Sicily, Italy), p.178.

**Moreno J, Nieto J, Chamizo C, González F, Blanco F, Barker DC, Alva J.** The immune response and PBMC subsets in canine visceral leishmaniasis before, and after, chemotherapy. *Vet Immunol Immunopathol*. 1999; 71(3-4): 181-195.

**Morillas F, Sánchez Rabasco F, Ocana J, Martín-Sánchez J, Ocaba-Wihelmi J, Acedo C.& Sanchiz-Marin MC.** Leishmaniosis in the focus of the Axarquía region, Malaga province, southern Spain: a survey of the human, dog and vector. *Parasitol Res*. 1996; 82(6):569-570.

**Moritz A, Steuber S, Greiner M.** Clinical follow-up examination after treatment of canine leishmaniasis. *Tokai J Exp Clin Med*. 1998; 23(6):279-283.

**Muñoz-Madrid R, Belinchón-Lorenzo S, Iniesta V, Fernández-Cotrino J, Parejo JC, Serrano FJ, Monroy I, Baz V, Gómez-Luque A, Gómez-Nieto LC.** First detection of

*Leishmania infantum* kinetoplast DNA in hair of wild mammals: application of qPCR method to determine potential parasite reservoirs. *Acta Trop.* 2013; 128(3):706-9.

## N

**Nair MP, Schwartz SA.** Immunomodulatory effects of amphotericin B on cellular toxicity of normal human lymphocytes. *Cel Immunol.* 1982; 70: 287-300.

**Naucke TJ, Amelung S, Lorentz S.** First report of transmission of canine leishmaniasis through bite wounds from a naturally infected dog in Germany. *Parasit Vectors.* 2016; 9(1):256.

**Nieto CG, García-Alonso M, Requena JM, Mirón C, Soto M, Alonso C, Navarrete I.** Analysis of the humoral immune response against total and recombinant antigens of *Leishmania infantum*: correlation with disease progression in canine experimental leishmaniasis. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 67(2): 117-130.

**Noli C, Auxilia ST.** Treatment of canine Old World visceral leishmaniasis: a systematic review. *Vet Dermatol.* 2005; 16: 213–232.

**Noli C, Saridomichelakis MN.** An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* (*syn. L. chagasi*) *Vet J.* 2014; 202(3):425-435.

**Nylén S, Sacks D.** Interleukin-10 and the pathogenesis of human visceral leishmaniasis. *Trends Immunol.* 2007; 28(9):378-384.

## O

**OMS,** 2014. <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

**Olivier M, Tanner CE.** Susceptibilities of macrophage populations to infection *in vitro* by *Leishmania donovani*. *Infect Immun.* 1987; 55(2):467-471.

**Olson JA, Adler-Moore JP, Jensen GM, Schwartz J, Dignani MC, Proffitt RT.** Comparison of the physicochemical, antifungal, and toxic properties of two liposomal amphotericin B products. *Antimicrob Agents Chemother.* 2008; 52(1):259-268.

**Opperdoes FR, Michels PA.** The glycosomes of the Kinetoplastida. *Biochimie.* 1993; 75(3-4):231-234.

**Ordeix L, Solano-Gallego L, Fondevila D, Ferrer L, Fondati A.** Papular dermatitis due to *Leishmania spp.* infection in dogs with parasite-specific cellular immune responses. *Vet Dermatol.* 2005; 16: 187–191.

**Ordeix L, Fondati A.** Manifestaciones clínicas cutáneas. In: Solano-Gallego L, editor. *Leishmaniosis canina. Una revisión actualizada.* Zaragoza: Servet; 2013. pp. 69–95.

**Ordóñez-Gutiérrez L, Espada-Fernández R, Dea-Ayuela MA, Torrado JJ, Bolás-Fernandez F, Alunda JM.** *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. *Int J Antimicrob Agents.* 2007; 30(4):325-329.

**Organización Panamericana de la Salud.** Informe Final de la Reunión de Expertos OPS/OMS sobre Leishmaniosis Visceral en las Américas. Río de Janeiro, PANAFTOSA, 2006.

**Organización Mundial de la Salud (OMS)**

<http://www.who.int/zoonoses/diseases/Leishmaniosis/en/>; [www.who.int/tdr/diseases/default.htm](http://www.who.int/tdr/diseases/default.htm)

**Ostrosky-Zeichner L, Marr KA, Rex JH, Cohen SH.** Amphotericin B: time for a new "gold standard". *Clin Infect Dis.* 2003;37(3):415-425.

**Owens DE 3rd, Peppas NA.** Oponization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int J Pharm.* 2006; 307(1):93-102.

## P

**Paltrinieri S, Solano-Gallego L, Fondati A, Lubas G, Gradoni L, Castagnaro M, Crotti A, Maroli M, Oliva G, Roura X, Zatelli A, Zini E.** Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs. *J Am Vet Med Assoc.* 2010; 236(11):1184-91.

**Papadogiannakis E, Spanakos G, Kontos V, Menounos PG, Tegos N, Vakalis N.** Molecular detection of *Leishmania infantum* in wild rodents (*Rattus norvegicus*) in Greece. *Zoonoses Public Health.* 2010; 57 (7-8):e23-5.

**Paranhos-Silva M, Oliveira GG, Reis EA, de Menezes RM, Fernandes O, Sherlock I, Gomes RB, Pontes-de-Carvalho LC, dos-Santos WL.** A follow-up of Beagle dogs intradermally infected with *Leishmania chagasi* in the presence or absence of sand fly saliva. *Vet Parasitol.* 2003; 114(2):97-111.

**Pasa S, Ozensoy Toz S, Voyvoda H, & Ozbel Y.** Clinical and serological follow-up in dogs with visceral leishmaniosis treated with allopurinol and sodium stibogluconate. *Vet Parasitol.* 2005; 128: 243-249.

**Paz GF, Reis IA, Avelar DM, da Mata Ferreira EC, Werneck GL.** Ectoparasites and anti-*Leishmania* antibodies: association in an observational case-control study of dogs from a Brazilian endemic area. *Prev Vet Med.* 2013; 112(1-2):156-159.

**Pennisi MG.** Leishmaniosis of companion animals in Europe: an update. *Vet Parasitol.* 2015; 208(1-2):35-47.

**Peña MT, Roura X, Davidson MG.** Ocular and periocular manifestations of leishmaniasis in dogs: 105 cases (1993-1998). *Vet Ophthalmol.* 2000; 3(1): 35-41.

**Perfect JR, Granger DL, Durack DT.** Effects of antifungal agents and gamma-interferon on macrophage cytotoxicity for fungi and tumor cells. *J Infect Dis.* 1987; 156: 316-323.

**Peters W, Molyneux DH, Killick-Kendrick R.** 1987. Morphology, ultrastructure and life cycles. *The Leishmaniases in Biology and Medicine I*, pp:121–176. Academic Press, London.

**Petit C, Yardley V, Gaboriau F, Bolard J, Croft SL.** Activity of a heat-induced reformulation of amphotericin B deoxycholate (fungizone) against *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1999; 43(2):390-392.

**Plevraki K, Koutinas AF, Kaldrymidou H, Roumpies N, Papazoglou LG, Poli A, Sozzi S, Guidi G, Bandinelli P, Mancianti F.** Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 1997; 71: 263–271.

**Poli A, Sozzi S, Guidi G, Bandinelli P, Mancianti F.** Comparison of aminosidine (paromomycin) and sodium stibogluconate for treatment of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 1997; 71(4): 263-271.

**Proverbio D, Spada E, Bagnagatti de Giorgi G, Perego R, Valena E.** Relationship between *Leishmania* IFAT titer and clinicopathological manifestations (clinical score) in dogs. *Biomed Res Int.* 2014; 2014:412808.

## Q

**Quinnell RJ, Courtenay O, Garcez L, Dye C.** The epidemiology of canine leishmaniasis: transmission rates estimated from a cohort study in Amazonian Brazil. *Parasitology.* 1997; 115 (Pt 2):143-156.

**Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw MA, Day MJ, Garcez LM, Dye C, Kaye PM.** Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2001; 183(9):1421-1424.

## R

**Rachamim N, Jaffe CL, Abranches P, Silva-Pereira MC, Schnur LF, Jacobson RL.** Serodiagnosis of canine visceral leishmaniasis in Portugal: comparison of three methods. *Ann Trop Med Parasitol.* 1991; 85(5): 503-508.

**Rama Iñiguez S, Dea-Ayuela MA, Sanchez-Brunete JA, Torrado JJ, Alunda JM, Bolas-Fernández F.** Real-time reverse transcription-PCR quantification of cytokine mRNA expression in golden Syrian hamster infected with *Leishmania infantum* and treated with a new amphotericin B formulation. *Antimicrob Agents Chemother.* 2006; 50(4): 1195-201.

**Ready PD.** Leishmaniasis emergence in Europe. *Euro Surveill.* 2010; 15(10):19505.

**Ready PD.** Managing the spread of canine leishmaniasis in Europe. *Vet Rec.* 2017; 180(2):44-46.

**Reguera RM, Morán M, Pérez-Pertejo Y, García-Estrada C, Balaña-Fouce R.** Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016; 227: 98-114.

**Reis AB, Teixeira-Carvalho A, Vale AM, Marques MJ, Giunchetti RC, Mayrink W, Guerra LL, Andrade RA, Corrêa-Oliveira R, Martins-Filho OA.** Isotype patterns of immunoglobulins: hallmarks for clinical status and tissue parasite density in Brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2006; 112(3-4):102-116.

**Rhalem A, Sahibi H, Lasri S, Jaffe CL.** Analysis of immune responses in dogs with canine visceral leishmaniasis before, and after, drug treatment. *Vet Immunol Immunopathol.* 1999; 71(1): 69-76.

**Riera C, Valladares JE, Gallego M, Aisa MJ, Castillejo S, Fisa R, Ribas N, Carrió J, Alberola J, Arboix M.** Serological and parasitological follow-up in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum* and treated with meglumine antimoniate. *Vet Parasitol.* 1999; 84: 33-47.

**Rioux JA, Lanotte G, Serres E, Pratlong F, Bastien P, Perieres J.** Taxonomy of *Leishmania*. Use of isoenzymes. Suggestions for a new classification. *Ann Parasitol Hum Comp.* 1990; 65(3): 111-125.

**Rodríguez-Cortés A, Ojeda A, López-Fuertes L, Timón M, Altet L, Solano-Gallego L, Sánchez-Robert E, Francino O, Alberola J.** A long term experimental study of canine visceral leishmaniasis. *Int J Parasitol.* 2007; 37(6): 683-693.

**Romani L, Howard DH.** Mechanisms of resistance to fungal infections. *Curr Opin Immunol.* 1995; 7(4): 517-523.

**Romero EL & Morilla MJ.** Drug delivery systems against leishmaniasis? Stilln a open question. *Expert Opin Drug Deliv.* 2008; 5(7): 805-823.

**Rossi M, Giorgi G.** Domperidone and long QT syndrome. *Curr Drug Saf.* 2010; 5(3): 257-262.

**Rougier S, Hasseine L, Delaunay P, Michel G, Marty P.** One-year clinical and parasitological follow-up of dogs treated with marbofloxacin for canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2012; 186(3-4): 245-53.

**Roura X, Sánchez A, Ferrer L.** Diagnosis of canine leishmaniasis by a polymerase chain reaction technique. *Vet Rec.* 1999; 144(10): 262-264.

**Ruiz H.** Tesis doctoral: Desarrollo y caracterización de una formulación tópica de anfotericina B con gamma-ciclodextrina. 2010, Madrid: Universidad Complutense de Madrid.

## S

**Sabaté D, Llinás J, Homedes J, Sust M, Ferrer L.** A single-centre, open-label, controlled, randomized clinical trial to assess the preventive efficacy of a domperidone-based treatment programme against clinical canine leishmaniasis in a high prevalence area. *Prev Vet Med.* 2014; 115(1-2): 56-63.

**Sacks DL, Perkins PV.** Identification of an infective stage of *Leishmania* promastigotes. *Science.* 1984; 223(4643):1417-1419.

**Sanders SW, Buchi KN, Goddard MS, Lang JK, Tolman KG.** Single-dose pharmacokinetics and tolerance of a cholesteryl sulfate complex of amphotericin B administered to healthy volunteers. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35(6):1029-1034.

**Saridomichelakis MN.** Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis: epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol.* 2009; 20(5-6): 471-489.

**Saridomichelakis MN, Koutinas AF.** Cutaneous involvement in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet Dermatol.* 2014; 25(2): 61-71, e22.

**Seifert K, Escobar P, Croft SL.** In vitro activity of anti-leishmanial drugs against *Leishmania donovani* is host cell dependent. *J Antimicrob Chemother.* 2010; 65(3):508-11.

**Shadkchan Y, Keisari Y, Segal E.** Cytokines in mice treated with amphotericin B-intralipid. *Med Mycol.* 2004; 42(2):123-128.

**Sheehan DJ, Hitchcock CA, Sibley CM.** Current and emerging azole antifungal agents. *Clin Microbiol Rev.* 1999; 12(1):40-79.

**Slama D, Haouas N, Remadi L, Mezhoud H, Babba H, Chaker E.** First detection of *Leishmania infantum* (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) in *Culicoides* spp. (Diptera: Ceratopogonidae). *Parasit Vectors.* 2014; 7:51.

**Sánchez-Brunete JA, Dea Ayuela MA, Rama-Íñiguez S, Bolás-Fenández F, Alunda JM, Raposo R, Mendez MT, Torrado-Durán JJ. & Torrado-Durán S.** Treatment of experimental visceral leishmaniasis with amphotericin B in stable albumin microspheres. *Antimicrob Agents Chemother.* 2004a; 48(9): 3246-3252.

**Sánchez-Brunete JA, Dea Ayuela MA, Rama-Íñiguez S, Alunda JM, Bolás-Fenández F, Torrado-Durán S & Torrado-Durán JJ.** Amphotericin B molecular organization as an essential factor to improve activity/toxicity ratio in the treatment of visceral leishmaniasis. *J Drug Targeting.* 2004b; 12(7): 453-460.

**Sánchez-Brunete JA, Dea Ayuela MA, Rama-Íñiguez S, Alunda JM, Bolás-Fenández F, Torrado-Durán S & Torrado-Durán JJ.** Influence of the vehicle on the properties and efficacy of microparticles containing amphotericin B. *J Drug Targeting.* 2005; 13(4): 225-233.

**Santos TT, Martins VT, Lage DP, Costa LE, Salles BC, Carvalho AM, Dias DS, Ribeiro PA, Chávez-Fumagalli MA, Machado-de-Ávila RA, Roatt BM, de Magalhães-Soares DF, Menezes-Souza D, Coelho EA, Duarte MC.** Probing the efficacy of a heterologous *Leishmania/L. Viannia braziliensis* recombinant enolase as a candidate vaccine to restrict the development of *L. infantum* in BALB/c mice. *Acta Trop.* 2017. pii: S0001-706X(16)31057-9.

**Saridomichelakis MN, Savvas I, Leondides L.** Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniasis (*Leishmania infantum*). *J Vet Intern Med.* 2006; 20: 228–233.

**Sarthou P, Primi D, Cazenave PA.** B cell triggering properties of a non-toxic derivative of amphotericin B. *J. Immunol.* 1986; 137: 2156-2161.

**Savani ES, de Almeida MF, de Oliveira Camargo MC, D'Auria SR, Silva MM, de Oliveira ML, Sacramento D.** Detection of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* in Brazilian bats. *Vet Parasitol.* 2010; 168(1-2):5-10.

**Scott JAG, Davidson RN, Moody AH, Grant HR, Felminghad D, Scott GMS, Olliaro P, Bryceson ADM.** Aminosidine (paromomycin) in the treatment of leishmaniasis imported into the United Kingdom. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 1992; 86: 617–619.

**Schettini DA, Costa Val AP, Souza LF, Demicheli C, Rocha OG, Melo MN, Michalick MS, Frézard F.** Pharmacokinetic and parasitological evaluation of the bone marrow of dogs with visceral leishmaniasis submitted to multiple dose treatment with liposome-encapsulated meglumine antimoniate. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(12):1879-1883.

**Serrano DR, Hernández L, Fleire L, González-Alvarez I, Montoya A, Ballesteros MP, Dea-Ayuela MA, Miró G, Bolás-Fernández F, Torrado JJ.** Hemolytic and pharmacokinetic studies of liposomal and particulate amphotericin B formulations. *Int J Pharm.* 2013; 447(1-2):38-46.

**Serrano DR, Lalatsa A, Dea-Ayuela MA, Bilbao-Ramos PE, Garrett NL, Moger J, Guarro J, Capilla J, Ballesteros MP, Schätzlein AG, Bolás F, Torrado JJ, Uchegbu IF.** Oral particle uptake and organ targeting drives the activity of amphotericin B nanoparticles. *Mol Pharm.* 2015; 12(2):420-431.

**Shoham S, Huang C, Chen JM, Golenbock DT, Levitz SM.** Toll-like receptor 4 mediates intracellular signaling without TNF- $\alpha$  release in response to *Cryptococcus neoformans* polysaccharide capsule. *J Immunol.* 2001; 166(7):4620-4626.

**Singh R, Kumar D, Ramesh V, Negi NS, Singh S, Salotra P.** Visceral leishmaniasis, or kala azar (KA): high incidence of refractoriness to antimony is contributed by anthroponotic transmission via post-KA dermal leishmaniasis. *J Infect Dis.* 2006; 194: 302–306.

**Slappendel RJ.** Canine Leishmaniasis. A Review based on 95 cases in the Netherlands. *Vet Quart.* 1988; 10: 1-16.

**Slappendel RJ & Teske E.** The effect of intravenous or subcutaneous administration of meglumin antimoniate (Glucantime) in dogs with leishmaniasis. A randomized clinical trial. *Vet Quart.* 1997; 19: 10-13.

**Slappendel RJ & Ferrer L.** 1998. Leishmaniasis in: *Infectious Diseases of the dog and the cat.* CE Greene (ed). WB Saunders, Philadelphia, pp.450-458.

**Sokol-Anderson ML, Brajtburg J, Medoff G.** Amphotericin B-induced oxidative damage and killing of *Candida albicans*. *J Infect Dis.* 1986; 154: 76-83.

**Solano-Gallego L, Llull J, Ramos G, Riera C, Arboix M, Alberola J, Ferrer L.** The Ibizaian hound presents a predominantly cellular immune response against natural *Leishmania* infection. *Vet Parasitol.* 2000; 90(1-2): 37-45.

**Solano-Gallego L, Morell P, Arboix M, Alberola J, Ferrer L.** Prevalence of *Leishmania infantum* infection in dogs living in an area of canine leishmaniasis endemicity using PCR on several tissues and serology. *J Clin Microbiol.* 2001; 39: 560–563.

**Solano-Gallego L & Baneth G.** Canine leishmaniosis—a challenging zoonosis. *Eur J Comp Anim Pract.* 2008; 18: 232–241.

**Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G.** Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2009; 165(1-2):1-18.

**Solano-Gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, Bourdeau P, Oliva G, Baneth G, The LeishVet Group.** LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. *Parasit Vectors.* 2011; 4:86.

**Storm G. & Crommelin D.** Liposomes: *quo vadis?* *PSTT.* 1998; 1(1): 19-31.

**Strauss-Ayali D, Jaffe CL, Burshtain O, Gonen L, Baneth G.** Polymerase chain reaction using noninvasively obtained samples, for the detection of *Leishmania infantum* DNA in dogs. *J Infect Dis.* 2004; 189(9):1729-1733.

**Sun HY, Alexander BD, Lortholary O, Dromer F, Forrest GN, Lyon GM, Somani J, Gupta KL, del Busto R, Pruett TL, Sifri CD, Limaye AP, John GT, Klintmalm GB, Pursell K, Stosor V, Morris MI, Dowdy LA, Munoz P, Kalil AC, Garcia-Diaz J, Orloff S, House AA, Houston S, Wray D, Huprikar S, Johnson LB, Humar A, Razonable RR, Husain S, Singh N.** Lipid formulations of amphotericin B significantly improve outcome in solid organ transplant recipients with central nervous system cryptococcosis. *Clin Infect Dis.* 2009; 49(11):1721-8.

**Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K, Bryceson A, Berman J.** Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med.* 2002; 347(22):1739-1746.

## T

**Tancrède P, Barwicz J, Jutras S, Gruda I.** The effect of surfactants on the aggregation state of amphotericin B. *Biochim Biophys Acta*. 1990; 1030(2): 289-295.

**Teixeira Neto RG, Giunchetti RC, Carneiro CM, Vitor RW, Coura-Vital W, Quaresma PF, Ker HG, de Melo LA, Gontijo CM, Reis AB.** Relationship of *Leishmania*-specific IgG levels and IgG avidity with parasite density and clinical signs in canine leishmaniasis. *Vet Parasitol*. 2010; 169(3-4): 248-257.

**Teixeira MC, Oliveira GG, Santos PO, Bahiense TC, da Silva VM, Rodrigues MS, Lorangeira DF, Dos-Santos WL, Pontes-de-Carvalho LC.** An experimental protocol for the establishment of dogs with long-term cellular immune reactions to *Leishmania* antigens. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2011; 106(2):182-189.

**Tesouro MA.** 1984. Aspectos clínicos y laboratoriales del diagnóstico de la leishmaniosis canina. Estudio epizootológico en la provincia de Madrid. Tesis Doctoral. Facultad de Veterinaria. UCM.

**Torrado JJ, Espada R, Ballesteros MP, Torrado-Santiago S.** Amphotericin B formulations and drug targeting. *J Pharm Sci*. 2008; 97(7): 2405-2425.

**Torres M, Bardagí M, Roura X, Zanna G, Ravera I, Ferrer L.** Long term follow-up of dogs diagnosed with leishmaniosis (clinical stage II) and treated with meglumine antimoniate and allopurinol. *Vet J*. 2011; 188(3):346-51.

**Travi BL, Osorio EY, Saldarriaga OA, Cadena H, Tabares CJ, Peniche A, Lee S, Melby PC.** Clinical, parasitologic, and immunologic evolution in dogs experimentally infected with sand fly-derived *Leishmania chagasi* promastigotes. *Am J Trop Med Hyg*. 2009; 81(6):994-1003.

**Turco SJ, Descoteaux A.** The lipophosphoglycan of *Leishmania* parasites. *Annu Rev Microbiol*. 1992; 46:65-94.

## U

**Utz JP, Louria DB, Feder N, Emmons CW, McCullough NB.** A report of clinical studies on the use of amphotericin in patients with systemic fungal diseases. *Antibiot Annu*. 1957-1958; 5:65-70.

## V

**Valladares JE, Alberola J, Esteban M, Arboix M.** Disposition of antimony after the administration of *N*-methylglucamine antimoniate to dogs. *Vet Rec.* 1996; 138: 181–183.

**Valladares JE, Riera C, Alberola J, Gallego M, Portus M, Cristofol C, Franquelo C, Arboix M.** Pharmacokinetics of meglumine antimoniate after administration of a multiple dose in dogs experimentally infected with *Leishmania infantum*. *Vet Parasitol.* 1998; 75: 33–40.

**Valladares JE, Riera C, González-Ensenyat P, Díez-Cascón A, Ramos G, Solano-Gallego L, Gállego M, Portús M, Arboix M, Alberola J.** Long term improvement in the treatment of canine leishmaniasis using an antimony liposomal formulation. *Vet Parasitol.* 2001; 97(1):15-21.

**Vandermeulen G, Rouxhet L, Arien A, Brewster ME, Pr at V.** Encapsulation of amphotericin B in poly (ethylene glycol)-block-poly(epsilon-caprolactone-co-trimethylenecarbonate) polymeric micelles. *Int J Pharm.* 2006; 309 (1-2):234-40.

**Vanneaux V, Proust V, Ch eron M, Besnard M, Corriol O, Gimenez F, Singlas E, Legrand P.** A physical and chemical stability study of amphotericin B lipid complexes (Abelcet) after dilution in dextrose 5%. *Eur J Hospital Pharmacy Sci.* 2007; 13:10–13.

**Vannier-Santos MA, Martiny, de Souza W.** Cell Biology of *Leishmania* spp.: Invading and Evading. *Curr Phar Design.* 2002; 8: 297-318.

**Vercammen F, De Deken R, Kageruka P.** First evaluation of the use of allopurinol for the treatment of canine leishmaniasis. *Vlaams Diergeneesk Tijdschr.* 1995; 64: 208–214.

**Vercammen F & DeDeken R.** Antibody kinetics during allopurinol treatment in canine leishmaniasis. *Vet Rec.* 1996; 139(11): 264.

**Vercammen F, Fernández-Pérez FJ, del Amo C, Alunda JM.** Follow up of *Leishmania infantum* naturally infected dogs treated with allopurinol: immunofluorescence antibody test, ELISA and western blot. *Acta Trop.* 2002; 86(3):175-181.

**Vexenat JA, Olliaro PL, Fonesca de Castro JA, Cavalcante R, Furtado Campos JH, Tavares JP, Miles MA.** Clinical recovery and limited cure in canine visceral leishmaniasis treated with aminosidine (paromomycin). *Am J Trop Med Hyg.* 1998; 58: 448–453.

**Villa L.** e-Medimecum. Guía on-line de terapia farmacológica. 2012, EINSA, Ediciones informatizadas, SA: España.

**Volmer AA, Szpilman AM, Carreira EM.** Synthesis and biological evaluation of amphotericin B derivatives. *Nat Prod Rep.* 2010; 27(9):1329-1349.

**Vouldoukis I, Drapier JC, Nüssler AK, Tselentis Y, Da Silva OA, Gentilini M, Mossalayi DM, Monjour L, Dugas B.** Canine visceral leishmaniasis: successful chemotherapy induces macrophage antileishmanial activity via the L-arginine nitric oxide pathway. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996; 40(1):253-256.

**Vyas SP & Gupta S.** Optimizing efficacy of amphotericin B through nanomodification. *Int J Nanomedicine.* 2006; 1(4):417-432.

## W

**Walker S, Taylor SAN, Lee M.** Amphotericin B in lipid emulsion: stability, compatibility, and *in vitro* antifungal activity. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42: 762-766.

**Walsh TJ, Whitcomb P, Piscitelli S, Figg WD, Hill S, Chanock SJ, Jarosinski P, Gupta R, Pizzo PA.** Safety, tolerance, and pharmacokinetics of amphotericin B lipid complex in children with hepatosplenic candidiasis. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41(9):1944-1948.

**Walsh TJ, Yeldandi V, McEvoy M, Gonzalez C, Chanock S, Freifeld A, Seibel NI, Whitcomb PO, Jarosinski P, Boswell G, Bekersky I, Alak A, Buell D, Barret J, Wilson W.** Safety, tolerance, and pharmacokinetics of a small unilamellar liposomal formulation of amphotericin B (AmBisome) in neutropenic patients. *Antimicrob Agents Chemother.* 1998; 42(9):2391-8.

**WHO Regional Office for Europe,** 2014.

[http://www.euro.who.int/\\_data/assets/pdf\\_file/0007/246166/Fact-sheet-Leishmaniasis-Eng.pdf?ua=1](http://www.euro.who.int/_data/assets/pdf_file/0007/246166/Fact-sheet-Leishmaniasis-Eng.pdf?ua=1)

**Williamson S.** Production of Amphotericin B. 2002.

Disponible en: <http://www.stephenwilliamson.com/Studies/AmpB.htm> [Fecha de acceso: 26/03/2013].

**Wolf JE & Masoff SE.** *In vivo* activation of macrophages oxidative burst activity by cytokines and amphotericin B. *Infect Immun.* 1990; 58: 1296-1300.

**Wyllie S, Cunningham ML, Fairlamb AH.** Dual action of antimonial drugs on thiol redox metabolism in the human pathogen *Leishmania donovani*. *J Biol Chem.* 2004; 279(38): 39925-39932.

## Y

**Yamaguchi H, Abe S, Tokuda Y.** Immunomodulating activity of antifungal drugs. *Ann N Y Acad Sciences*. 1993; 685: 447-457.

**Yano T, Itoh Y, Kawamura E, Maeda A, Egashira N, Nishida M, Kurose H, Oishi R.** Amphotericin B-induced renal tubular cell injury is mediated by Na<sup>+</sup> Influx through ion-permeable pores and subsequent activation of mitogen-activated protein kinases and elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> concentration. *Antimicrob Agents Chemother*. 2009; 53(4):1420-1426.

**Yao C, Donelson JE, Wilson ME.** The major surface protease (MSP or GP63) of *Leishmania* sp. Biosynthesis, regulation of expression, and function. *Mol Biochem Parasitol*. 2003;132(1):1-16.

**Yardley V & Croft SL.** Activity of liposomal amphotericin B against experimental cutaneous leishmaniasis. *Antimicrob Agents Chemother*. 1997; 41(4):752-756.

**Yardley V & Croft SL.** A comparison of the activities of three amphotericin B lipid formulations against experimental visceral and cutaneous leishmaniasis. *Int J Antimicrob Agents*. 2000; 13(4):243-248.



## **ARTÍCULOS**

---

